SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE GIRASSOL (*Helianthus annuus* L.)
RESISTENTES A *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid.

MARIA ELIZABETE BARRETTO DE MENEZES LOPES

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1986

A Elizabeth, Cristina e Eliana

Aos meus pais e irmãos

Aos meus amigos

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos:

Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati pela orientação, apoio, estímulo e amizade durante a realização e redação deste trabalho.

Ao Professor Dr. Humberto de Campos pelos ensinamentos e orientação na parte estatística.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, em especial ao Dr. José Otávio Machado Menten, pelas contribuições no período de desenvolvimento do Curso.

À Empresa Brasileira Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa da Soja - CNPSO, pelo fornecimento de sementes de girassol.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

À Dr^a. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza pelas sugestões e amizade.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, e de forma especial aos Eng^{os} Agr^{os} Rita de Cássia Panizzi, Silvânia Helena Furlan e João Tavares Bueno, pela revisão dos manuscritos e sugestões.

Aos Funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, especialmente ao Sr. Pedro da Silva, pela amizade e colaboração nos trabalhos de casa-de-vegetação e campo.

Aos Funcionários da Secretaria do Curso de Pós-Graduação e da Biblioteca Central da ESALQ, pela colaboração.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na
realização deste trabalho.

ÍNDICE

Página

RESUMO	xi
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Efeito da quantidade de farinha de soja na esporulação de <i>M. phaseolina</i> "in vitro"...	16
3.2. Influência do meio de cultura soja-ágar com superposição de papel de filtro e idade da cultura na esporulação de <i>M. phaseolina</i> ..	19
3.3. Avaliação da resistência de genótipos de girassol a <i>M. phaseolina</i> no estágio de plântulas	20
3.4. Efeito da concentração de inóculo de <i>M.</i> <i>phaseolina</i> na reação de cinco diferentes genótipos de girassol	22
3.5. Avaliação da resistência de genótipos de girassol a <i>M. phaseolina</i> no estágio adulto em condições de campo	23
3.6. Ocorrência de <i>M. phaseolina</i> em sementes de dezenove genótipos de girassol	26
3.7. Reação de linhagens de girassol a <i>M. pha</i> - <i>seolina</i> no estágio de plântulas	27

3.8. Comportamento de genótipos de girassol a <i>M. phaseolina</i> no estágio adulto em condições de campo	32
3.9. Incidência de <i>M. phaseolina</i> em sementes de dezessete genótipos de girassol	34
3.10. Detecção de <i>M. phaseolina</i> em sementes de quatro genótipos de girassol	34
3.11. Análise estatística dos experimentos	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Efeito da quantidade de farinha de soja na esporulação de <i>M. phaseolina</i> "in vitro"....	36
4.2. Influência do meio de cultura soja-ágar com superposição de papel de filtro e idade da cultura na esporulação de <i>M. phaseolina</i>	38
4.3. Avaliação da resistência de genótipos de girassol a <i>M. phaseolina</i> no estágio de plântulas	39
4.4. Efeito da concentração de inóculo de <i>M. phaseolina</i> na reação de cinco diferentes genótipos de girassol	44
4.5. Avaliação da resistência de genótipos de girassol a <i>M. phaseolina</i> no estágio adulto em condições de campo	48

4.6. Ocorrência de <i>M. phaseolina</i> em sementes de dezenove genótipos de girassol	54
4.7. Reação de linhagens de girassol a <i>M. phaseo</i> <i>lina</i> no estágio de plântulas	58
4.8. Comportamento de genótipos de girassol a <i>M.</i> <i>phaseolina</i> no estágio adulto, em condições de campo	61
4.9. Incidência de <i>M. phaseolina</i> em sementes de dezessete genótipos de girassol	69
4.10. Detecção de <i>M. phaseolina</i> em sementes de quatro genótipos de girassol	70
5. CONCLUSÕES	73
LITERATURA CITADA	75

LISTA DE TABELAS

	Página
1 - Linhagens de girassol e origem	28
2 - Efeito de quatro níveis de farinha de soja com superposição de papel de filtro na esporulação de <i>M. phaseolina</i>	37
3 - Efeito da idade da cultura na esporulação de <i>M. phaseolina</i> em meio de cultura soja-ágar com <u>super</u> posição de papel de filtro	38
4 - Teste X^2 para plantas sobreviventes e não sobreviventes dos dezenove genótipos de girassol inoculadas com <i>M. phaseolina</i> no estágio de plântulas .	
5 - Reação de cinco genótipos de girassol frente à inoculação de sementes pré-germinadas com diferentes concentrações de conídios de <i>M. phaseolina</i> ..	45
6 - Teste X^2 para plantas sobreviventes e não sobreviventes dos dezenove genótipos de girassol inoculadas com <i>M. phaseolina</i> no estágio adulto em condições de campo	48
7 - Agrupamento de dezenove genótipos em dois estádios da cultura segundo o grau de resistência ...	53

8 - Incidência de <i>M. phaseolina</i> em sementes de girassol, determinadas pelo método de papel de filtro com congelamento	55
9 - Influência da inoculação de <i>M. phaseolina</i> no <u>estádio</u> adulto em condições de campo, nas sementes de girassol	56
10 - Capacidade de sobrevivência de sete grupos de linhagens de girassol inoculadas com suspensão de conídios de <i>M. phaseolina</i> no estádio de plântulas.	59
11 - Teste χ^2 para plantas sobreviventes e não sobreviventes dos dezessete genótipos de girassol inoculadas com <i>M. phaseolina</i> no estádio adulto em condições de campo	62
12 - Agrupamento de genótipos de girassol avaliados em duas épocas segundo o grau de resistência	67
13 - Agrupamento de dezessete genótipos em dois estádios da cultura segundo o grau de resistência ...	68
14 - Detecção de <i>M. phaseolina</i> em sementes de girassol incubadas sob luz alternada e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$	70
15 - Detecção de <i>M. phaseolina</i> em sementes de girassol incubadas sob luz contínua e temperatura de 30°C ..	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 - Percentagem de plantas mortas em dezenove genóti- pos de girassol, inoculadas por <i>M. phaseolina</i> no estádio de plântulas	42
2 - Percentagem de plantas mortas em dezenove genó- tipos de girassol, inoculadas por <i>M. phaseolina</i> no estágio de florescimento	51
3 - Percentagem de plantas mortas em dezessete genó- tipos de girassol, inoculadas por <i>M. phaseolina</i> no estágio de florescimento	65

SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE GIRASSOL (*Helianthus annuus* L.)
RESISTENTES A *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid.

Candidata: Maria Elizabete Barretto de Menezes Lopes
Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

No presente trabalho estudou-se os efeitos da quantidade de farinha de soja e idade da cultura "in vitro" na esporulação de *M. phaseolina* (Tass.) Goid., a resistência de genótipos de girassol a *M. phaseolina* no estágio de plântulas em casa de vegetação, no estágio de florescimento em condições de campo, e através de testes de patologia de sementes.

No estudo sobre os níveis de farinha de soja e idades da cultura para a produção de conídios, os resultados obtidos permitiram concluir que 45 g para 1 000 ml de água e a idade de 7 dias foram os mais adequados para induzir a formação de maior número de conídios.

A reação de genótipos de girassol à inoculação por *M. phaseolina* no estágio de plântulas, em casa de vegetação e no de florescimento, em condições de campo, foram avaliadas utilizando-se como parâmetro o número de plantas mortas em rela

ção ao total. Encontrou-se três níveis de resistência em ambos estádios, e para alguns genótipos como IDS-2, Majak, Contisol, Contisol 422, Anhandy, DK-180, DK-170, C-33, RHA-298 e 291-A foi possível agrupá-los segundo o grau de resistência nos dois estádios estudados.

A inoculação de 55 linhagens de girassol em sementes pré-germinadas, avaliadas no estágio de plântulas, em condições de casa de vegetação, não acusou diferenças significativas. Porém, quando estas foram analisadas em grupos, de acordo com a origem, foi possível detectar dois níveis de resistência a *M. phaseolina*.

No experimento de calibração de inóculo de *M. phaseolina* na reação de cinco genótipos no estágio de plântulas, em casa de vegetação, verificou-se que, o número de plantas sobreviventes em cada genótipo variou com a concentração utilizada.

As sementes provenientes de experimentos de campo foram submetidas a testes de patologia através do método de papel de filtro com congelamento, com e sem pré-tratamento. Obteve-se três níveis de sensibilidade a *M. phaseolina*. Com relação aos métodos empregados, o com pré-tratamento permitiu maior recuperação do patógeno.

Para detecção de *M. phaseolina* em sementes de gi
rassol é viável a incubação durante 7 dias, sob luz branca con-
tínua e temperatura constante de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

SELECTION OF SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) GENOTYPES.
RESISTANT TO *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid.

Candidate: Maria Elizabete Barretto de Menezes Lopes
Adviser: Prof.Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

The effects of the quantity of soybean flower and the age of culture on the sporulation of *M. phaseolina* (Tass.) Goid., were studied "in vitro". In addition, the resistance of sunflower genotypes to *M. phaseolina* was studied at the seedling stage in greenhouses, at the flowering stage under normal outdoor conditions, and by pathology tests of the seeds.

In the study of the levels of soybean flower and culture age on the production of conidia, the results obtained allowed for the conclusion that the best conditions for the induction of the greatest number of conidia were 45g soybean flower per litre of water, and a culture age of seven days.

The reaction of the sunflower genotypes to inoculation with *M. phaseolina* was evaluated using as a parameter , the number of dead plants in relation to the total, working in

greenhouses in the case of seedlings, and under outdoor conditions with the flowering stage. In both cases, three levels of resistance were found, and for some genotypes, such as IDS-2 , Majak, Contisol, Contisol 422, Anhandy, DK-180, DK-170, C-33 , RHA-298 and 291-A, it was possible to arrange them in groups according to the level of resistance in the two stage studied.

The inoculation of 55 strains of sunflower in pre-germinated seeds, evaluated at the seedling stage in greenhouses, showed no significant differences. However, on analysis in groups according to origin, it was possible to detect two levels of resistance in *M. phaseolina*.

In the experiment to calibrate the inoculum of *M. phaseolina* in the reaction of five genotypes, at the seedling stage in greenhouses, it was shown that the number of surviving plants of each genotype varied with the concentration used.

The seeds resulting from outdoor experiments were submitted to pathology tests, using the filter paper plus freezing methods, with and without pre-treatment. Three levels of sensibility to *M. phaseolina* were obtained. With respect to the methods used, that with pre-treatment allowed for the greater recuperation of the pathogen.

Incubation for 7 days under continuous illumination with white light at a constant temperature of $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, is viable for the detection of *M. phaseolina* in sunflower seeds.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.), opção para diversificação da lavoura e fonte alternativa de energia, apresentou acentuado incremento a partir de 1979, principalmente em localidades ou regiões onde as lavouras de trigo resultaram em elevados prejuízos aos produtores no decorrer dos anos.

A procura de culturas alternativas de outono/inverno, em substituição ao trigo, tem levado os agricultores a tentarem a produção de outras espécies vegetais, entre elas: o sorgo, o centeio, a aveia, a cevada e o girassol, que em 1981 atingiu sua expansão máxima, com 58 000 hectares (REIS, 1984). Entretanto, a cultura pode ser considerada ainda experimental no Brasil, e por esta razão, há carência de informações quanto à importância da ocorrência de doenças. Observações em campos experimentais têm demonstrado a presença de várias (podridão ,

murcha de Esclerotinia, ferrugem, podridão negra da raiz, mancha de Alternária, etc.), que podem ser consideradas como um dos principais fatores limitantes dessa cultura (EMBRAPA, 1983).

Dentre as doenças assinaladas, a podridão negra da raiz, causada por *Macrophomina phaseolina*, ocupa um lugar de destaque, pois o patógeno estando associado às sementes, e tendo um espectro de hospedeiros constituído de centenas de espécies vegetais (GHAFAR e ZENTMYER, 1968), está presente em quase todos os locais.

A ocorrência da doença, nessas circunstâncias, torna-se mera consequência das condições ambientes favoráveis: temperatura elevada e deficiência hídrica (EDMUNDS, 1964; MEYER et alii, 1974; SACKSTON, 1981); e essas condições devem prevalecer em pelo menos alguns estádios da cultura do girassol, nas regiões de Mato Grosso, São Paulo e Paraná, conforme se depreende do levantamento de doenças do girassol feito por YORINORI e HOMECHIN (1982), que a consideraram um problema importante, principalmente no Estado de Mato Grosso do Sul.

Há tendência da doença se tornar mais problemática à medida que novas zonas de plantio, constituídas de cerrados, venham a se ocupadas com essa cultura, devido a condições predisponentes de deficiência hídrica.

HOMECHIN e SONEGO (1982) indicaram a ocorrência de cultivares de girassol resistentes a *M. phaseolina* em condições de campo, enquanto que MACHADO (1980) mostrou a possibilidade de testar a patogenicidade de *M. phaseolina* em sementes, pré-germinadas ou não, de soja e de feijão, variando o índice de doença através de diferentes concentrações de inóculo. Assim, se houver em girassol, correlação entre resistência das plântulas e de plantas adultas, trabalhos de melhoramento poderão ser acelerados pela seleção precoce, que se sugere no presente trabalho.

Desse modo, esta pesquisa visa trazer esclarecimentos ao problema apontado, e tem por objetivos:

1. Selecionar plantas de girassol resistentes a *M. phaseolina* em estágio juvenil, inoculando uma suspensão de esporos de concentração conhecida em sementes pré-germinadas.
2. Correlacionar resistência de plantas em estágio juvenil com plantas em estágio de florescimento.
3. Determinar a transmissibilidade de *M. phaseolina* em sementes de genótipos de girassol com diferentes níveis de resistência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Macrophomina phaseolina (Tass.) Goid. é um microrganismo de larga distribuição geográfica, altamente patogênico e polífago, sobre o qual existe uma ampla e complexa literatura onde são relatados trabalhos provenientes das mais diversas regiões do globo. Dentre as culturas econômicas citadas como hospedeiras desse fungo encontram-se soja (*Glycine max* (L.) Merr.), milho (*Zea mays* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sorgo (*Sorghum* spp), algodão (*Gossypium* spp), girassol (*Helianthus annuus* L.), juta (*Corchorus capsularis* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), beterraba (*Beta vulgaris* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), quiabo (*Hibiscus esculentus* L.), dendê (*Elaeis guineensis* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* P. Mill), morango (*Fragaria* spp), cacau (*Theobroma cacao* L.), e outras (Thirumalachar, 1953; Chan e Sackston, 1969; Figueiredo et alii, 1969; Sackston, 1969; Wylie e Calvert, 1969; Mendes et alii 1971), citados por MACHADO (1980).

Em regiões de clima tropical ou temperado quente, este organismo é agente causal de podridões de raízes, caules e frutos de mais de 300 espécies vegetais (GHAFFAR e ZENTMYER, 1968), sendo considerado um dos graves problemas em sementeiras de essências florestais (SMITH, 1969).

No Brasil, a primeira referência sobre a presença desse patógeno foi feita por BITANCOURT (1935). Até agora, porém, os dados existentes são escassos, tendo sido encontrados poucas publicações sobre o assunto, e quase todas se restringindo, praticamente, ao relato de sua ocorrência. O fungo foi encontrado afetando feijoeiros, na região do Vale do São Francisco, na Bahia (ISSA et alii, 1964), e também no Estado do Paraná (FIGUEIREDO et alii, 1969). Em São Paulo, foi apontado como agente causal de tombamento em sementeiras de algodão e citrus, de podridão de hastes de batata (FIGUEIREDO et alii, 1969) e do estiolamento do algodoeiro (MENDES et alii, 1971).

De acordo com MACHADO (1980), a nomenclatura desse patógeno tem sido objeto de constantes modificações em vista de seu estágio esclerocial, estéril, e seu estágio picnidial. O estágio esclerocial foi primeiramente denominado *Sclerotium batatiola* Taub., e mais tarde, transferido para o gênero *Rhizoctonia*, como *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butl. O estágio picnidial foi descrito por Maublanc (1905), citado por MACHADO (1980) como *Macrophomina phaseoli* Maubl. Em 1927 Ashby, ainda

citado por MACHADO (1980), trabalhando com materiais de diversas procedências, descreveu-o como *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby, considerando as denominações de *Sclerotium bataticola* Taub., *Macrophoma corchori* Saw., *Macrophoma cajani* Sys. e Butl., *Dothiorella cajani* Sys. e Butl., *Macrophomina philippinensis* Petr., *Rhizoctonia lamellifera* Small, *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butl. e *Macrophoma sesami* Saw., como sinônimos. Entretanto, segundo Thirumalachar (1953), citado por MACHADO (1980), o estágio picnidial pertence ao gênero *Botryodiplodia*, e o fungo deveria então ser descrito como *Botryodiplodia phaseoli* (Maubl.) Thir. Comb. Nov.

Goidanich (1974), citado por FIGUEIREDO et alii (1969) e MACHADO (1980), esclarece que a denominação *Macrophomina phaseolina* (Tass. Goid. tem prioridade sobre *Macrophomina phaseoli* (Maubl.), Ashby, mas como a literatura havia consagrado o nome dado por Ashby, esta vinha sendo aplicada com maior frequência, e somente há bem pouco tempo, a denominação correta passou a ser empregada.

Os sintomas da podridão negra da raiz causados por *Macrophomina phaseolina* em girassol são típicos. Desagregam-se os tecidos da base da haste e das raízes, que apresentam coloração negra característica, devido a abundante produção de microesclerócios do fungo, facilmente visíveis pela remoção da epiderme. As hastes severamente infectadas apresentam-se ocas

e facilmente quebradiças, sendo, portanto, muito suscetíveis ao acamamento. Embora as plantas possam ser infectadas desde os estádios iniciais de desenvolvimento, os sintomas típicos só aparecem a partir do estágio de floração. (ALMEIDA et alii, 1981; ZIMMER e HOES, 1978).

Os sintomas em plantas jovens variam daqueles apresentados em plantas adultas. Em plântulas de girassol inoculadas artificialmente com *Macrophomina phaseolina*, a doença se manifesta com "damping-off", amarelecimento e morte das primeiras folhas inferiores e escurecimento da haste a 3-4 cm acima do nível do solo. Em todas as espécies inoculadas artificialmente, observa-se como efeito final, a desintegração da raiz, da qual desaparecem os tecidos parenquimáticos e medulares separando os tecidos vasculares. A presença do fungo nestas plântulas é mais difícil de se observar que em plantas adultas. (FRESA, 1965).

Tem sido comprovado por muitos autores, que a combinação da alta temperatura, baixa umidade do solo e plantas próximas à maturação são fatores importantes na ocorrência de epifitias de *M. phaseolina* (MATHUR e SACKSTON, 1963; EDMUNDS, 1964; JOOSTE, 1969; DHINGRA e SINCLAIR, 1978). Experimentos realizados em condições controladas comprovaram que temperaturas em torno de 30°C e com deficiência hídrica são as ideais para o desenvolvimento do fungo, tanto em meio de cultura como no solo,

(EDMUNDS, 1964; MEYER et alii, 1974; ALMEIDA et alii, 1981), predispondo à infecção, a qual provoca a maturação prematura e reduz a produção e a qualidade das sementes (JIMÉNEZ-DÍAZ et alii, 1983).

BLANCO-LÓPEZ e JIMÉNEZ-DÍAZ (1983), em estudos feitos em campos irrigados com plantas de girassol, inoculadas artificialmente com *Macrophomina phaseolina*, mostraram que a incidência e severidade da doença diminuem à medida que a irrigação é feita em maior número e nos diferentes estádios, e que aumentam quando se irriga somente nos estádios finais da cultura. Os resultados também indicaram que a maior incidência e severidade em plantas não irrigadas são causadas pelo aumento da suscetibilidade das plantas. Assim, baixa umidade do solo, predispõe o girassol, bem como outras culturas à infecção por *Macrophomina phaseolina*.

Uma vez que a podridão negra da raiz está associada com "stress" de umidade e altas temperaturas, qualquer prática que reduza a exposição das plantas a estas condições, reduzirá as perdas. Plantio antecipado ou escolha de cultivares de maturação precoce para escapar às condições secas e quentes, e irrigação são práticas as quais reduziriam as perdas pela doença. Embora pouco seja conhecido sobre a resistência relativa da maioria das cultivares e linhagens de girassol, investigações de ORELLANA (1970) e mais recentemente de ALABOUVEITE e BRE

MEERSCH (1975), demonstraram que as cultivares respondem diferentemente à inoculação artificial bem como a infecção natural no campo, sugerindo então o controle da podridão negra da raiz pelo melhoramento de resistência (ZIMMER e HOES, 1978).

De acordo com BERGAMIN FILHO e KIMATI (1978), o uso de variedades resistentes constitui um dos mais importantes meios de controle de doenças das plantas cultivadas. Sempre que existam fontes satisfatórias de resistência, que possibilitem a obtenção de variedades resistentes, o emprego destas no controle de doenças de plantas é, sempre, a medida mais econômica, a que menos afeta o custo de produção.

Assim, ORELLANA (1970), em estudos de campo, observou ampla variabilidade genotípica em cultivares de girassol sob infecção natural de *Macrophomina phaseolina*. As variedades de maturação precoce foram as mais suscetíveis, as de maturação tardia e as moderadamente tardias as mais resistentes. Outras variedades as quais foram intermediárias em sua maturidade foram correspondentemente intermediárias em sua suscetibilidade. A ocorrência de plantas individuais resistentes, dentro de progênies segregantes, indicam que resistência genotípica existe, e o autor sugere que variedades resistentes podem ser desenvolvidas. Esta conclusão foi confirmada por observações em campos no Texas, as quais mostraram que em certos genótipos de girassol, resistentes à podridão negra da raiz, a característica é

dominante. A resposta de hospedeiros de girassol à infecção por *M. phaseolina* também pode estar associada com maturidade varietal, uma vez que as cultivares mais tardias foram as mais resistentes.

De fato, ACIMOVIC (1964) verificou, em observações de campo, que as cultivares tardias e semeadura tardia em girassol reduziram o número de plantas murchas. MIRZA et alii (1982), avaliando 50 cultivares de girassol no campo, encontraram diferenças em sua reação à podridão negra da raiz. Os genótipos precoces foram altamente suscetíveis, enquanto que os tardios se apresentaram resistentes com menos de 20 % de plantas mortas. Diferenças na resposta à doença entre esses dois grupos foram altamente significativas.

HOMECHIN e SONEGO (1982), em trabalho conduzido em condições de campo, em área com alto índice de inóculo do fungo, encontraram dos 42 germoplasmas de girassol testados, cinco que não foram infectados.

Embora não pareça lógico esperar resistência dentro de uma espécie hospedeira a um patógeno pouco especializado, com um espectro de hospedeiros extremamente amplo, diferenças em reação de variedades de girassol a *M. phaseolina* foram observadas por SACKSTON (1981), parecendo algumas linhagens terem alta resistência. ROBINSON (1973), relata que para patógenos pouco

especializados como no caso de *Macrophomina phaseolina*, a resistência, geralmente, é do tipo quantitativa e poligênica.

WALKER (1965), em estudos sobre o uso de fatores ambientes na seleção de resistência a doenças, ressalta que, quando resistência multigênica está envolvida, condições sub-ótimas de temperatura e de nível de inóculo podem ser desejáveis.

Com relação a condições sub-ótimas de temperatura, além dos trabalhos citados (EDMUNDS, 1964; MEYER et alii, 1974 e ALMEIDA et alii, 1981), que trazem informações genéricas sobre o assunto, existe a pesquisa de MATHUR e SACKSTON (1963), em girassol, onde os autores concluem que a temperatura ótima para o crescimento de *M. phaseolina* está ao redor de 30°C.

O controle de nível de inóculo em trabalhos com *Macrophomina phaseolina* tem sido feito através da contagem de escleródios (SHORT e WYLLIE, 1978). Isso, evidentemente, devido ao fato do fungo ser extremamente difícil de formar picnídios em meio de cultura.

A variação de concentração de inóculo, constituído de conídios, tornou-se possível devido aos trabalhos de indução de esporulação, desenvolvidos em laboratórios por MACHADO e KIMATI (1975) e MACHADO (1980). Variando-se a concentração de

inóculo, pode-se discriminar níveis de resistência pelo critério do limiar numérico de infecção, um dos critérios propostos por GAUMANN (1950) para avaliar resistência de plantas à doenças.

A calibração da concentração de inóculo é de suma importância na seleção de cultivares resistentes, pois essa concentração funciona como fator de pressão de seleção, sendo possível escolher o nível de resistência da seleção (WALKER, 1965).

Epidemiologicamente, dentro de um mesmo ciclo de uma cultura, uma doença que se comporta como se fosse de juro simples, dificilmente se dissemina de planta a planta de modo a afetá-las diretamente num mesmo ciclo. (BERGAMIN FILHO, 1978).

De acordo com DHINGRA e SINCLAIR (1978), a semente é o principal meio de disseminação de *M. phaseolina* para a grande maioria das culturas. Em girassol a disseminação do fungo a longas distâncias, dá-se principalmente, através das sementes.

Estudos de transmissão de *Macrophomina phaseolina* através das sementes em girassol, segundo RAUT (1983), mostram que o inóculo proveniente de semente, infecta as raízes primárias e cotilédones de sementes germinadas dentro de dois a

três dias. A infecção dos cotilédones para os nós cotiledonares começa após cerca de uma semana. As partes infectadas se tornam pardas e plântulas morrem neste ponto enfraquecido, da segunda semana em diante e numerosos escleródios e picnídios se desenvolvem nos tecidos mortos. As primeiras folhas verdadeiras são infectadas no momento da abertura, provavelmente como um contacto de infecção dos cotilédones. Contudo, a infecção não é detectada no ponto de ligação dessas folhas. O fungo ataca as raízes primárias na maioria das plântulas na emergência, mas as plantas mortas devido a podridão das raízes também. É dependente da temperatura. A infecção da haste se torna evidente perto ou após a antese e, geralmente, não progride além de um terço da altura da planta. Numerosos picnídios e escleródios são formados no exterior da haste, e esta se apresenta com uma aparência de podridão negra. Os resultados então indicam que *M. phaseolina* não causa infecção sistêmica em plantas de girassol.

Varada Rajan e Patel (1943), citados por RAUT (1983), relatam que o estágio picnidial de *M. phaseolina* é uma efetiva fonte de inóculo para a infecção de sementes em juta. Em girassol, o patógeno forma abundante picnídios nas hastes infectadas, plântulas mortas e pericarpos, os quais, geralmente caem no solo durante a emergência. Conídios destas fontes, e possivelmente de outros hospedeiros, parecem ser responsáveis pela infecção direta em girassol.

M. phaseolina invade as sementes de girassol quando a antese se completa no quarto externo do raio da inflorescência. Os estádios entre antese completa e maturidade das sementes parecem ser mais suscetíveis à infecção das sementes. A infecção das sementes pode variar com as condições de umidade e temperatura (RAUT, 1983).

FAKIR et alii (1976), também em trabalhos sobre transmissão de *M. phaseolina* em sementes de girassol, relatam que em testes de sanidade das sementes, utilizando o método do papel de filtro, *M. phaseolina* frequentemente inibe a germinação, causa morte de emergência das radículas e descoloração das raízes, hipocótilo e cotilédones. A falha na germinação de sementes infectadas por *M. phaseolina*, em testes com papel de filtro, foi correlacionada com alta mortalidade de pré-emergência das plântulas em vasos e os autores sugerem que o patógeno pode causar morte de pré-emergência de plântulas de girassol no campo.

Experimentos de inoculação ainda por FAKIR et alii (1976), indicam que o isolado de *M. phaseolina* testado foi altamente patogênico, causando sintomas de podridão negra da raiz em tubérculos de batata, "damping-off" em plântulas de girassol e lesões lineares necróticas nas hastes de plantas de girassol mais velhas. Posteriormente, picnídios e escloródios se desenvolveram nas partes infectadas das plantas inoculadas. O patógeno foi isolado de sementes de algumas plantas com lesões nas has

tes, mas as sementes de plantas de girassol, sem sintomas, a partir de sementes infectadas naturalmente, não apresentaram *M. phaseolina*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em condições de casa-de-vegetação, de laboratório e de campo do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP.

3.1. Efeito da quantidade de farinha de soja na esporulação de *M. phaseolina* "in vitro".

3.1.1. Isolado

O isolado utilizado neste experimento foi obtido de plantas de girassol doentes em condições de campo.

3.1.2. Meio de cultura e tratamentos

Foi testado o meio de cultura soja-ágar com superposição de papel de filtro, previamente esterilizado, na super-

fície do meio solidificado com as seguintes quantidades de farinha de soja:

- 15 g de farinha de soja; 12 g de ágar-ágar ;
água destilada q.s.p. 1 000 ml.
- 30 g de farinha de soja; 12 g de ágar-ágar ;
água destilada q.s.p. 1 000 ml.
- 45 g de farinha de soja; 12 g de ágar-ágar ;
água destilada q.s.p. 1 000 ml.
- 60 g de farinha de soja; 12 g de ágar-ágar ;
água destilada q.s.p. 1 000 ml.

Os meios foram preparados e esterilizados em autoclave (1 atm de pressão por 20 minutos) e vertidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após 24 horas, discos de papel de filtro de 9 cm de diâmetro, previamente esterilizados (autoclave 1 atm de pressão por 15 minutos e estufa seca a 180°C por 2 horas), foram superpostos à superfície dos meios solidificados.

3.1.3. Método de plaqueamento e incubação

Para a obtenção do inóculo inicial, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo BDA, por 48 horas. Após esse período, foram retirados dos bordos das colônias, discos

de 4 mm de diâmetro e transferidos para o centro das placas com o meio de cultura soja-ágar com superposição de papel de filtro. As placas foram então mantidas sob condições de luminosidade contínua, fornecidas por 4 lâmpadas fluorescentes de 40 watts , luz do dia, a uma distância de 35 cm acima da superfície das placas, por um período de 7 dias. A temperatura foi mantida a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.1.4. Método de avaliação

A avaliação foi realizada após 7 dias de incubação através da contagem do número de conídios. A suspensão de conídios foi conseguida, adicionando-se em cada placa, 5 ml de água destilada e esterilizada sobre a superfície das colônias esporuladas, raspando-se então essas superfícies suavemente com pincel macio. Essas suspensões foram filtradas através de gaze fina e recolhidas em Erlenmeyer. A concentração de inóculo foi determinada em hemocitômetro.

Como delineamento experimental utilizou-se parcelas inteiramente casualizadas com 4 tratamentos (níveis de farinha de soja) e 3 repetições. Cada repetição constou de 5 placas.

3.2. Influência do meio de cultura soja-ágar com superposição de papel de filtro e idade da cultura na esporulação de *M. phaseolina*

Com base nos resultados obtidos no experimento anterior foi utilizado neste experimento o meio de farinha de soja (45 g/l) e ágar (12 g/l), com superposição de papel de filtro. A metodologia de obtenção de inóculo, plaqueamento e incubação foram semelhantes à descrita para o experimento 3.1. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 3 tratamentos (idades da cultura) e 5 repetições.

3.2.1. Isolado

Para este estudo foi utilizado o mesmo isolado do item 3.1.1.

3.2.2. Avaliação

A avaliação foi realizada após 6, 7 e 8 dias de incubação, seguindo a metodologia do estudo de efeito da quantidade de farinha de soja na esporulação de *M. phaseolina*, exceto para a quantidade de água adicionada a cada placa, que foi de 9 ml.

3.3. Avaliação da resistência de genótipos de girassol a *M. phaseolina* no estágio de plântulas

3.3.1. Isolado

O isolado utilizado neste experimento foi obtido de plantas de girassol doentes provenientes de experimento desenvolvido em condições de casa-de-vegetação.

3.3.2. Genótipos

Foram testados entre linhagens, híbridos e variedades, 19 genótipos: IDS-2, IDS-3, RHA-298, CMS-HA-290, Contisol 711, 291-A, Contisol-112, Majak. Contisol 422, Collihway, DK-170, C-33, Cordobez, Contisol, DK-180, DK-160, Issanka, Anhandy e Contisol 812.

3.3.3. Obtenção e preparo do inóculo

A obtenção e preparo do inóculo foram semelhantes a descrita no item 3.1.

3.3.4. Concentração do inóculo e método de inoculação

Foi utilizada apenas uma concentração de inóculo -1×10^5 conídios/ml, além da testemunha.

As sementes dos dezenove genótipos de girassol foram pré-germinadas por quatro dias, em bandejas de plástico, sobre papel toalha de germinação (GermiteX) umedecido em ambiente escuro à temperatura de 25°C. No quinto dia, as plântulas de cada genótipo foram retiradas das bandejas e mergulhadas por 1 minuto em 15 ml da suspensão de esporos na concentração indicada e em seguida, plantadas em vasos de alumínio, contendo solo esterilizado por autoclavagem, sob condições de casa-de-vegetação. Foram utilizadas 7 plântulas por vaso em cada repetição de cada tratamento, perfazendo um total de 35 plantas de cada genótipo. A temperatura do solo durante a condução do ensaio variou de 30-35°C, observada através de um termômetro colocado em um dos vasos, com leituras realizadas mais ou menos às 14:00 horas. A quantidade de água fornecida às plantas foi suficiente para mantê-las vivas, procurando-se dar "stress" de umidade.

Utilizou-se como delineamento blocos ao acaso com 19 tratamentos e 5 repetições.

3.3.5. Avaliação

A avaliação foi realizada 15 dias após o plantio, pela contagem do número de plantas que sobreviveram em cada vaso.

3.4. Efeito da concentração de inóculo de *M. phaseolina* na reação de cinco diferentes genótipos de girassol

3.4.1. Isolado

Para este experimento utilizou-se um isolado proveniente de ensaio com plantas de girassol doentes, desenvolvido em condições de campo.

3.4.2. Genótipos

Foram testados cinco diferentes genótipos: IDS-2, Contisol 422, DK-170, RHA-298 e Contisol 711.

3.4.3. Obtenção, preparo do inóculo e método de inoculação

O inóculo foi obtido e preparado de modo semelhante ao descrito no experimento sobre o efeito da quantidade de farinha de soja na esporulação de *M. phaseolina*. O método de inoculação foi idêntico ao item 3.3.4.

3.4.4. Concentração do inóculo

Foram usadas três concentrações de inóculo, além da testemunha.

- 0 - água destilada esterilizada (testemunha).
- 1 - 1×10^4 conídios/ml.
- 2 - 1×10^5 conídios/ml.
- 3 - 1×10^6 conídios/ml.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com tratamentos em fatorial (4 concentrações de inóculo x 5 genótipos) e com 5 repetições.

3.4.5. Avaliação

A avaliação foi feita 20 dias após o plantio, pela contagem do número de plantas que sobreviveram em cada vaso.

3.5. Avaliação da resistência de genótipos de girassol a *M. phaseolina* no estágio adulto em condições de campo

3.5.1. Isolado

O isolado utilizado neste experimento foi o mesmo ao descrito no item 3.4.1.

3.5.2. Genótipos

Foram testados entre linhagens, híbridos e variedades, 19 genótipos: IDS-2, IDS-3, RHA-298, CMS-HA-290, Conti

sol 711, 291-A, Contisol 112, Majak, Contisol 422, Collihway , DK-170, C-33, Cordobez, Contisol, DK-180, DK-160, Issanka, Anhandy e Contisol 812.

3.5.3. Obtenção e preparo do inóculo

Para obtenção do inóculo inicial, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo BDA, por 48 horas. Após esse período, foram cortados dos bordos das colônias, discos de 4 mm de diâmetro e transferidos para Erlenmeyer, contendo sementes de sorgo sacarino BR-501, previamente esterilizadas por autoclavagem durante 1 hora a 1 atm de pressão e temperatura de 120°C em dois dias consecutivos. Os recipientes foram mantidos sob condições de luminosidade contínua, fornecida por 4 lâmpadas fluorescentes de 40 watts, luz do dia, a uma distância de 35 cm acima da superfície dos frascos, por um período de 7 dias.

3.5.4. Método de inoculação

Inicialmente, feriu-se a região do colo das plantas, e a seguir, o inóculo constituído em média, de 40 sementes de sorgo colonizadas pelo patógeno, foi colocado ao redor do ferimento.

As plantas foram inoculadas quando todos os genótipos estavam no mesmo estágio fenológico de desenvolvimento ,

correspondente à formação do botão floral, de acordo com a chave descritiva dos estádios de desenvolvimento do girassol (SIDDIQUI et alii, 1975).

3.5.5. Delineamento experimental

Utilizou-se como delineamento blocos casualizados com três repetições, sendo cada parcela composta de uma linha de três metros de comprimento, espaçada de um metro, perfazendo um total de 57 parcelas. A densidade de semeadura foi de 10 sementes por metro linear. Uma linha de bordadura semeada com a variedade Anhandy foi colocada ao redor da área total do ensaio que foi de 230 m^2 .

A adubação usada foi de 60 kg/ha de P_2O_5 ; 70 kg/ha de K_2O e 60 kg/ha de N.

O ensaio teve 120 dias de duração, sendo conduzido entre os meses de março a julho de 1985.

3.5.6. Avaliação

A avaliação foi realizada pelo número de plantas sobreviventes de cada genótipo.

3.6. Ocorrência de *M. phaseolina* em sementes de dezenove genótipos de girassol

Após a avaliação do experimento de seleção para resistência de genótipos a *M. phaseolina* no estágio adulto, em condições de campo, os capítulos foram cortados e colocados para secar em casa-de-vegetação. A seguir, as sementes foram retiradas dos capítulos e beneficiadas manualmente. De cada genótipo obteve-se uma amostra de 100 g para a análise de sanidade das sementes.

Nos testes de sanidade foi utilizado o método do Papel de Filtro com Congelamento ("Deep-freezing method").

Método do papel de filtro com congelamento ("Deep-freezing method")

Foram colocadas duzentas sementes de cada genótipo, sendo cem sementes sem assepsia e cem tratadas com hipoclorito de sódio 1 % durante três minutos, em placas de Petri de plástico de 9,5 cm de diâmetro, contendo três discos de papel de filtro, previamente embebidos em água destilada, distribuindo-se de maneira equidistante 10 sementes por placa e incubadas à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, seguindo-se 24 horas sob temperatura de -18°C , e finalmente, nova incubação por seis dias a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O regime luminoso utilizado foi de 12 horas sob luz fluorescente alternado com 12 horas de escuro. Após

esse período, as sementes foram examinadas sob microscópio estereoscópio e/ou microscópio composto para detecção do patógeno em questão.

O delineamento experimental foi o de parcelas inteiramente casualizadas com tratamentos em fatorial (2 métodos x 19 cultivares) e com 4 repetições. Cada repetição consistiu de 25 sementes.

3.7. Reação de linhagens de girassol a *M. phaseolina* no estágio de plântulas

3.7.1. Isolado

Para este estudo foi utilizado o mesmo isolado do Ítem 3.4.1.

3.7.2. Linhagens

Foram testadas 55 linhagens de girassol fornecidas pela Empresa Brasileira Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa da Soja. Na Tabela 1 encontram-se relacionadas as linhagens, assim como sua origem.

Tabela 1 - Linhagens de girassol e origem.

Linhagens	Origem
PERG 4- 33	Argentina
PERG 4- 37	Argentina
PERG 4- 40	Argentina
PERG 4- 83	Argentina
PERG 4- 71	Argentina
PERG 4- 68	Argentina
PERG 4- 73	Argentina
PERG 4- 42	Argentina
PERG 4- 28	Argentina
PERG 4- 18	Argentina
PERG 4- 24	Argentina
PERG 4-215	Argentina
PERG 4- 48	Argentina
PERG 4- 49.1	Argentina
PERG 4- 47	Argentina
PERG 4- 49	Argentina
PERG 4- 8	Argentina
PERG 4- 32	Argentina
PERG 4- 9	Argentina
PERG 4-109	Argentina
PERG 4- 16	Argentina
PERG 4- 72.1	Argentina

Continua

Tabela 1 - Continuação.

Linhagens	Origem
PIGB 277.1	França
PIGB 277.2	França
PIGB 214.1	França
PIGB 214.2	França
PIGB 257.2	França
PIGB 244	França
PIGB 248	França
PIGB 250	França
PIGB 249	França
PIGB 190	França
PIGB 186	França
PIGB 215	França
PIGB 201	França
PIGB 213	França
PIGB 276-1	França
PIGB 279	França
PIGB 211	França
PIIDR 306	França
PIIDR 294	França
PIIIDR 333	França
PIIIDR 339	França
CORD 146	França

Continua

Tabela 1 - Continuação.

Linhagens	Origem
CORD 150	França
PODB 329	França
PODB 324	França
PODB 315	França
PODB 320	França
PODB 313.1	França
PODB 314	França
6BX ILNISSEI - 176	Argentina
6BX ILNISSEI - 166-2	Argentina
6BX ILNISSEI - 164	Argentina
6BX ILNISSEI - 169	Argentina

3.7.3. Obtenção, preparo do inóculo e método de inoculação

A metodologia empregada para a obtenção, preparo do inóculo e método de inoculação foi semelhante a descrita nos estudos sobre esporulação de *M. phaseolina* e resistência de genótipos de girassol a *M. phaseolina* no estágio de plântulas, respectivamente.

3.7.4. Concentração do inóculo

A concentração de inóculo foi calibrada para 2×10^4 conídios/ml.

Foram usadas 4 plântulas por vaso em cada repetição de cada tratamento, perfazendo um total de 8 plântulas de cada linhagem. A testemunha, colocada para uma melhor comparação dos efeitos da inoculação, constou de um vaso com 4 plântulas para cada linhagem.

A temperatura do solo durante a condução do ensaio variou de 30-35°C observada através de um termômetro colocado em um dos vasos, com leituras feitas mais ou menos às 14:00 horas. O teor de umidade fornecido às plantas foi semelhante ao experimento de avaliação da resistência de genótipos de girasol a *M. phaseolina* no estágio de plântulas.

O delineamento experimental foi o de parcelas inteiramente casualizadas, com 55 tratamentos e 2 repetições.

3.7.5. Avaliação

A avaliação foi realizada 20 dias após o plantio, através da contagem do número de plantas que sobreviveram em cada vaso.

3.8. Comportamento de genótipos de girassol a *M. phaseolina* no estágio adulto em condições de campo

3.8.1. Isolado

O isolado utilizado foi conseguido de plantas doentes provenientes de experimento em condições de casa-de-vegetação.

3.8.2. Genótipos

Foram testados entre linhagens, híbridos e variedades, 17 genótipos: IDS-2, IDS-3, RHA-298, CMS-HA-290, Contisol 711, 291-A, Contisol 112, Contisol 422, DK-170, C-33, Cordobez, Contisol, DK-180, DK-160, Issanka, Anhandy e Contisol 812.

3.8.3. Obtenção, preparo do inóculo e método de inoculação

A obtenção, preparo do inóculo, assim como o método de inoculação foram idênticos ao descrito nos Itens 3.5.3. e 3.5.4. O inóculo foi constituído, em média, de 90 sementes de sorgo, colonizadas pelo patógeno.

3.8.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com três repetições, sendo cada parcela composta de uma linha de três metros de comprimento, espaçada de um metro, perfazendo um total de 51 parcelas. A densidade de semeadura foi de 15 sementes por metro, e duas semanas após a germinação, realizou-se o desbaste deixando 5 plantas por metro linear. A testemunha colocada para uma melhor comparação dos efeitos da inoculação, constou de um bloco com os mesmos genótipos.

Ao redor do ensaio foi semeada uma faixa de 3 m com a variedade de milho Piranão.

A área total do ensaio foi de 306 m^2 , excluindo-se a faixa de milho.

A adubação usada foi de 60 kg/ha de P_2O_5 ; 70 kg/ha de K_2O e 100 kg/ha de N, sendo aplicado o nitrogênio 1/3 no plantio e 2/3 em cobertura 40 dias após a emergência.

O ensaio teve 110 dias de duração, sendo conduzido entre os meses de outubro/85 a janeiro/86.

3.8.5. Avaliação

A avaliação foi realizada pelo número de plantas sobreviventes de cada genótipo.

3.9. Incidência de *M. phaseolina* em sementes de dezessete genótipos de girassol

A metodologia utilizada neste experimento foi semelhante a de ocorrência de *M. phaseolina* em sementes de dezesseis genótipos de girassol, exceto no que se refere ao método sem assepsia o qual não foi utilizado.

Foram colocadas cem sementes de cada parcela, tratadas previamente com hipoclorito de sódio 1 %.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 17 tratamentos (genótipos) e 4 repetições perfazendo um total de 68 parcelas.

3.10. Deteção de *M. phaseolina* em sementes de quatro genótipos de girassol

Para este estudo utilizou-se duzentas sementes de cada genótipo, provenientes de experimento de campo inoculadas artificialmente por *M. phaseolina* analisadas pelo método de

papel de filtro, sem pré-tratamento com hipoclorito de sódio, incubadas sob condições de luminosidade contínua, fornecidas por 4 lâmpadas fluorescentes de 40 watts, luz do dia, a uma distância de 35 cm acima da superfície das placas, por um período de 7 dias. A temperatura foi mantida a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A avaliação foi realizada de maneira semelhante ao item 3.6.

O delineamento experimental foi o de parcelas inteiramente casualizadas com 4 tratamentos (genótipos) e 4 repetições. Cada repetição constou de 50 sementes.

3.11. Análise estatística dos experimentos

Para os experimentos 3.3, 3.5 e 3.8, o teste Qui quadrado (χ^2) foi o mais adequado para detectar as diferenças significativas entre os genótipos. Para a análise de variância dos resultados dos experimentos 3.6, 3.9 e 3.10, os dados em percentagem foram transformados em arc sen $\sqrt{x+0,5}$. Para os experimentos 3.1, 3.4 e 3.7 usou-se a transformação $\sqrt{x+0,5}$.

As transformações foram realizadas com a finalidade de homogeneizar a variância dos tratamentos e normalizar a variância dos resíduos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da quantidade de farinha de soja na esporulação de *M. phaseolina* "in vitro"

As médias apresentadas na Tabela 2 mostram que a quantidade de 45 g de farinha de soja utilizada como fonte de nutrientes para a produção de conídios de *M. phaseolina*, foi superior às demais quantidades, não diferindo, entretanto, das de 30 a 60 g.

De fato HAWKER (1967) relata que, as variações de concentração de substâncias alimentares desejáveis para a esporulação é, geralmente, menor que para o crescimento micelial.

MACHADO (1980), trabalhando com diferentes meios de cultura para indução de esporulação de *M. phaseolina* concluiu que, o meio constituído de farinha de soja foi significativamente superior em relação aos meios de aveia e BDA testados. Embo

ra esta observação seja original, pois não há na literatura nenhum trabalho que aborde a esporulação do fungo quantitativamente em diferentes meios de cultura, mas apenas de maneira qualitativa, o autor não estudou diversas concentrações desse meio. Assim, sugere-se que em trabalhos com *M. phaseolina* utilizando-se isolados provenientes de girassol, a quantidade de 45 g de farinha de soja deve ser preferida às demais estudadas.

Tabela 2 - Efeito de quatro níveis de farinha de soja com superposição de papel de filtro na esporulação de *M. phaseolina*.

Níveis de farinha de soja	Número de conídios (x 10 ⁵)/placa nas repetições ⁽²⁾			Média ⁽¹⁾
	1	2	3	
15 g	0	0	0	0 b
30 g	4,3	12,0	0	5,43ab
45 g	13,7	6,0	16,0	11,90a
60 g	4,8	1,2	0,5	2,17ab

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

(2) Cada repetição constou de 5 placas.

4.2. Influência do meio de cultura soja-ágar com superposi -
ção de papel de filtro e idade da cultura na esporula -
ção de *M. phaseolina*

Os resultados apresentados na Tabela 3, mostram que o isolado testado esporulou no meio de cultura utilizado e que o período de sete dias é crítico para a contagem dos conídios, pois no sexto dia, os conídios não estão ainda amadurecidos e no oitavo iniciam a germinação.

Tabela 3 - Efeito da idade da cultura na esporulação de *M. phaseolina* em meio de cultura soja-ágar com superposição de papel de filtro.

Idade da cultura em dias	Placas	Número de conídios/placas (9×10^4)
6	1	0,75
	2	0,75
	3	1,00
	4	0,88
	5	0,75
	Média	0,82 a ⁽¹⁾
7	1	3,63
	2	3,63
	3	4,88
	4	3,50
	5	5,13
	Média	4,20 b
8	1	1,00
	2	0,88
	3	0,75
	4	1,38
	5	1,50
	Média	1,10 a
MÉDIA		2,04

(1) Médias seguidas de uma mesma letra não diferem significativamente segundo o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

O teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade aplicado às médias apresentadas na Tabela 3, evidencia que a esporulação de *M. phaseolina* foi significativamente superior no meio de cultura utilizado aos 7 dias de idade, em relação ao sexto e oitavo dias, e que a contagem de conídios nestes dois dias não diferiram significativamente entre si.

Os resultados deste experimento coincidem com os de MACHADO (1980) em estudos sobre esporulação de *M. phaseolina* "in vitro" de vez que, observou-se que o período de sete dias é crítico para a contagem de picnídios, pois a partir do oitavo dia, os conídios iniciam a germinação, mesmo quando agrupados sobre os picnídios, dificultando assim sua distinção dentro da colônia.

4.3. Avaliação da resistência de genótipos de girassol a *M. phaseolina* no estágio de plântulas

Os resultados obtidos neste experimento são apresentados na Tabela 4 e Figura 1.

Analisando-se os resultados obtidos pelo teste χ^2 para plantas sobreviventes e não sobreviventes (Tabela 4), nota-se que os genótipos testados apresentaram diferenças significativas à inoculação por *M. phaseolina* ao nível de 0,1 % de pro

babilidade. Observa - se que os genótipos IDS-2 , IDS-3, CMS-HA-290, Majak, Contisol 422 e Contisol não diferem entre si em relação ao nível de resistência a *M. phaseolina*, porém diferem dos demais genótipos ao nível de 0,1 % de probabilidade. Os genótipos RHA-298, Contisol 711, 291-A, Contisol 112 e Issanka também não diferem entre si em relação ao nível de resistência, mas diferem das cultivares Collihway, DK-170, C-33 , Cordobez, DK-180, DK-160, Anhandy e Contisol 812, que por sua vez também não diferem entre si pelo teste χ^2 ao nível de 0,1 % de probabilidade. IDS-2, IDS-3, CMS-HA-290, Majak, Contisol 422 e Contisol apresentaram um maior nível de resistência. Os mais suscetíveis foram RHA-298, Contisol 711, 291-A, Contisol 112 e Issanka. Os que apresentaram um nível intermediário de resistência à inoculação por *M. phaseolina* em condições controladas de casa-de-vegetação foram Collihway, DK-170, C-33, Cordobez, DK-180, DK-160, Anhandy e Contisol 812.

Tabela 4 - Teste χ^2 para plantas sobreviventes e não sobreviventes dos dezenove genótipos de girassol inoculadas com *Macrophomina phaseolina* no estágio de plântulas.

Genótipos	S	NS	Total
IDS-2	18 (10,21)*	17 (24,78)*	35
RHA-298	5 (10,21)	30 (24,78)	35
CMS-HA-290	15 (10,21)	20 (24,78)	35
Contisol 711	4 (10,21)	31 (24,78)	35
IDS-3	15 (10,21)	20 (24,78)	35
291-A	5 (10,21)	30 (24,78)	35
Contisol 112	2 (10,21)	33 (24,78)	35
Majak	17 (10,21)	18 (24,78)	35
Contisol 422	18 (10,21)	17 (24,78)	35
Collihway	11 (10,21)	24 (24,78)	35
DK-170	8 (10,21)	27 (24,78)	35
C-33	10 (10,21)	25 (24,78)	35
Cordobez	10 (10,21)	25 (24,78)	35
Contisol	14 (10,21)	21 (24,78)	35
DK-180	8 (10,21)	27 (24,78)	35
DK-160	8 (10,21)	27 (24,78)	35
Issanka	5 (10,21)	30 (24,78)	35
Anhandy	10 (10,21)	25 (24,78)	35
Contisol 812	11 (10,21)	24 (24,78)	35
Total	194	471	665

$\chi^2 = 59,44^{***}$ (18 G.L.). *** Indicam significância a 0,1 %.

χ^2 (5 %) = 28,87; χ^2 (1 %) = 34,80; χ^2 (0,1 %) = 42,31

S = Plantas que sobreviveram ao final do experimento.

NS = Plantas não sobreviventes ao final da avaliação.

* = frequência esperada.

Figura 1 - Percentagem de plantas mortas em dezenove genótipos de girassol, inoculadas por *M. phaseolina* no estágio de plântulas.

Os resultados obtidos neste experimento, no que diz respeito aos dezenove genótipos testados, permitem dizer que em todos houve manifestação da podridão negra da raiz e colo causa da por *M. phaseolina*. Entretanto, foi possível detectar dife - renças na reação dos genótipos de girassol, no estágio de plântulas, em condições sub-ótimas de temperatura, baixa umidade do solo e controle do nível de inóculo.

A manifestação da doença causada por *M. phaseoli* na, em todos os genótipos testados, nessas condições, demonstra a existência da resistência quantitativa e poligênica, geralmen te comum, para patógenos pouco especializados como no caso de *M. phaseolina*, segundo (ROBINSON, 1973).

De fato WALKER (1965), relata que em testes para seleção de variedade resistentes, quando resistência horizontal está envolvida, condições sub-ótimas de temperatura e controle de nível de inóculo são desejáveis.

Esses resultados coincidem com aqueles obtidos por MACHADO (1980), no que se refere à viabilidade do método de inoculação com suspensão de conídios de *M. phaseolina*, em 10 cultivares de soja, para testes de resistência varietal.

Uma visão geral das diferenças na reação dos genótipos de girassol à inoculação por *M. phaseolina* no estágio

de plântulas, com relação à percentagens de plantas mortas, pode ser observada na Figura 1.

Percebe-se claramente que três níveis de resistência foram discriminados entre os dezenove genótipos testados pelo teste χ^2 frente à inoculação por *M. phaseolina* (Figura 1): resistentes, suscetíveis e medianamente resistentes. Os resultados levam a concluir que as cultivares suscetíveis apresentaram uma alta percentagem de plantas mortas, diferindo significativamente dos genótipos resistentes, cujo número de plantas mortas foi baixo e, diferindo ainda, dos medianamente resistentes, que apresentaram um número intermediário de mortalidade.

4.4. Efeito da concentração de inóculo de *M. phaseolina* na reação de cinco diferentes genótipos de girassol

Na Tabela 5 são apresentados os dados obtidos neste experimento.

As médias apresentadas na Tabela 5, mostram que as concentrações 0 e 1×10^4 conídios/ml não diferem entre si, porém diferem das concentrações 1×10^5 e 1×10^6 conídios/ml que por sua vez não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 20 - Estruturação do teste de χ^2 aos dados de estiagens referentes à cidade de Avaré, SP.
 $F(x)$: Função de Distribuição Lognormal.

i	nº de dias secos consecutivos [a, b)	frequência ocorrida na classe: f _i	$\Pi_i = F(b) - F(a)$	frequência esperada na classe: nΠ _i	$\frac{(f_i - n\Pi_i)^2}{n\Pi_i}$
1	< 25	8	0,235336	9,4134	0,212219
2	[25, 30)	9	0,139434	5,5774	2,100296
3	[30, 35)	6	0,133511	5,3404	0,081468
4	[35, 45)	5	0,209098	8,3639	1,352936
5	[45, 65)	8	0,199770	7,9908	0,000011
6	≥ 65	4	0,082850	3,3140	0,142002
$\chi^2 = \sum_{i=1}^6 \frac{(f_i - n\Pi_i)^2}{n\Pi_i} = 3,888932$					

$$n = 40 \quad ; \quad F(a) = \int_0^a \frac{1}{x \, s \, \sqrt{2\pi}} \, e^{-[(\ln x - \hat{m})^2 / 2s^2]} \, dx \quad ; \quad \hat{m} = 3,545936 \quad ; \quad s = 0,453378$$

Dentre as concentrações da suspensão de conídios de *M. phaseolina* utilizada neste experimento (Tabela 5), a de 1×10^6 conídios/ml foi a mais adequada para a cultivar IDS-2, pois o número de plantas que sobreviveram em relação à testemunha foi estatisticamente significativo. Para a variedade Contisol 422, a concentração 1×10^5 conídios/ml foi a mais apropriada, pois o número de plantas sobreviventes neste tratamento diferiu significativamente da testemunha, não diferindo, entretanto, das concentrações 1×10^4 e 1×10^6 conídios/ml. A linhagem RHA-298 apresentou uma redução significativa no número de plantas sobreviventes na concentração 1×10^5 conídios/ml, sendo que esta concentração não diferiu da 1×10^4 e 1×10^6 conídios/ml. A concentração 1×10^5 conídios/ml foi a que conseguiu reduzir o número de plantas sobreviventes em relação à testemunha na variedade Contisol 711. Esta concentração não diferiu da 1×10^6 conídios/ml, mas ambas diferiram da testemunha e da 1×10^4 conídios/ml. A variedade DK-170 não apresentou diferenças significativas entre as diversas concentrações do inóculo empregadas. Isto significa que a quantidade de inóculo em nenhuma das concentrações foi eficiente para reduzir o número das plantas inoculadas em relação à testemunha.

Os resultados obtidos no presente trabalho, no que diz respeito à cultivar IDS-2, coincidem com as observações de MACHADO (1980) em estudos sobre o efeito da concentração de inóculo de *M. phaseolina* na reação de quatro diferentes hospe-

deiros: feijão, soja, sorgo e milho, de vez que, 1×10^6 conídios/ml foi a mais adequada para selecionar cultivares resistentes em qualquer um dos hospedeiros testados e GAUMANN (1950), relata que variando-se a concentração de inóculo, podem-se descrever níveis de resistência pelo critério do limiar numérico de infecção.

Segundo MACHADO (1980), a concentração de conídios utilizada na inoculação deverá ser tal que proporcione uma diferença em relação à testemunha que seja desejável e estatisticamente detectável. Por outro lado não deverá ser excessivamente alta de maneira a eliminar a totalidade das plantas inoculadas.

Assim, à medida em que se aumentou a concentração do inóculo, houve um decréscimo gradativo no número de plantas que sobreviveram entre os diferentes genótipos testados, exceto para a variedade DK-170. Pode-se, então, concluir que a cultivar DK-170, comportou-se como a mais resistente de todos os genótipos testados, seguida pelo híbrido IDS-2. A variedade Contisol 422 e a linhagem RHA-298 comportaram-se como intermediárias e, finalmente, a cultivar Contisol 711 foi a mais suscetível.

Depreende-se desse trabalho que, em relação ao comportamento dos genótipos testados no estágio de plântulas em

condições de casa-de-vegetação, e florescimento em condições de campo, os resultados se relacionam com os obtidos neste experimento para os genótipos IDS-2 e RHA-298 que, respectivamente, mostraram-se resistente e suscetível em ambos os estádios, relação esta que não foi obtida para os demais genótipos testados.

4.5. Avaliação da resistência de genótipos de girassol a *M. phaseolina* no estágio adulto em condições de campo

Observa-se, na Tabela 6, que o teste χ^2 para plantas sobreviventes e não sobreviventes, apresentou diferenças significativas ao nível de 0,1 % de probabilidade para os genótipos testados quando inoculados por *M. phaseolina*. Nota-se que os genótipos Collihway, Majak, DK-180, Anhandy, Contisol, Contisol 711, Cordobez, Contisol 422, IDS-2, DK-160, Issanka e Contisol 812 não diferem entre si em relação ao nível de resistência a *M. phaseolina*, porém diferem dos genótipos IDS-3, DK-170, C-33, Contisol 112 e CMS-HA-290, que por sua vez não diferem entre si pelo teste χ^2 ao nível de 5 % de probabilidade. As linhagens RHA-298 e 291-A diferiram de todos os genótipos pelo teste χ^2 ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que, nas condições em que o ensaio foi desenvolvido, selecionou-se cultivares de girassol resistentes a *M. phaseolina*. Dentre os genótipos testados, em condições de

campo, Collihway, Majak, DK-180, Anhandy, Contisol, Contisol 711, Cordobez, Contisol 422, IDS-2, DK-160, Issanka e Contisol 812 apresentaram um maior nível de resistência, seguidos por IDS-3, DK-170, C-33, Contisol 112 e CMS-HA-290, medianamente resistentes. Os mais suscetíveis foram as linhagens 291-A e RHA-298.

É interessante verificar que a frequência esperada de plantas não sobreviventes foi maior que a observada nos ge

Tabela 6 - Teste χ^2 para plantas sobreviventes e não sobreviventes dos dezoito genótipos de girassol inoculadas com *M. phaseolina* no estágio adulto em condições de campo.

Genótipos	S	NS	Total
IDS-2	32(30,23)*	2(3,77)*	34
RHA-298	19(28,45)	13(3,55)	32
CMS-HA-290	30(31,12)	5(3,88)	35
Contisol 711	51(47,12)	2(5,88)	53
IDS-3	47(48,01)	7(5,99)	54
291-A	15(41,79)	32(5,21)	47
Contisol 112	34(34,67)	5(4,33)	39
Majak	50(45,34)	1(5,66)	51
Contisol 422	52(48,90)	3(6,10)	55
Collihway	45(40,01)	0(4,99)	45
DK-170	36(36,45)	5(4,55)	41
C-33	38(38,23)	5(4,77)	43
Cordobez	39(35,56)	1(4,44)	40
Contisol	37(35,56)	3(4,44)	40
DK-180	53(48,01)	1(5,99)	54
DK-160	44(40,90)	2(5,10)	46
Issanka	37(34,67)	2(4,33)	39
Anhandy	54(48,90)	1(6,10)	55
Contisol 812	33(32,00)	3(4,00)	36
Total	746	93	839

χ^2 = 216,13*** (18 G.L.). *** Indicam significância a 0,1 %

χ^2 (5 %) = 28,87; χ^2 (1 %) = 34,80; χ^2 (0,1 %) = 42,31.

S = Plantas que sobreviveram ao final do experimento.

NS = Plantas não sobreviventes ao final da avaliação.

* = frequência esperada.

nótipos resistentes a *M. phaseolina*, o que não ocorreu com os medianamente resistentes e suscetíveis. Isto provavelmente, se deve ao fato de que esperava-se maior número de plantas mortas devido a podridão negra da raiz e colo no final do ciclo da cultura, nestes genótipos resistentes.

É conveniente ressaltar também, que em todos os genótipos testados à inoculação por *M. phaseolina*, no estágio adulto, em condições de campo, ocorreu os sintomas da podridão negra da raiz e colo. Entretanto, segundo ALABOUVETTE e BREMEERSCH (1975), as diferenças no comportamento varietal só se manifestam quando as condições climáticas de temperatura e umidade favorecem a doença. HSI (1961), recomenda trabalhar nestas condições para testar a resistência de variedades de sorgo a *M. phaseolina*. Temperaturas elevadas, que variem entre 30 e 35°C, e baixa umidade do solo tornam as plantas sensíveis ao patógeno e favorecem a expressão dos sintomas, principalmente quando nos estádios de florescimento e formação das sementes (WYLLIE e CALVERT, 1969).

• Na Figura 2 observam-se as variações ocorridas quanto aos níveis de resistência nos diferentes genótipos testados à inoculação por *M. phaseolina* no estágio adulto, em relação à percentagem de plantas mortas.

Pelo que se depreende desse trabalho, verifica-se que três níveis de resistência foram determinados à semelhança

Figura 2 - Percentagem de plantas mortas em dezenove genótipos de girassol, inoculadas por *M. phaseolina* no estágio de florescimento.

da seleção feita no estágio de plântulas, em casa-de-vegetação. Percebe-se que a percentagem de plantas mortas nas linhagens suscetíveis, RHA-298 e 291-A foi muito maior que nos genótipos medianamente resistentes diferindo significativamente pelo teste χ^2 . Os genótipos resistentes se caracterizaram por apresentar um pequeno número de plantas mortas constatando diferenças significativas ao nível de 0,1 % pelo χ^2 (Tabela 6) dos genótipos medianamente resistentes e suscetíveis.

Nas condições em que os dezenove genótipos de girassol foram avaliados, no estágio de plântulas e de florescimento, os resultados obtidos permitiram agrupar os diferentes níveis de resistência (Tabela 7). Assim, as cultivares Majak, IDS-2, Contisol 422 e Contisol apresentaram um alto nível de resistência tanto no estágio de plântulas, em casa-de-vegetação e na fase adulta, em condições de campo. Para as cultivares DK-170 e C-33, medianamente resistentes em ambos estádios, e as linhagens RHA-298 e 291-A, a correlação foi em suscetibilidade.

Embora o comportamento dos demais genótipos não tenha sido o mesmo para os dois estádios da cultura pode-se dizer que, para alguns deles como Collihway, DK-180, Anhandy, Cordobez, DK-160, Contisol 812, IDS-3, CMS-HA-290 e Contisol 112, apresentaram-se proximamente correlacionados quando inoculados em estágio de plântulas e no de formação de botão floral. Estes resultados sugerem que trabalhos de melhoramento poderão ser acelerados pela seleção precoce, quando se utilizar estes genótipos.

Tabela 7 - Agrupamento de dezenove genótipos, em dois estádios da cultura segundo o grau de resistência.

Níveis de resistência	Estádios da cultura	
	Plântula (1)	Florescimento (2)
Resistentes	IDS-2 Majak Contisol 422 Contisol CMS-HA-290 IDS-3	IDS-2 Majak Contisol 422 Contisol Collihway Cordóbez DK-180 DK-160 Anhandy Contisol 711 Issanka Contisol 812
Medianamente resistentes	DK-170 C-33 Cordóbez DK-180 DK-160 Anhandy Contisol 812 Collihway	DK-170 C-33 Contisol 112 CMS-HA-290 IDS-3
Suscetíveis	RHA-298 291-A Contisol 711 Contisol 112 Issanka	RHA-298 291-A

(1) Plântulas inoculadas com uma suspensão de 1×10^5 conídios/ml no plantio.

(2) Plantas inoculadas com sementes de sorgo, em média, colonizadas pelo patógeno no estágio de formação do botão floral.

4.6. Ocorrência de *M. phaseolina* em sementes de dezenove genótipos de girassol

Os dados obtidos neste experimento são apresentados na Tabela 8.

Analisando estes dados verifica-se que as sementes de cultivares que, embora resistentes quando avaliadas em condições de campo, foram capazes de transportar *M. phaseolina* (Collihway-0,5 %; IDS-2-1,5% e Contisol-1,0%).

Os genótipos medianamente resistentes, IDS-3 com 1,5 % e Contisol112, 3,5%, apresentaram um índice maior que os resistentes. A linhagem RHA-298 com 0,5 %, embora suscetível, apresentou uma pequena incidência de *M. phaseolina* nas sementes.

O fato da linhagem suscetível apresentar baixa percentagem (%) de *M. phaseolina* nas sementes, pode ser explicado pelos sintomas drásticos ocorridos nessas plantas no campo, uma vez que nem todas as sementes provenientes dessas, puderam ser aproveitadas.

Tabela 8 - Incidência de *M. phaseolina* em sementes de girassol, determinadas pelo método de papel de filtro com congelamento. (Dados em %).

Níveis de resistência(2)	Genótipos	Método do papel de filtro com congelamento (1)	
		sem assepsia	com assepsia
Resistentes	Majak	-	-
	Collihway	-	0,5
	DK-180	-	-
	Contisol 711	-	-
	Cordobez	-	-
	Anhandy	-	-
	Contisol 812	-	-
	IDS-2	-	1,5
	Contisol 422	0,5	-
	Contisol	-	1,0
	DK-160	-	-
	Issanka	-	-
Medianamente resistentes	CMS-HA-290	-	-
	IDS-3	-	1,5
	Contisol 112	1,5	3,5
	DK-170	-	-
	C-33	-	-
Suscetíveis	291-A	-	-
	RHA-298	-	0,5

(1) Amostras de 200 sementes por genótipos.

(2) Avaliação realizada no experimento conduzido entre os meses de março a julho/85.

As médias apresentadas na Tabela 9 mostram que a cultivar Contisol 112 foi a que apresentou maior incidência de *M. phaseolina* nas sementes diferindo significativamente das demais pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Os genótipos Contisol 812, Anhandy, Issanka, DK-160, DK-180, Contisol, Cordobez, C-33, DK-170, Collihway, Contisol 422, Majak, 291-A, IDS-3, Contisol 711, CMS-HA-290 e RHA-298 também não diferem significativamente entre si, mas apresentaram diferenças

Tabela 9 - Influência da inoculação de *M. phaseolina* no estádio adulto, em condições de campo, nas sementes de girassol (Dados transformados em arc seno $\sqrt{x + 0,5}$)

Genótipos	Método do papel de filtro(1)		Média (2)
	com assepsia	sem assepsia	
IDS-2	9,83ab	0,00 b	4,91 b
RHA-298	2,88 cd	0,00 b	1,44 bc
CMS-HA-290	0,00 d	0,00 b	0,00 c
Contisol 711	0,00 d	0,00 b	0,00 c
IDS-3	6,99 bc	0,00 b	3,49 bc
291-A	0,00 d	0,00 b	0,00 c
Contisol 112	15,04a	6,99a	11,01a
Majak	0,00 d	0,00 b	0,00 c
Contisol 422	0,00 d	4,06ab	2,03 bc
Collihway	2,88 cd	0,00 b	1,44 bc
DK-170	0,00 d	0,00 b	0,00 c
C-33	0,00 d	0,00 b	0,00 c
Cordobez	0,00 d	0,00 b	0,00 c
Contisol	6,94 bc	0,00 b	3,47 bc
DK-180	0,00 d	0,00 b	0,00 c
DK-160	0,00 d	0,00 b	0,00 c
Issanka	0,00 d	0,00 b	0,00 c
Anhandy	0,00 d	0,00 b	0,00 c
Contisol 812	0,00 d	0,00 b	0,00 c

DMS = 6,77998631

(1) Amostras de 200 sementes por genótipo.

(2) Valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente segundo o teste de Tukey a 5 % de probabilidade, para genótipos e genótipos dentro dos métodos.

estatísticas do híbrido IDS-2, que por sua vez, não diferiu dos genótipos RHA-298, IDS-3, Contisol 422, Collihway e Contisol.

Com relação aos métodos empregados, o com assepsia superficial detectou maior incidência de *M. phaseolina* nas sementes que o sem assepsia. No entanto, este último mostrou-se sensível para a detecção do patógeno nas sementes das cultivares Contisol 112 e Contisol 422, que por sua vez, não apresentaram diferenças estatísticas dos demais genótipos.

Os resultados obtidos no presente trabalho, no que se refere a ocorrência de *M. phaseolina* nas sementes de diferentes genótipos de girassol, mostram que a cultivar Contisol 112 se mostrou a mais sensível à infecção seguida pelos genótipos IDS-2, RHA-298, IDS-3, Contisol 422, Collihway e Contisol, medianamente sensíveis, enquanto que os demais não se apresentaram infectados.

Embora as pesquisas sobre *Macrophomina phaseolina* associadas às sementes de girassol, sejam raras, em outras culturas já foram constatadas diferenças entre genótipos quanto a incidência de fungos nas sementes. BARROS et alii (1985), encontraram cerca de 28,7 % de *M. phaseolina* associado às sementes de 34 cultivares de feijão macassar, procedentes de 8 municípios de Pernambuco. Os autores também encontraram nas cultivares testadas, três níveis de sensibilidade ao fungo presentes

nas sementes, mostrando-se patogênico a estas. O estudo desses pesquisadores ressalta que mesmo em condições favoráveis a *M. phaseolina*, as sementes de algumas cultivares não mostraram a presença do patógeno mencionado e que um provável mecanismo de resistência destes genótipos em relação ao fungo citado ocorreu.

Os resultados obtidos neste trabalho coincidem com os de BARROS et alii (1985), de vez que as sementes de alguns genótipos de girassol testados responderam diferentemente à infecção por *M. phaseolina*.

4.7. Reação de linhagem de girassol a *M. phaseolina* no estágio de plântulas.

Embora o teste F tenha sido significativo ao nível de 1 % de probabilidade, o teste Tukey não acusou diferenças significativas entre as médias de linhagens. Isto pode ser explicado pelo fato do teste Tukey ser específico para comparações pareadas, enquanto que o teste F leva em consideração combinações lineares de tratamentos. Além disso, o valor calculado do teste F está próximo do valor de tabela. Julgou-se, portanto, não ser necessário incluir a tabela de médias das linhagens.

O teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade , aplicado às médias, apresentadas na Tabela 10 , mostra que as linhagens dos grupos PO DB, PI GB, PII IDR, PERG-4, 6B x ILNISSEI e CORD, não diferem entre si em relação ao nível de resistência a *M. phaseolina*, porém diferem do grupo PI IDR, que por sua vez não difere das linhagens do grupo PII IDR, PERG-4, 6B x ILNISSEI e CORD.

Tabela 10- Capacidade de sobrevivência de sete grupos de linhagens de girassol inoculadas com suspensão de conídios de *M. phaseolina* no estágio de plântulas. (Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$).

Grupos de linhagem	Nº de repetições (1)	Médias (2)
PO DB	12	6,68 a
PI GB	34	6,43 a
PII IDR	4	6,05 ab
PERG-4	44	5,55 ab
6B x ILNISSEI	8	5,42 ab
CORD	4	5,01 ab
PI IDR	4	4,89 b

(1) Total de 110 repetições, cada uma representada por um vaso contendo 4 plantas.

(2) Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente segundo o teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Os resultados obtidos neste experimento, no que se refere a 55 linhagens testadas, pertencentes a 7 grupos de diferentes origens, indicam que em todos manifestou-se a podridão negra da raiz e colo causada por *M. phaseolina*. Foi possível, no entanto, detectar diferenças na reação entre os 7 grupos de linhagens de girassol, no estágio de plântulas em condições sub-ótimas de temperatura, baixa umidade do solo e controle do nível de inóculo, encontrando-se dois níveis de resistência a *M. phaseolina*.

Embora, os dados sobre a resistência varietal de girassol à queima cinzenta da haste causada por *Macrophomina phaseolina*, no estágio de plântulas sejam escassos, há o trabalho de ISSA (1985), em feijoeiro onde o autor relata que entre nove variedades testadas no estágio de plântulas, encontraram-se três níveis de resistência, o que vem corroborar com MACHADO (1980) no que se refere a alta suscetibilidade de variedades de feijoeiro testadas a *M. phaseolina*.

De fato, MALAVOLTA et alii (1982), em trabalhos sobre avaliação da resistência de algumas cultivares de feijoeiro ao fungo *Macrophomina phaseolina*, os autores concluem que as nove variedades testadas apresentaram dois níveis de resistência à ação do fungo.

É possível que, com relação aos grupos de linhagem de girassol testadas de diferentes origens, a herança da resistência seja do tipo citoplasmática ou maternal. Levanta-se pois, a hipótese de que algum fator extra cromossômico seja responsável pela resistência dessas linhagens.

4.8. Comportamento de genótipos de girassol a *M. phaseolina* no estágio adulto, em condições de campo

Observa-se, na Tabela 11, que o teste χ^2 para plantas sobreviventes e não sobreviventes apresentou diferenças significativas ao nível de 0,1 % de probabilidade para os genótipos testados quando inoculados por *M. phaseolina*.

O desdobramento dos dados, através do teste χ^2 , mostrou que os genótipos IDS-2, Contisol 112, Cordebez, Contisol, DK-160 e Contisol-812 não diferem entre si em relação ao nível de resistência a *M. phaseolina*, porém diferem de CMS-HA-290, Contisol 711, IDS-3, Contisol 422, DK-180, DK-170, C-33, Issanka e Anhandy que por sua vez não diferem entre si pelo teste χ^2 ao nível de 5 % de probabilidade. As linhagens RHA-298 e 291-A diferiram de todos os genótipos pelo teste χ^2 ao nível de 5 %.

Depreende-se deste experimento que em todos os genótipos testados houve manifestação da podridão negra da raiz

Tabela 11 - Teste χ^2 para plantas sobreviventes e não sobreviventes dos dezessete genótipos de girassol inoculados com *M. phaseolina* no estágio adulto em condições de campo.

Genótipos	S	NS	Total
IDS-2	41 (26,42)*	4 (18,58)*	45
RHA-298	0 (16,44)	28 (11,56)	28
CMS-HA-290	27 (27,59)	20 (19,41)	47
Contisol 711	17 (26,42)	28 (18,58)	45
IDS-3	25 (26,42)	20 (18,58)	45
291-A	0 (25,25)	43 (17,75)	43
Contisol 112	36 (26,42)	9 (18,58)	45
Contisol 422	23 (25,25)	20 (17,78)	43
DK-170	23 (26,42)	22 (18,58)	45
C-33	29 (26,42)	16 (18,58)	45
Cordobez	35 (26,42)	10 (18,58)	45
Contisol	35 (26,42)	10 (18,58)	45
DK-180	23 (26,42)	22 (18,58)	45
DK-160	37 (26,42)	8 (18,58)	45
Issanka	27 (26,42)	18 (18,58)	45
Anhandy	22 (26,42)	23 (18,58)	45
Contisol 812	38 (26,42)	7 (18,58)	45
Total	438	308	746

χ^2 = 178,33***(16 G.L.); *** Indicam significância a 0,1 %.

χ^2 (5 %) = 26,30; (1 %) = 32,00; χ^2 (0,1 %) = 39,25

S = Plantas que sobreviveram ao final do experimento.

NS = Plantas não sobreviventes ao final da avaliação.

* = frequência esperada.

e colo causada por *M. phaseolina*. Entretanto, foi possível detectar diferenças na reação de genótipos de girassol no estágio adulto, em condições de campo. Os genótipos IDS-2, Contisol 112, Cordobez, Contisol, DK-160 e Contisol 812 apresentaram um maior nível de resistência, seguidos por CMS-HA-290, Contisol 711, IDS-3, Contisol-422, DK-180, DK-170, C-33, Issanka e Anhandy, medianamente resistentes. Os mais suscetíveis foram as linhagens 291-A e RHA-298.

Uma análise da Tabela 11 mostra ainda, que a frequência esperada de plantas não sobreviventes foi maior que a observada nos genótipos resistentes a *M. phaseolina*, o que não ocorreu com os medianamente resistentes ou mesmo suscetíveis. Isto significa que esperava-se maior número de plantas mortas devido à doença no final do ciclo da cultura, nestes genótipos resistentes.

Os resultados obtidos no presente trabalho coincidem com as observações de ORELHANA (1970), MIRZA et alii (1982) e ACIMOVIC (1964), de vez que as linhagens 291-A e RHA-298, que se comportaram como suscetíveis no campo, se apresentaram como precoces em sua maturidade. IDS-2, Contisol 112, Cordobez, Contisol, DK-160, Contisol 812, de ciclo tardio, mostraram-se resistentes e os genótipos CMS-HA-290, Contisol 711, IDS-3, Contisol 422, DK-180, DK-170, C-33, Issanka e Anhandy, semi tardios foram medianamente resistentes.

É interessante apontar que, neste experimento, à semelhança do de avaliação de resistência de dezenove genótipos de girassol no estágio adulto, em condições de campo, três níveis de resistência dentre os dezessete genótipos de girassol testados foram detectados. No entanto, a pesquisa de ALABOUVETTE e BREMEERCH (1975) salienta que os diferentes graus de resistência a *M. phaseolina* só se manifestam quando as condições de temperatura e umidade forem próprias à ocorrência da doença. Estas condições devem prevalecer em alguns estádios da cultura principalmente nos estádios de florescimento e formação das sementes (WYLLIE e CALVERT, 1969).

Observa-se na Figura 3, as diferenças no comportamento de dezessete genótipos de girassol, testados frente à inoculação por *M. phaseolina* no estágio adulto em condições de campo, em relação a percentagem de plantas mortas.

Percebe-se ainda, que a percentagem de plantas mortas nas linhagens suscetíveis RHA-298 e 291-A foi total, diferindo estatisticamente, pelo teste χ^2 dos genótipos medianamente resistentes e resistentes.

Embora a metodologia usada neste experimento tenha sido idêntica em relação ao estudo realizado em condições de campo, de dezenove genótipos de girassol, avaliados quanto à resistência a *M. phaseolina*, exceto para a quantidade de sementes de sorgo colonizadas pelo patógeno utilizadas na inocula

Figura 3 - Percentagem de plantas mortas em dezessete genótipos de girassol, inoculadas por *M. phaseolina* no estágio de florescimento.

ção, que foi de 90 sementes em média para este ensaio, observou-se que alguns genótipos se comportaram diferentemente quanto aos níveis de resistência encontrados. Isto, provavelmente, se deve ao fato das diferentes épocas em que ambos os ensaios foram realizados. O primeiro deles, seleção para resistência de dezenove genótipos de girassol, inoculados com 40 sementes de sorgo colonizadas pelo patógeno, foi realizado de março a julho/85, enquanto a condução deste foi feita entre os meses de outubro/85 a janeiro/86. Além disso, o solo pode ter influenciado nas diferenças de comportamento varietal, de vez que o local utilizado para este experimento foi diferente do anterior, embora ambos tenham sido realizados em campos do Departamento de Fitopatologia da ESALQ.

Na Tabela 12, nota-se que os genótipos IDS-2, Contisol 812, Contisol, Cordobez e DK-160 foram semelhantes em relação ao nível de resistência quando avaliados nas duas épocas. Os medianamente resistentes, CMS-HA-290, C-33, DK-170 e IDS-3, comportaram-se igualmente quando avaliados nos dois ensaios e o mesmo ocorreu para os genótipos suscetíveis.

Na Tabela 13, nota-se que em alguns genótipos foi possível agrupar os três níveis de resistência encontrados no estágio de plântulas, em casa-de-vegetação com o de florescimento, em condições de campo. Os genótipos IDS-2 e Contisol apresentaram um alto nível de resistência tan-

Tabela 12 - Agrupamento de genótipos de girassol avaliados em duas épocas, segundo o grau de resistência.

Níveis de resistência	Estádio de florescimento	
	março a julho/85 (1)	outubro/85 a janeiro/86 (2)
Resistentes	IDS-2	IDS-2
	Contisol 812	Contisol 812
	Contisol	Contisol
	Cordobez	Cordobez
	DK-160	DK-160
	Contisol 422	Contisol 112
	DK-180	
	Anhandy	
	Contisol 711	
	Issanka	
Medianamente	CMS-HA-290	CMS-HA-290
Resistentes	C-33	C-33
	DK-170	DK-170
	IDS-3	IDS-3
	Contisol 112	Issanka
		Contisol 422
		DK-180
		Anhandy
		Contisol 711
Suscetíveis	RHA-298	RHA-298
	291-A	291-A

(1) Plantas inoculadas no estágio de formação do botão floral com 40 sementes de sorgo, em média, colonizada por *M. phaseolina*.

(2) Plantas inoculadas no estágio de formação do botão floral com 90 sementes de sorgo, em média, colonizadas por *M. phaseolina*.

Tabela 13 - Agrupamento de dezessete genótipos em dois estádios da cultura segundo o grau de resistência.

Níveis de resistência	Estádio da cultura	
	Plântula (1)	Florescimento (2)
Resistentes	IDS-2	IDS-2
	Contisol	Contisol
	Contisol 422	Contisol 812
	CMS-HA-290	DK-160
	IDS-3	Contisol 112
		Cordobez
Medianamente resistentes	DK-170	DK-170
	C-33	C-33
	DK-180	DK-180
	Anhandy	Anhandy
	DK-160	CMS-HA-290
	Cordobez	Contisol 422
	Contisol 812	Contisol 711
		IDS-3
Suscetíveis		Issanka
	RHA-298	RHA-298
	291-A	291-A
	Contisol 711	
	Contisol 112	
	Issanka	

(1) Plântulas inoculadas com uma suspensão de 1×10^5 conídios/ml no plantio.

(2) Plantas inoculadas com 90 sementes de sorgo, em média, colonizadas pelo patógeno, no estágio de formação do botão floral.

to no estágio de plântulas como no de florescimento. As cultivares DK-170, C-33, DK-180 e Anhandy medianamente resistentes em ambos estádios e para as linhagens RHA-298 e 291-A, a correlação foi em suscetibilidade.

Embora para os demais genótipos a correlação visual entre os dois estádios da cultura não tenha ocorrido, para a maioria deles também, a seleção precoce em trabalhos de melhoramento poderão ser acelerados, de vez que estes se apresentaram proximamente correlacionados.

4.9. Incidência de *M. phaseolina* em sementes de dezessete genótipos de girassol

Embora a metodologia utilizada neste experimento tenha sido semelhante a de ocorrência de *M. phaseolina* em sementes de dezenove genótipos de girassol, conduzido entre os meses de março a julho/85, exceto ao que se refere ao método sem assepsia empregado, o qual não foi utilizado neste ensaio, a percentagem de sementes com *M. phaseolina* foi muito baixa, além do fungo não ocorrer em todas as amostras.

As diferenças na ocorrência de *M. phaseolina* nas sementes provenientes dos experimentos de campo podem ter sido determinadas pelas diferentes condições climáticas reinantes durante as épocas em que foram conduzidos, em concordância com os resultados obtidos por RAUT (1963), quer seja influenciando os

mecanismos de contato entre patógeno e semente, ou as próprias condições de "stress" da planta mãe. Julgou-se, portanto, desnecessário realizar a análise de variância dos dados obtidos, uma vez que o nível de significância seria nulo

4.10. Deteção de *M. phaseolina* em sementes de quatro genótipos de girassol

Os dados obtidos neste experimento são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Deteção de *M. phaseolina* em sementes de girassol incubadas sob luz alternada e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Genótipos	Repetições (2)				Média (1)
	1	2	3	4	
Contisol 711	0*	4	0	0	1,0 a
IDS-2	0	4	4	0	2,0 a
Cordobez	0	0	0	0	0,0 a
291-A	0	0	0	0	0,0 a

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

(2) Cada repetição constou de 50 sementes.

* Porcentagem (%) de sementes com *M. phaseolina*.

Normalmente, para testes de patologia de sementes, utiliza-se temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ onde as sementes são incubadas por 7 a 8 dias, sob ciclos alternadas de luz e escuro de 12 horas. Nesta faixa de temperatura há possibilidade de uma melhor esporulação para a grande maioria dos fungos. Entretanto, a recuperação de *M. phaseolina* das sementes segundo o método utilizado, foi muito baixa e insuficiente para discriminar os genótipos testados (Tabela 15). Dessa forma, propôs-se mudar as condições de incubação, na tentativa de obter melhores resultados. Um novo ensaio foi instalado usando-se uma fonte de luz fornecida por 4 lâmpadas fluorescentes brancas de 40 watts e temperatura de 30°C constantes.

Tabela 15 - Detecção de *M. phaseolina* em sementes de girassol incubadas sob luz contínua e temperatura de 30°C .

Genótipos	Repetições (2)				Médias (1)
	1	2	3	4	
Contisol 711	6*	8	2	6	5,5 a
IDS-2	2	2	2	0	1,5 b
Cordobez	0	0	0	0	0,0 c
291-A	0	0	0	0	0,0 c

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente, segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

(2) Cada repetição constou de 50 sementes.

* Porcentagem (%) de sementes com *M. phaseolina*.

Os resultados obtidos mostram que a recuperação de *M. phaseolina* das sementes foi maior na cultivar Contisol 711, seguida do híbrido IDS-2 e nula nas sementes dos genótipos Cordobez e 291-A (Tabela 15).

MACHADO (1980), cita que para obtenção de abundante esporulação de *M. phaseolina* é importante considerar fatores ambientes como regime de luz contínua. DHINGRA e SINCLAIR (1978), relatam que *M. phaseolina* é considerado um patógeno que se desenvolve melhor em temperaturas elevadas, sendo o ótimo para o aumento da severidade da doença em torno de 28°C e 35°C.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- . Para induzir a formação de maior número de conídios de *M. phaseolina* de girassol, o nível de 45 g de farinha de soja em 1 000 ml de água e o período de 7 dias de incubação sob luz contínua, foram os mais adequados.
- . Selecionou-se plantas de girassol resistentes a *M. phaseolina* no estágio juvenil e no de florescimento, obtendo-se três níveis de resistência.
- . Foi possível agrupar alguns genótipos de girassol no estágio de plântulas e de florescimento, segundo o grau de resistência.

- . Constatou-se a incidência de *M. phaseolina* em sementes de genótipos de girassol, incubadas durante 7 dias, sob luz branca contínua e temperatura constante de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Não houve relação entre níveis de resistência dos genótipos de girassol selecionados na fase adulta e incidência de *M. phaseolina* nas sementes.

- . Registrou-se dois níveis de resistência a *M. phaseolina* quando as linhagens de girassol avaliadas no estágio de plântulas foram analisadas em grupos, de acordo com a origem, sendo provável que a herança da resistência seja do tipo citoplasmática ou maternal.

LITERATURA CITADA

- ACIMOVIC, M., 1964. The occurrence of *Sclerotium bataticola* Taub. on some agricultural crops and morphological and ecological properties of the parasite. Savr. Poljopr. 12: 55-56. Apud An Annotated Bibliography of *Macrophomina phaseolina* 1905-1975. p.1, 1977.
- ALABOUVETTE, C. e P. BREMEERSCH, 1975. Deux maladies nouvelles en France dans les cultures de Tournesol. Comptes Rendus des Seances de L'Academie d'Agriculture de France, 61(11): 626 - 636.
- ALMEIDA, A.M.R.; C.C. MACHADO e M.C.C. MACHADO, 1981. Doenças do girassol: descrição de sintomas e metodologia para levantamento. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 24 p. (Circular Técnica, 6).

- BARROS, S.T.; M. MENEZES; M.J. FERNANDES e N.P. LIRA, 1985. Fungos associados às sementes de 34 cultivares de feijão macassar *Vigna unguiculata* no Estado de Pernambuco, Brasil. Fitopatologia Brasileira. Brasília, 10: 85-95.
- BERGAMIN FILHO, A. e H. KIMATI, 1978. Variedades Resistentes. In: GALLI, F.; H. TOKESHI; P.C.T. CARVALHO; E. BALMER; H. KIMATI; C.O.N. CARDOSO; C.L. SALGADO; T.L. KRÜGNER; E.J.B. N. CARDOSO e A. BERGAMIN FILHO, Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos, 2ª ed. São Paulo, Ceres, v. 1, Cap. 17, p. 297-324.
- BERGAMIN FILHO, A., 1978. Análise Matemática de Epidemias. In: GALLI, F.; H. TOKESHI; P.C.T. CARVALHO; E. BALMER; H. KIMATI; C.O.N. CARDOSO; C.L. SALGADO; T.L. KRÜGNER; E.J.B.N. CARDOSO e A. BERGAMIN FILHO, Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos, 2ª ed. São Paulo, Ceres, v. 1, Cap. 13, p. 242-256.
- BITANCOURT, A.A., 1935. Uma nova doença do feijão. O Biológico. São Paulo, 1:41.
- BLANCO-LÓPEZ, M.A. e R.M. JIMÉNEZ-DÍAZ, 1983. Effect of irrigation on susceptibility of sunflower to *Macrophomina phaseoli*. Plant Disease. St.Paul, 67: 1214-1217.

- DHINGRA, O.D. e J.B. SINCLAIR, 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 166 p.
- EDMUNDS, L.K., 1964. Combined relation of plant maturity, temperature and soil moisture to charcoal stalk rot development in grain sorghum. Phytopathology. Lancaster, 54:514-517.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1983. Indicações técnicas para o cultivo do girassol. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 40 p. (Documentos CNPSO, 3).
- FAKIR, G.A.; M.H. RAO e M.J. THIRUMALACHAR, 1976. Seed transmission of *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease Reporter. Washington, 60: 736-737.
- FIGUEIREDO, M.B.; J. TERANISHI e R.M.G. CARDOSO, 1969. Incidência de *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ash., (*Rhizoctonia bataticola* Taub.) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e outras plantas cultivadas. O Biológico. São Paulo, 35: 105 - 109.
- FRESA, R., 1965. *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby. Buenos Aires, Secretaria do Estado de Agricultura y Ganaderia de la Nacion - INTA. 28 p. (Curso de Fitopatologia para Graduados. Apuntes de classe nº 31).

- GAUMANN, E., 1950. Principles of Plant Infection. London, Crosby Lockwood. 543 p.
- GHAFFAR, A. e G.A. ZENTMYER, 1968. *Macrophomina phaseolina* on some new weed hosts in California. Plant Disease Reporter. Washington, 52: 223.
- HAWKER, L.E., 1967. The effect of nutrition on sporulation. In: - - - - - Physiology of fungi. London, University of London, Cap. 5, p. 133-161.
- HOMECHIN, M. e O. SONEGO, 1982. Avaliação da resistência de germoplasmas de girassol ao fungo *Macrophomina phaseolina*. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE GIRASSOL, 2, Londrina, 1982. Resultados de Pesquisa de Girassol. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, p. 40.
- HSI, C.H., 1961. An effective technique for screening sorghum for resistance to charcoal rot. Phytopathology. Lancaster, 51: 340-341.
- ISSA, E.; J.N.M. REGIS; M.L. VIEIRA; J.T. ARAÚJO e S. MIYASAKA, 1964. Primeiros estudos para produção de sementes sadias de feijão em regiões áridas do Nordeste brasileiro. Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo, 31: 21-25.

- ISSA, E., 1985. Resistência varietal em feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* L., à queima cinzenta da haste causada por *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby. O Biológico. São Paulo, 51(5): 125-127.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.; M.A. BLANCO-LÓPEZ e W.E. SASKSTON, 1983. Incidence and distribution of charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* in Spain. Plant Disease. St. Paul, 67: 1033-1036.
- JOOSTE, W.J., 1969. Infection of crops by *Rhizoctonia bataticola* as influenced by soil moisture. Phytophylactica. Pretória, 1: 15-18.
- MACHADO, C.C. e H. KIMATI, 1975. Efeito de luz na formação de picnídios de *Macrophomina phaseolina* em meio de cultura. Summa Phytopathologica. Piracicaba, 1: 65-66.
- MACHADO, C.C., 1980. Esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. e viabilidade do método de inoculação de esporos em estudos de seleção de germoplasma resistente. Piracicaba, ESALQ/USP, 66 p. (Dissertação de Mestrado).

- MALAVOLTA, JR., V.A.; V.M.A. MALAVOLTA; H. KIMATI e S. CHIBA , 1982. Avaliação da resistência de alguns cultivares de feijoeiro ao fungo *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. Summa Phytopathologica. Piracicaba, 8(1/2): 54-55.
- MATHUR, S.B. e W.E. SACKSTON, 1963. Effect of temperature and age of host on infection of sunflower by *Sclerotium bataticola*. Phytopathology. Lancaster, 53: 350 (Abstract).
- MENDES, H.C.; I.J. RIBEIRO; E. CIA e J. ABRAHÃO, 1971. Estiolamento do algodoeiro causado por *Macrophomina phaseolina* (Maubl.) Ashby. Bragantia. Campinas, 30: T.1: XLIII-XLVIII.
- MEYER, W.A.; J.B. SINCLAIR e M.N. KHARE, 1974. Factors affecting charcoal rot of soybean seedlings. Phytopathology. Lancaster, 64: 845-849.
- MIRZA, M.S.; A. BEG e A.R. KHAN, 1982. Varietal response of sunflower cultivars to charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. Pakistan Journal of Agricultural Research, 3 (3): 202-203. Apud Review of Plant Pathology. Kew, 63(12) : 525, 1984.
- ORELLANA, R.G., 1970. The response of sunflower genotypes to natural infection by *Macrophomina phaseoli*. Plant Disease Reporter. Washington, 54(10): 891-893.

- RAUT, J.G., 1983. Transmission of seed-borne *Macrophomina phaseolina* in sunflower. Seed Science and Technology. Zurich, 11: 807-814.
- REIS, A.A. dos, 1984. Girassol. S.n.t. 4 p.
- ROBINSON, R.A., 1973. Horizontal resistance. Review of Plant Pathology. Kew, 52(8): 483-501.
- SACKSTON, W.E., 1981. The sunflower crops and disease: Progress, problems, and prospects. Plant Disease. St. Paul, 65: 643-648.
- SHORT, G.E. e T.D. WYLLIE, 1978. Inoculum potencial of *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology. Lancaster, 68: 742-746.
- SIDDIQUI, M.Q.; J.F. BROWN e S.J. ALLEN, 1975. Growth stages of sunflower. Plant Disease Reporter. Washington, 59: 7-11.
- SMITH, W.H., 1969. Germination of *Macrophomina phaseoli* sclerotia as affected by *Pinus lambertiana* root exudate. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 15: 1387-1391.
- YORINORI, J.T. e M. HOMECHIN, 1982. Levantamento de doenças do girassol. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE GIRASSOL, 2, Londrina, 1982. Resultados de Pesquisa de Girassol. Londrina, EMBRAPA-CNPSO, p. 36-50.

WALKER, J.C., 1965. Use of environmental factors in screening for disease resistance. Annual Review Phytopathology. Palo Alto, 3: 197-208.

WYLLIE, T.D. e O.H. CALVERT, 1969. Effect of flower removal and pod set on formation of sclerotia and infection of *Glycine max* by *Macrophomina phaseoli*. Phytopathology. Lancaster, 59(9): 1243-1245.

ZIMMER, D.E. e J.A. HOES, 1978. Diseases. In: CARTER, J. F. ; ed. Sunflower Science and Technology. Madison, Soil Science Society of America, cap. 7, p. 225-325.