

CARLOS A. RAVA
ENGENHEIRO AGRÓNOMO

Técnico Adjunto - Subprograma de Patologia
Vegetal - C. I. A. "A. Boerger" - M. G. A.

MURCHA DO GIRASSOL INCITADA POR
Verticillium alba-atrum Reinke e Berth., 1879.
(Variabilidade do patógeno e hospedeiro)

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para obten-
ção do Grau de "Magister Scientiae"
em Fitopatologia.

PIRACICABA - SÃO PAULO
1970

CARLOS A. RAVA
Engenheiro Agrônomo

Técnico Adjunto - Subprograma de Patologia
Vegetal - C.I.A. "A. Boerger" - M.G.A.

MURCHA DO GIRASSOL INCITADA POR
Verticillium albo-atrum Reinke e Berth., 1879.
(Variabilidade do patógeno e hospedeiro)

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para ob-
tenção do Grau de "Magister Scien-
tiae" em Fitopatologia.

PIRACICABA - SÃO PAULO
- 1970 -

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos S. Schlottfeldt, Chefe do Programa Básico de Educação do IICA, pelo estímulo para a feitura da tese.

Aos Professores, Dr. Ferdinando Galli e Dr. Eric Balmer, Chefe do Departamento de Fitopatologia da ESALQ e Assistente, respectivamente, pela revisão dos originais e diversas sugestões.

Ao Eng^o Agr^o Edmundo Gastal, Especialista em Economia Agrícola do IICA, pela correção do texto em português.

Aos senhores Nelson Cabrera, Edgardo Vittori e Mario Vergara, pela ajuda nos trabalhos de inoculação.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", - pelo curso recebido.

Ao Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, pela bolsa concedida.

À Universidade da República Oriental do Uruguai, pela bolsa "Artigas" concedida.

Ao Centro de Investigações Agrícolas "Alberto Boerger", pelos materiais que permitiram o desenvolvimento do presente trabalho.

CONTEÚDO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1. Variedades de girassol (<u>Helianthus annuus</u> L.) ..	6
3.2. Isolamentos de <u>Verticillium albo-atrum</u>	6
3.3. Meios de cultura	8
3.4. Técnica de isolamento	8
3.5. Preparo do inóculo	9
3.6. Preparo das plântulas de girassol	10
3.7. Técnica de inoculação	10
3.8. Condições pós-inoculação	11
3.9. Critério de avaliação dos sintomas	11
3.10. Ensaio de inoculação e delineamento experimen- tal	12
4. RESULTADOS	13
4.1. Primeiro ensaio: Patogenicidade de 28 isolamen- tos de <u>V. albo-atrum</u> em 4 variedades de giras- sol	13
4.2. Segundo ensaio: Influência do potencial de inócu- lo dos isolamentos V-5 e V-16 nas variedades Es- tanzuela 60 e VNIIMK 8883	19
4.3. Terceiro ensaio: Efeito das inoculações simples e duplas com os isolamentos V-5 e V-16 na varie- dade VNIIMK 8883	25
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	32
7. RESUMO	34
8. SUMMARY	35
9. LITERATURA CITADA	36

1. INTRODUÇÃO

A cultura do girassol (Helianthus annuus L.) ocupa um lugar de destaque na agricultura do Uruguai. A área semeada anualmente, coloca-a no terceiro lugar das culturas agrícolas e no primeiro das oleaginosas. Os rendimentos em grão são comparativamente mais baixos que os obtidos na Argentina e no Canadá, e dêvem-se, fundamentalmente, à aplicação de práticas culturais inadequadas assim como aos numerosos problemas sanitários que apresenta.

Dentre as doenças que afetam a essa planta cultivada, a murcha ou veteado das folhas é de fundamental importância. Sua prevalência numa cultura ocasiona serios transtornos podendo produzir a morte das plantas nas infecções prematuras. No momento da floração, ocorre a sintomatologia típica do veteado das folhas e produz a maturação antecipada das plantas afetadas, com o conseqüente decréscimo no rendimento e na qualidade do grão.

O agente causal da doença é a forma microesclerocial de Verticillium albo-atrum Reinke e Berth., que produz hadromicose em numerosas espécies vegetais de interêsse econômico. Trata-se de um "parasito especializado" sensu Garrett, cuja principal fonte de inóculo é o solo, onde suas estruturas de resistência permanecem viáveis por muitos anos.

Têm-se estabelecido como método de contrôle a rotação de culturas, embora existam discordâncias no número de

anos que devem transcorrer na ausência da cultura susceptível. Ainda que esta prática deve ser recomendada aos efeitos de manter um baixo potencial de inóculo no solo, não parece constituir, por si só, um método de controle eficiente em campos com alta infestação.

O método mais econômico para o controle da doença, - seria a obtenção de variedades de girassol resistentes à murcha. Para isso, é imprescindível ensaiar algumas variedades - promissoras sob um amplo espectro do patógeno, aos efeitos de poder esclarecer a possível especialização fisiológica do fungo como, também, completar estes estudos com outros que sejam úteis para reafirmar ou ratificar essas conclusões. Entre esses últimos, inclui-se o comportamento de algumas variedades frente a diferentes potenciais de inóculo do patógeno, como assim o possível antagonismo entre isolamentos e/ou sua capacidade - de conferir ao hospedeiro imunidade adquirida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo PRESLEY (12), este fungo foi isolado pela - primeira vez na Alemanha, de plantas doentes de batata por - Reinke e Berthold em 1879, os quais o descreveram com o nome - de Verticillium albo-atrum. Alguns anos após, Klebahn em 1913 isolou um Verticillium vascular de dalias doentes e considerou o isolamento suficientemente diferente do anterior para justificar o estabelecimento de uma nova espécie, Verticillium dahliae. A principal diferença, segundo a descrição de Klebahn, parece ser a produção de microesclerócios pelo V. dahliae e a ausência destas estruturas no V. albo-atrum Reinke e Berth. Este critério foi sustentado por Van der Mer, Dufrenoy e Berkeley, Madden e Wilson, ao tempo que Carpenter, Wollenweber e Rudolph consideraram que a descrição original de Reinke e Berthold inclui ambos os tipos, já que ilustraram corpos semelhantes a microesclerócios nos seus desenhos originais.

WILLHELM et al. (26), demonstraram a influência da -

temperatura sôbre as características das colônias do tipo conidial selvagem de V. albo-atrum. As colônias que crescem a baixas temperaturas são pretas e consistem quase exclusivamente de microesclerócios, enquanto que a temperaturas maiores (25-31°C) são de cor creme claro e somente tem desenvolvimento espalhado dos microesclerócios. Concluíram que as estruturas de resistência e no particular os microesclerócios não são elementos de confiança para separar espécies.

PRESLEY (12), realizou isolamentos monospóricos de formas microesclerociais e miceliares e obteve de ambas as culturas, tanto umas que produziram como outras que não produziram microesclerócios. Portanto, êsse autor sugiere que a maioria das "formas" são simples variantes da espécie V. albo-atrum que deveria denominar-se como tal.

Não obstante, essa situação conflictual têm-se mantido até o presente; assim MARTINSON e ENGLANDER (10), distinguiram as espécies V. albo-atrum e V. dahliae pelas diferenças no crescimento em meio de cultura a altas temperaturas. A 33°C não obtiveram crescimento apreciavel do V. albo-atrum enquanto que o V. dahliae desenvolveu pequenas colônias.

Contrariamente, FORDICE e GREEN (4), induziram mutantes bioquímicos em dois isolamentos que representavam V. albo-atrum e V. dahliae; os isolamentos foram pareados e analisados para identificar heterocariontes e recombinações parasexuais. De um total de 4.600 isolamentos monospóricos, obtiveram-se 21 colônias que apresentaram características recombinantes. Concluíram que a anastomose e a recombinação parasexual entre culturas de V. albo-atrum e V. dahliae dá evidências adicionais à hipótese de que são linhagens de uma espécie única, V. albo-atrum.

SHMOTINA e GORLENKO (20), estudaram 11 isolamentos de V. albo-atrum e V. dahliae sob condições nutricionais diferentes. Constataram que os polissacarídeos glucose e maltose, jogam o papel mais importante na formação dos microesclerócios. Concluíram que as duas denominações referem-se à mesma espécie.

Das opiniões dos autores citados não se desprende que as diferenças pelas quais pretende-se estabelecer a espécie V. dahliae Kleb. sejam terminantes; portanto, no presente trabalho se considerará ao V. albo-atrum Reinke e Berth. como o agente causal da murcha ou veteado das folhas do girassol.

SACKSTON et al. (16), constataram a murcha do girassol no Canadá e fizeram a primeira referência da ocorrência - dessa doença no continente Americano. Mais tarde, o próprio SACKSTON (15), assinalou sua presença no Uruguai e, esporádica^{mente}, na Argentina.

BRUNI (2), ressaltou a importância que essa doença - tem adquirido ultimamente na Argentina e descreveu uma nova sintomatologia, "a estria preta", apresentada principalmente pela variedade Ñandubay INTA.

PUTT (13), no Canadá, informou da existência de resistência ao V. albo-atrum no girassol cultivado. Estudou o comportamento de 40 variedades e linhagens de girassol semeadas num campo altamente infestado e concluiu que a resistência à murcha é independente do ciclo da variedade e que não é geneticamente ligada à resistência à ferrugem (Puccinia helianthi Schw.). Também assinalou o fato de que a linhagem CM2, de baixa infecção, sendo derivada de um cruzamento entre duas linhagens susceptíveis, é uma indicação de que a resistência a V. albo-atrum é - complexa.

HOES e PUTT (7), realizaram registros em 40 culturas de girassol na Manitoba, e indicaram que a variedade Peredovik foi a mais resistente ao V. albo-atrum.

HOES (6), estudou o comportamento de linhagens de girassol que tem demonstrado alta, moderada e baixa susceptibilidade ao V. albo-atrum no campo. Diferenciou-as na casa de vegetação por meio da injeção no estado cotiledonar, de uma suspensão conidial do patógeno, em função de sua sintomatologia externa: achaparramento, clorose e necrose. As inoculações no estado cotiledonar por meio da imersão das raízes numa suspensão conidial, diferenciaram somente a alta susceptibilidade e a alta resistência baseada num gene dominante V.

BRUNI (✕), na Argentina, constatou que as variedades soviéticas VNIIMK 6540 e VNIIMK 8883 demonstraram alta resistência frente alguns isolamentos do patógeno.

Embora têm sido determinada a existência de resistência no girassol, desses trabalhos não surge uma idéia clara da possível variabilidade patogênica do fungo.

VIENNOT-BOURGIN (23), assinalou que este agente causal (V. albo-atrum, incluindo ao V. dahliae) produz hadromicose em mais de 80 espécies vegetais, pertencentes a diversos gêneros e famílias botânicas.

Em outras culturas susceptíveis a V. albo-atrum, são abundantes os trabalhos referentes aos diversos aspectos das relações parasito-hospedeiro.

ISAAC e KEYWORTH (8), ALEXANDER (1), SCHNATHORST e MATHRE (18), determinaram formas de maior virulência do patógeno no lúpulo, no tomateiro e no algodoeiro, respectivamente.

TOLMSOFF e YOUNG (22), realizaram estudos da influência do potencial de inóculo de V. albo-atrum no desenvolvimento da doença na batata. A intensidade dos sintomas foliares, o momento da morte da planta e o rendimento de tubérculos, estiveram relacionados com a quantidade do inóculo empregado.

SCHNATHORST (17), estudando a virulência de 12 isolamentos obtidos de 12 hospedeiros diferentes, achou pouca ou nenhuma especialização fisiológica, mas quando se inoculou com eles ao algodoeiro, obteve uma relação direta entre a virulência e o potencial de inóculo dos isolamentos empregados. Definiu ao potencial de inóculo das formas seguintes: $I = V \times N$, ou $I = V \times T$; onde I é o potencial de inóculo, V é a percentagem de viabilidade, N é o número de conídios por ml de suspensão e T é a turbidão da suspensão, o que é outra medida do número de unidades do patógeno na suspensão. Achou que a severidade da doença, avaliada pela sintomatologia externa, foi proporcional ao logaritmo do potencial de inóculo.

(✕) Comunicação pessoal.

SCHNATHORST e MATHRE (18), inocularam plantas de algodoeiro com diferentes potenciais de inóculo de V. albo-atrum. Eles obtiveram novas evidências das diferenças existentes entre os isolamentos do fungo e do comportamento das variedades.

SCHNATHORST e MATHRE (19), fizeram experimentos que demonstraram a existência do fenômeno de "proteção cruzada" ou imunidade adquirida, inoculando as plantas de algodoeiro com duas linhagens diferentes de V. albo-atrum. Estes resultados reafirmaram a conclusão de que as linhagens do patógeno eram diferentes.

Em resumo, no estrangeiro existem alguns trabalhos referentes à procura de resistência à murcha do girassol e, em outras culturas susceptíveis ao V. albo-atrum, numerosos estudos de diversos aspectos das interações parasito-hospedeiro. Entretanto, no Uruguai, até o presente só foi estabelecida a presença, difusão e importância dessa doença do girassol, SACKS TON (15), RAVA (14); não existindo nenhum estudo da variabilidade do patógeno nem do comportamento de diferentes variedades.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Centro de Investigações Agrícolas "Alberto Boerger" do "Ministerio de Ganadería y Agricultura" do Uruguai, entre os anos 1969 e 1970. Nêle foram empregados os seguintes materiais e métodos.

3.1. Variedades de girassol (Helianthus annuus L.)

No quadro 1 relacionam-se as variedades utilizadas nos ensaios de inoculação, assim como sua origem e procedência.

3.2. Isolamentos de Verticillium albo-atrum

As culturas de V. albo-atrum empregadas nas inoculações, sua procedência e a percentagem de germinação dos conídios, relacionam-se no quadro 2.

QUADRO 1 - Variedades de girassol utilizadas nos ensaios de inoculação com isolamentos de Verticillium albo-atrum.

Variedade	País de origem	Procedência
Estanzuela 60	Uruguai	"Programa de Semillas" do C.I.A. "A.Boerger"
Ñandubay INTA	Argentina	Bruni; Pergamino, R.A.
VNIIMK 6540	U.R.S.S.	Bruni; Pergamino, R.A.
VNIIMK 8883	U.R.S.S.	Bruni; Pergamino, R.A.

QUADRO 2 - Isolamentos de Verticillium albo-atrum utilizados nos ensaios de inoculação.

Isolamento ^a	Localidade	Variedade ^b	Porcentagem de germinação dos conídios
V - 5	Estanzuela	tipo selvagem	94,3
V - 7	"	P. 6304	95,8
V - 8	"	Guayacán	93,5
V - 9	"	Sunrise	88,4
V - 10	"	Impira INTA	95,4
V - 11	"	Estanzuela 60	96,4
V - 12	"	Advent Hybrid	96,9
V - 13	"	Sel. Puntano	90,4
V - 14	"	Manfredi INTA	92,1
V - 15	"	Bulgarian	93,6
V - 16	"	Estanzuela 60	96,8
V - 17	R-12 Km93	Não determinada	97,3
V - 18	R-55 1ª	" "	93,9
V - 19	R-55 2ª	" "	93,1
V - 20	R-55 3ª	" "	93,6
V - 21	R-55 4ª	" "	76,5
V - 22	R-55 5ª	" "	95,5
V - 23	R-55 6ª	" "	73,8
V - 24	R-21 Km216	" "	84,7
V - 25	R-21 Km192	" "	88,0

cont...

Isolamento ^a	Localidade	Variedade ^b	Porcentagem de germinação dos conídios
V - 26	El General	Não determinada	96,4
V - 27	R-1 Km168	" "	95,1
V - 28	R-1 Km169	" "	91,9
V - 29	R-1 Km170	" "	91,6
V - 30	R-1 Km167	" "	90,8
V - 31	R-50 Km169	" "	97,9
V - 32	R-50 Km171	" "	96,8
V - 33	R-50 Km187	" "	89,9

^a Os isolamentos V-5 ao V-16 procedem das parcelas do ensaio de variedades e épocas realizado pelo "Programa de Fitotecnia" do C.I.A. "A. Boerger". Os isolamentos V-17 ao V-33 obtiveram-se de culturas comerciais do Depto. de Colonia.

^b Não foi feita a determinação da variedade nas culturas comerciais, embora seguramente, na sua maioria, trata-se da variedade Estanzuela 60 com graus variáveis de mistura.

3.3. Meios de cultura

Os seguintes meios de cultura foram utilizados:

3.3.1. Meio de M.P.A.

Maltose	4 g
Peptona	1 g
Agar	20 g
Água (q.s.).....	1.000 ml

3.3.2. Meio de B.D.A. 2%

Extrato de 200 g de batatas	
Glucose	20 g
Agar	20 g
Água (q.s.).....	1.000 ml

3.4. Técnica de isolamento

Tanto para o isolamento como para a conservação do -

fungo utilizou-se o meio de M.P.A.; sendo este um meio pobre, reduzem-se as possibilidades de seleccionar formas saprofíticas.

O isolamento foi feito mediante a cultura do tecido vascular dos pecíolos de folhas com sintomas, desinfestados exteriormente por flambagem. As placas foram incubadas durante 4 dias a 24°C e as colônias obtidas repicaram-se a tubos com meio inclinado, os que foram incubados durante 20 dias também a 24°C. As culturas conservaram-se a 4-5°C e sem nenhum tratamento especial, pois WILLHELM (25), demonstrou que os microesclerócios dêsse fungo permaneceram viáveis até 13 anos nas condições do laboratório.

3.5. Preparo do inóculo

Na preparação do inóculo se seguiu a técnica indicada por SCHNATHORST e MATHRE (18 e 19), com ligeiras variações, utilizando-se o B.D.A. 2% como meio de cultura. As culturas prepararam-se agregando 2 ml de suspensão conidial em placas contendo o meio já referido, que foram incubadas a 24°C durante 4 dias. Logo foram adicionados 15 ml de água destilada a cada placa, varreu-se a superfície do meio com alça e a suspensão foi filtrada com algodão para separar os restos de agar e os microesclerócios.

Segundo os estudos de SCHNATHORST (17), na murcha do algodoeiro causada por V. albo-atrum, se demonstrou a importância de igualar o potencial de inóculo nos ensaios de comparação da patogenicidade dos isolamentos ou para comparar a susceptibilidade de um grupo de variedades. O cálculo do potencial de inóculo incluye a determinação do número de conídios e sua percentagem de germinação.

Nos ensaios 1 e 3, a concentração da suspensão dos isolamentos V-5, V-10 e V-16 foi determinada por meio de contagens no hematómetro. Calculou-se a diluição necessária para obter 600.000 conídios por ml e se fez a verificação por meio de outra contagem. Paralelamente, determinou-se no espectrofotômetro a 650 m μ de comprimento de onda, que a concentração de 600.000 conídios por ml equivale a uma densidade óptica de 0.02. Com esse

valor procedeu-se à regulação da concentração dos isolamentos restantes, ou dos mesmos em ensaios posteriores.

No ensaio 2, a concentração do inóculo original dos isolamentos V-5 e V-16, determinou-se por meio do hematímetro. Calculou-se a diluição necessária para obter 6.000.000 conídios por ml, que foi verificada por outra contagem, e as concentrações restantes obtiveram-se por diluição.

A percentagem de germinação dos conídios foi determinada segundo a técnica indicada por LILLY e BARNETT (9), com 15 horas de incubação a 24°C. Foi necessário corrigir a concentração de 3 isolamentos (V-21, V-23 e V-24, ver quadro 2) que tiveram uma percentagem de germinação das esporas sensivelmente inferior aos restantes, de modo que corresponderam aproximadamente a um 90% de germinação.

Com a finalidade de aumentar a viscosidade do inóculo, ao diluir a suspensão original de cada isolamento para levá-la à concentração seleccionada, utilizou-se água com agar. Procurou-se que a concentração final da água-agar fora aproximadamente 1^o/100 em todos os casos.

3.6. Preparo das plântulas de girassol

As sementes das 4 variedades foram semeadas em bandejas individuais com areia. Aos 8 dias, quando a maioria das plântulas tiveram os cotilédones distendidos, foram transplantadas 2 em cada vaso de plástico de 13 cm de diâmetro contendo terra com a seguinte composição:

Terra de "pradera negra" 3 partes
Areia fina 1 parte

A desinfestação da terra foi feita por vapor fluente durante 3 1/2 horas.

3.7. Técnica de inoculação

Aos 15 dias do transplante, as plântulas foram retiradas dos vasos, lavaram-se as raízes com água de torneira e foram inoculadas por imersão na suspensão conidial durante 2 minutos, procedendo-se logo ao replante.

3.8. Condições pós-inoculação

Nas operações referidas no ítem 3.7., as plântulas - perdem grande parte do sistema radicular. Por esta razão, uma - vez finalizada a inoculação das plantas do ensaio 1, regulou-se a temperatura da casa de vegetação a 15°C durante a primeira - noite, para permitir sua recuperação. Como o número de vasos - nos ensaios 2 e 3 foi muito menor, logo da inoculação, as plan- tas permaneceram 24 horas em câmara úmida, construída com duas armações de ferro e uma cobertura de plástico. As mesas da casa de vegetação também foram forradas com plástico e, entre os va- sos, intercalaram-se recipientes com água, de modo de obter uma umidade relativa próxima à saturação. Nêsse caso, a temperatura foi mantida perto de 24°C.

Durante o tempo decorrido até a leitura final, tratou- se de regular a temperatura ambiente a 24°C, mas variou entre 22 e 28°C. Nessas condições, a temperatura do solo manteve-se a 22-23°C e, aos efeitos de não fazer-la descer bruscamente com - as regaduras, utilizou-se água estacionada nas condições da ca- sa de vegetação durante um dia. Teve-se especial atenção na tro- ca frequente da localização dos vasos durante todo êsse período de tempo.

3.9. CrITÉRIO de avaliação dos sintomas

Utilizou-se o critério exposto por WELLMAN (24) e sim- plificado por TOKESHI (21), no estudo da murcha do tomateiro - ocasionada por Fusarium oxysporum f. lycopersici, embora foi - incluído o grau 10 (equivalente ao grau 1 da escala de Wellman), para os casos de decoloração da ponta da raiz.

Com a única exceção do terceiro ensaio, as leituras dos sintomas internos foram feitas aos 24 dias da inoculação, - quando as plantas das variedades Nandubay INTA e Estanzuela 60 apresentavam sintomas externos evidentes (achaparramento, clo- rose e necrose, clareado das nervuras e epinastia nas folhas - superiores).

No terceiro ensaio, estabeleceram-se dois momentos de leitura, uno aos 24 dias e outro aos 35 dias da segunda inocula- ção.

3.10. Ensaaios de inoculação e delineamento experimental

No primeiro ensaio, incluíram-se as 4 variedades referidas no quadro 1, e os 28 isolamentos enumerados no quadro 2. O ensaio foi um experimento fatorial disposto num delineamento de parcelas ao acaso com 5 repetições.

No segundo ensaio, empregaram-se as variedades Estanzuela 60 e VNIIMK 8883; os isolamentos V-5 e V-16 em 6 potenciais de inóculo diferentes: 6×10^1 , 6×10^2 , 6×10^3 , 6×10^4 , 6×10^5 e 6×10^6 conídios por ml. O ensaio foi um experimento fatorial disposto num delineamento de parcelas ao acaso com 5 repetições.

No terceiro ensaio, incluiu-se somente a variedade - VNIIMK 8883; os isolamentos V-5 e V-16, em inoculações simples e duplas, segundo o quadro 3.

QUADRO 3 - Terceiro ensaio, inoculações simples e duplas com os isolamentos V-5 e V-16 na variedade VNIIMK 8883.

Primeira inoculação	Segunda inoculação ^a
V - 16	água-agar ^b
V - 5	" "
V - 16	V - 5
V - 5	V - 16

^a A segunda inoculação foi feita 7 dias após a primeira.

^b Nas inoculações simples, a segunda operação foi feita para - que todas as plantas tivessem um desenvolvimento comparável - ao fim do ensaio.

Empregou-se o delineamento de parcelas ao acaso com - 10 repetições e dois momentos de leitura dos sintomas, lendo-se 5 repetições em cada um.

Em todos os ensaios, se incluíram testemunhas sem inocular (tratadas com água-agar) com igual número de repetições -

ao dos isolamentos. Não foram levados em conta na análise estatística.

Os dados foram corrigidos mediante a transformação angular das tabelas de FISHER e YATES (3), e se estudaram por meio da análise de variância, segundo a metodologia indicada por PIMENTEL GOMES (11), em cada caso.

4. RESULTADOS

4.1. Primeiro ensaio: Patogenicidade de 28 isolamentos de V. albo-atrum em 4 variedades de girassol

Os resultados do primeiro ensaio de inoculação estão apresentados no quadro 4, e representados graficamente nas figuras 1 e 2.

QUADRO 4 - Resultados do ensaio de patogenicidade de 28 isolamentos de V. albo-atrum Reinke e Berth. em 4 variedades de girassol^a.

Tratamento	D e c o l o r a ç ã o v a s c u l a r ^b					Média	Transf. angular	
	R e p e t i ç õ e s							
	I	II	III	IV	V			
V-5	E. 60	30	40	50	60	5	37,00	36,22
	Ñ. INTA	40	40	30	20	30	32,00	34,28
	V. 6540	40	0	50	30	30	30,00	30,12
	V. 8883	40	60	50	30	15	39,00	38,20
V-7	E. 60	0	10	40	50	0	20,00	20,52
	Ñ. INTA	100	90	100	60	80	86,00	73,16
	V. 6540	5	10	0	10	20	9,00	15,26
	V. 8883	10	10	5	10	5	8,00	16,20
V-8	E. 60	50	60	30	20	40	50,00	38,96
	Ñ. INTA	90	80	60	90	70	68,00	62,84
	V. 6540	5	15	0	15	15	10,00	16,26
	V. 8883	5	5	20	0	0	6,00	10,48
V-9	E. 60	30	50	10	20	50	32,00	33,64
	Ñ. INTA	50	10	50	80	30	44,00	41,00
	V. 6540	10	0	0	0	0	2,00	3,68
	V. 8883	0	5	5	0	20	6,00	10,48

cont...

Tratamento	Decoloração vascular ^b					Média	Transf. angular
	Repetições						Média
	I	II	III	IV	V		
V-10 E. 60	55	60	50	50	60	55,00	47,90
Ñ. INTA	40	90	40	10	100	56,00	51,68
V. 6540	5	5	60	5	0	15,00	17,90
V. 8883	0	0	5	10	10	5,00	9,94
V-11 E. 60	70	60	50	90	100	74,00	62,84
Ñ. INTA	100	5	20	100	50	55,00	52,90
V. 6540	0	10	0	30	0	8,00	10,32
V. 8883	0	0	0	0	0	0,00	0,00
V-12 E. 60	60	80	15	90	50	59,00	50,72
Ñ. INTA	60	60	100	60	100	76,00	66,48
V. 6540	5	0	10	0	15	6,00	10,82
V. 8883	0	0	0	0	0	0,00	0,00
V-13 E. 60	60	100	50	80	0	58,00	49,84
Ñ. INTA	100	10	45	20	100	55,00	53,42
V. 6540	10	5	30	0	5	10,00	15,48
V. 8883	0	40	5	5	20	14,00	18,32
V-14 E. 60	60	0	50	50	90	50,00	42,48
Ñ. INTA	100	15	0	70	50	47,00	42,92
V. 6540	0	10	0	0	0	2,00	3,68
V. 8883	0	5	0	0	5	2,00	5,16
V-15 E. 60	--	60	20	90	--	56,66	49,67
Ñ. INTA	90	60	--	60	45	63,75	53,82
V. 6540	0	0	40	0	15	11,00	12,40
V. 8883	5	0	0	50	0	11,00	11,58
V-16 E. 60	100	30	100	100	60	78,00	70,80
Ñ. INTA	70	70	100	40	55	67,00	58,14
V. 6540	0	0	0	0	0	0,00	0,00
V. 8883	0	20	0	10	10	8,00	12,68
V-17 E. 60	50	10	50	50	15	35,00	35,24
Ñ. INTA	100	100	100	100	100	100,00	90,00
V. 6540	5	15	0	0	10	6,00	10,82
V. 8883	0	5	10	0	15	6,00	10,82
V-18 E. 60	40	100	10	100	45	59,00	55,94
Ñ. INTA	50	--	80	0	50	45,00	38,35
V. 6540	0	0	10	0	10	4,00	7,36
V. 8883	0	0	50	20	20	18,00	19,64
V-19 E. 60	10	0	10	40	40	20,00	23,04
Ñ. INTA	5	50	50	100	60	53,00	48,74
V. 6540	0	0	0	30	0	6,00	6,64
V. 8883	0	0	0	0	0	0,00	0,00

cont...

Tratamento	D e c o l o r a ç ã o v a s c u l a r ^b					Transf.	
	R e p e t i ç õ e s						angular
	I	II	III	IV	V	Média	Média
V-20 E. 60	0	50	0	70	60	36,00	30,52
Ñ. INTA	100	100	100	100	100	100,00	90,00
V. 6540	0	0	5	10	5	4,00	8,84
V. 8883	15	0	50	60	5	26,00	26,30
V-21 E. 60	50	100	100	60	40	70,00	63,00
Ñ. INTA	100	100	50	80	10	68,00	61,36
V. 6540	5	15	0	10	30	12,00	17,46
V. 8883	40	0	0	0	35	15,00	15,10
V-22 E. 60	70	50	50	10	50	46,00	42,04
Ñ. INTA	100	100	55	100	100	91,00	81,58
V. 6540	0	0	0	0	0	0,00	0,00
V. 8883	0	0	0	10	--	2,50	4,60
V-23 E. 60	5	0	90	0	70	33,00	28,26
Ñ. INTA	100	100	100	100	100	100,00	90,00
V. 6540	10	0	0	0	0	2,00	3,68
V. 8883	0	0	5	0	0	1,00	2,58
V-24 E. 60	0	0	5	50	40	19,00	19,42
Ñ. INTA	50	90	50	50	100	68,00	59,32
V. 6540	0	10	5	0	0	3,00	6,26
V. 8883	0	10	0	0	10	4,00	7,36
V-25 E. 60	100	50	0	5	20	35,00	34,90
Ñ. INTA	100	100	100	60	100	92,00	82,16
V. 6540	0	0	0	5	15	4,00	7,14
V. 8883	5	10	0	15	0	6,00	10,82
V-26 E. 60	0	50	15	100	90	51,00	45,88
Ñ. INTA	50	100	100	100	100	90,00	81,00
V. 6540	5	40	0	0	0	9,00	10,42
V. 8883	5	0	0	15	0	4,00	7,14
V-27 E. 60	50	5	40	50	100	49,00	46,42
Ñ. INTA	100	100	50	50	100	80,00	72,00
V. 6540	0	0	0	0	0	0,00	0,00
V. 8883	0	0	0	0	0	0,00	0,00
V-28 E. 60	100	90	40	100	10	68,00	61,84
Ñ. INTA	50	100	100	90	100	88,00	77,32
V. 6540	0	0	0	10	20	6,00	9,00
V. 8883	0	5	0	0	0	1,00	2,58
V-29 E. 60	40	5	0	0	40	17,00	18,26
Ñ. INTA	45	55	50	100	30	56,00	51,64
V. 6540	0	0	0	5	0	1,00	2,58
V. 8883	0	10	0	0	5	3,00	6,26

cont...

Tratamento	D e c o l o r a ç ã o v a s c u l a r ^b						Transf.
	R e p e t i ç õ e s						angular
	I	II	III	IV	V	Média	Média
V-30 E. 60	5	80	50	60	90	57,00	48,74
Ñ. INTA	50	100	90	100	90	86,00	73,64
V. 6540	0	0	0	0	20	4,00	5,32
V. 8883	0	20	0	0	10	6,00	9,00
V-31 E. 60	55	60	50	--	70	58,75	50,12
Ñ. INTA	50	100	70	50	50	64,00	56,36
V. 6540	0	5	0	0	0	1,00	2,58
V. 8883	0	0	0	0	5	1,00	2,58
V-32 E. 60	60	35	50	50	40	47,00	43,26
Ñ. INTA	100	100	100	100	100	100,00	90,00
V. 6540	0	0	5	0	0	1,00	2,58
V. 8883	0	0	0	0	10	2,00	3,68
V-33 E. 60	0	50	50	55	50	41,00	36,58
Ñ. INTA	100	80	100	50	--	82,50	72,10
V. 6540	0	10	0	0	0	2,00	3,68
V. 8883	15	5	30	0	0	10,00	13,78
Test. E. 60	0	0	0	0	0	0,00	0,00
Ñ. INTA	0	0	0	0	0	0,00	0,00
V. 6540	0	0	0	0	0	0,00	0,00
V. 8883	0	0	0	0	0	0,00	0,00

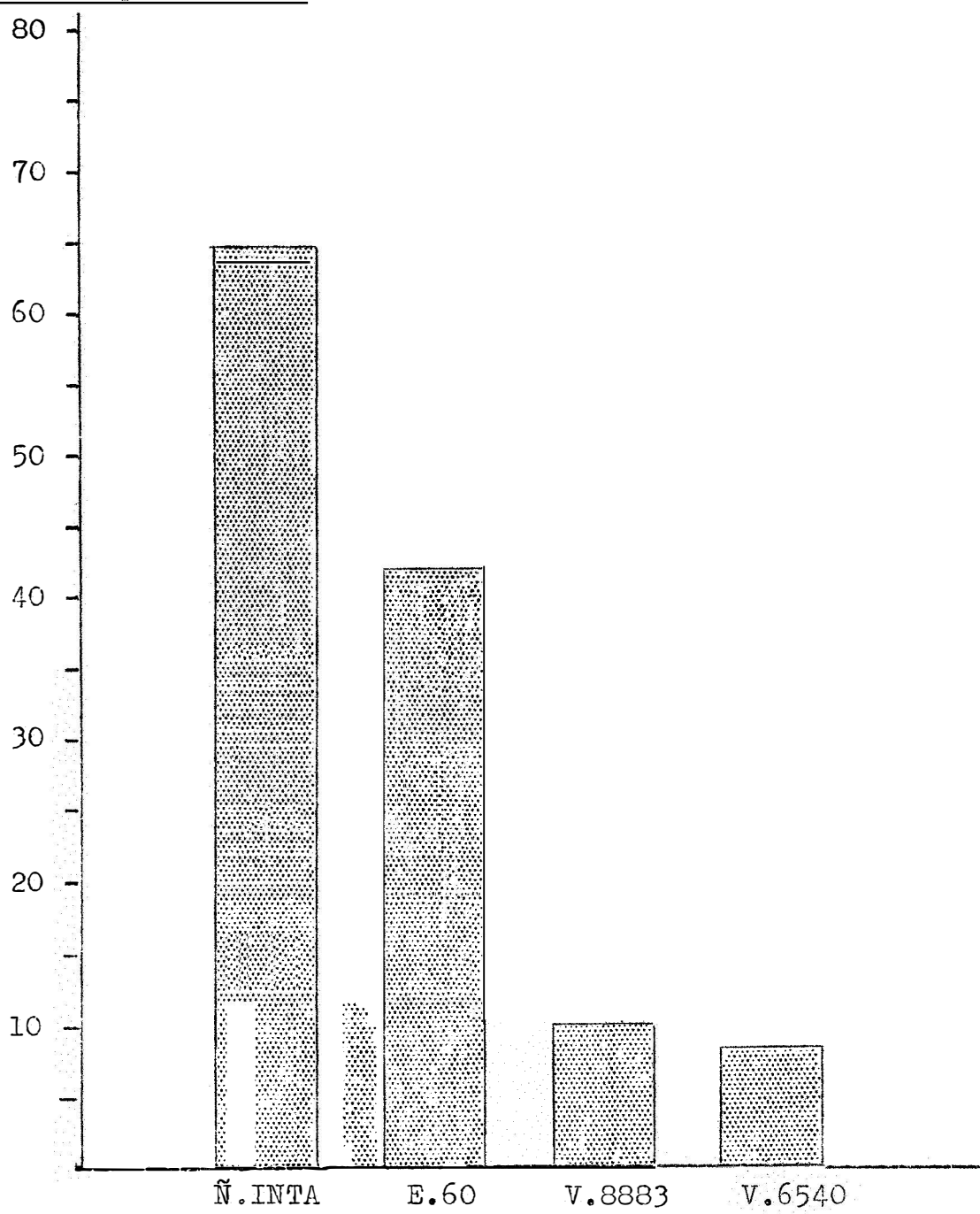
^a A percentagem de escape obtido neste ensaio foi 21,77%. Estimou-se em função do número de plantas das variedades susceptíveis (Estanzuela 60 e Nandubay INTA) que não apresentavam decoloração vascular.

^b Segundo o critério estabelecido por Wellman e modificado por Tokeshi.

A análise de variância dos dados obtidos no primeiro ensaio de inoculação, apresenta-se no quadro 5.

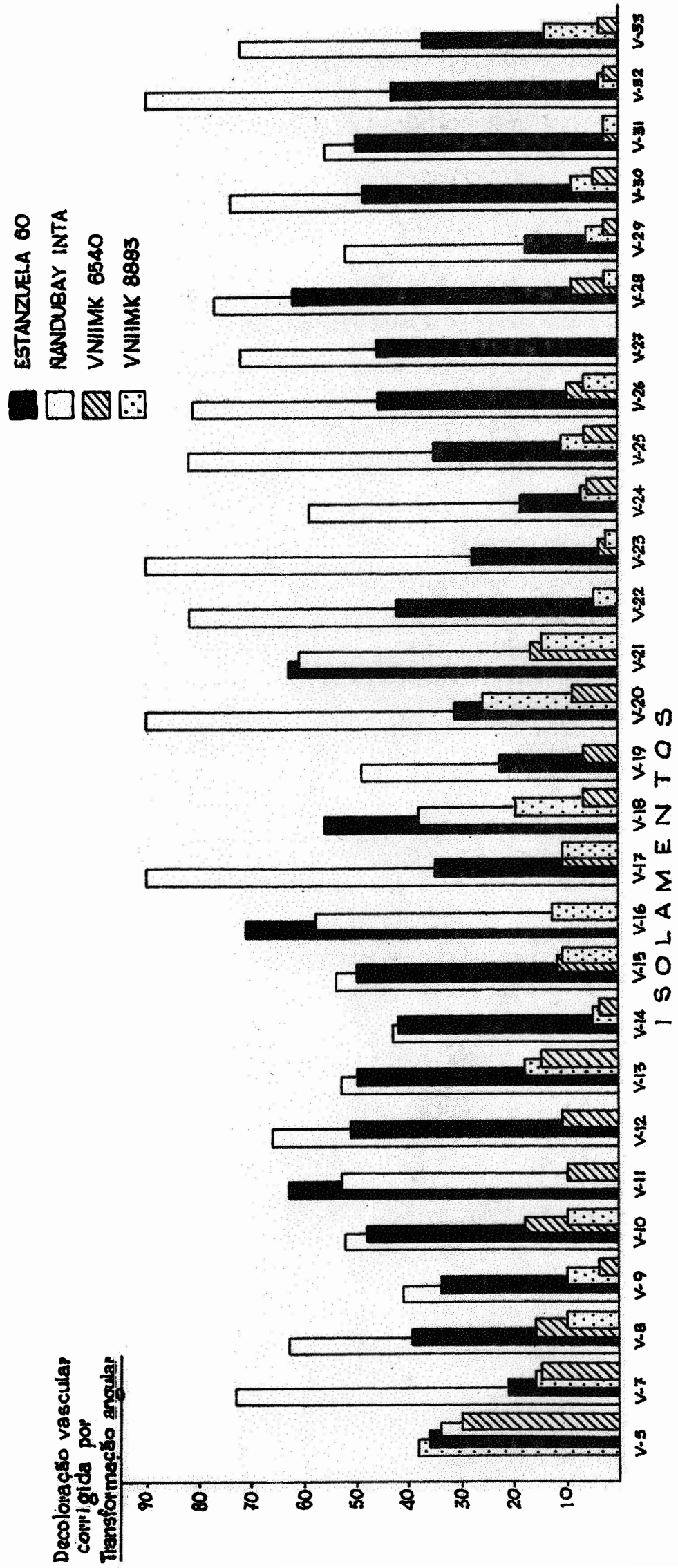
FIGURA 1 - Efeito promédio de 28 isolamentos de Verticillium albo-atrum Reinke e Berth. em 4 variedades de girassol.

Decoloração vascular
corrigida por
Transformação angular



As médias abrangidas por uma barra não diferem significativamente ao nível do 5% de probabilidade, segundo o teste de Duncan.

Figura 2 - Efeitos individuais de 28 isolamentos de *Verticillium albo-atrum* Reinke e Berth. em 4 variedades de girassol.



QUADRO 5 - Análise de variância do ensaio de patogenicidade de 28 isolamentos de V. albo-atrum Reinke e Berth. em 4 variedades de girassol.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
TRATAMENTOS	111	384.472,42	34.637,15	111,45 ^{***}
Isolamentos	27	30.896,39	1.144,31	3,68 ^{***}
Variedades	3	305.485,34	101.828,45	327,95 ^{***}
A x V	81	48.090,69	593,71	1,91 ^{***}
RESÍDUO	441	136.928,90	310,50	
TOTAL	552	521.401,32		

C.V. = 56,56%

(**) = significativo ao nível do 1% de probabilidade.

Da variação total dos tratamentos (exprimida pela soma de quadrados), o 79,45% deveu-se às variedades, o 8,04% aos isolamentos e o 12,51% à interação isolamento por variedade.

O contraste entre o isolamento V-5 e os restantes, nas variedades Estanzuela 60 e Nandubay INTA, apresenta-se no quadro 6; o mesmo contraste, mas nas variedades VNIIMK 6540 e VNIIMK 8883, apresenta-se no quadro 7.

4.2. Segundo ensaio: Influência do potencial de inoculo dos isolamentos V-5 e V-16 nas variedades Estanzuela 60 e VNIIMK 8883

Os resultados obtidos no segundo ensaio de inoculação, estão apresentados no quadro 8.

QUADRO 6 - Análise de variância do contraste entre o isolamento V-5 e os restantes, nas variedades Estanzuela 60 e Ñandubay INTA.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
CONTRASTE V-5 vs. restantes	1	3.447,94	3.447,94	4,63 [✕]
RESÍDUO	272	202.399,45	744,11	
TOTAL	273	205.847,39		

(✕) = significativo ao nível do 5% de probabilidade.

QUADRO 7 - Análise de variância do contraste entre o isolamento V-5 e os restantes, nas variedades VNIIMK 6540 e - VNIIMK 8883.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
CONTRASTE V-5 vs. restantes	1	6.449,75	6.449,75	46,55 ^{✕✕}
RESÍDUO	277	38.378,87	138,55	
TOTAL	278	44.828,62		

(✕✕) = significativo ao nível do 1% de probabilidade.

QUADRO 8 - Resultados do segundo ensaio de inoculação - Influência do potencial de inóculo dos isolamentos V-5 e V-16 nas variedades Estanzuela 60 e VNIIMK 8883.

T r a t a m e n t o s		D e c o l o r a ç ã o v a s c u l a r a					Transform. angular	
Isolamento	Variedade Inóculo ^b	R e p e t i ç õ e s						Média
		I	II	III	IV	V		
V - 5	E. 60	0	0	0	0	0	0,00	0,00
	6 x 10 ¹	10	25	10	10	15	14,00	21,60
	6 x 10 ²	0	45	30	30	20	25,00	27,00
	6 x 10 ³	0	10	15	35	50	22,00	24,50
	6 x 10 ⁴	70	20	40	40	70	48,00	43,70
	6 x 10 ⁵	60	80	80	50	80	70,00	57,20
	6 x 10 ⁶	80	80	80	60	100	80,00	66,20
V. 8883	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
	6 x 10 ¹	0	5	5	5	0	3,00	7,70
	6 x 10 ²	0	5	10	5	0	4,00	8,80
	6 x 10 ³	10	20	25	5	10	14,00	21,30
	6 x 10 ⁴	40	50	20	5	60	35,00	34,90
	6 x 10 ⁵	40	40	40	40	15	35,00	35,90
	6 x 10 ⁶	30	40	30	30	30	32,00	34,40

cont...

Tratamentos		Decoloração vascular					Transform. angular		
Isolamento	Variedade	Potencial de Inóculo ^b	Repetições					Média	
			I	II	III	IV	V		
V - 16	E. 60	0	0	0	0	0	0,00	0,00	
		6 x 10 ¹	35	5	0	5	20	13,00	17,74
		6 x 10 ²	10	10	20	20	20	16,00	23,32
		6 x 10 ³	10	70	10	60	55	41,00	38,46
		6 x 10 ⁴	25	60	60	70	40	51,00	45,52
		6 x 10 ⁵	60	40	60	50	100	62,00	55,16
		6 x 10 ⁶	60	80	80	80	60	72,00	58,36
	V. 8883	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
		6 x 10 ¹	0	0	0	0	5	1,00	2,60
		6 x 10 ²	0	5	5	0	10	4,00	8,80
		6 x 10 ³	20	10	10	15	5	12,00	19,80
		6 x 10 ⁴	5	10	35	10	50	22,00	26,20
		6 x 10 ⁵	20	10	10	60	20	24,00	28,20
		6 x 10 ⁶	10	10	10	10	50	18,00	23,70

^a Segundo o critério estabelecido por Wellman e modificado por Tokeshi.

^b O potencial de inóculo 0, somente foi incluído como controle.

As análises de variância foram feitas levando em conta a regressão para os diferentes potenciais de inóculo nas quatro combinações isolamento-variedade estudadas; apresentam-se nos quadros 9, 10, 11 e 12.

QUADRO 9 - Análise de variância considerando a regressão - Isolamento V-5 na variedade Estanzuela 60 a diferentes potenciais de inóculo.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Regressão linear	1	7.911,37	7.911,37	45,80 ^{**}
Desvíos da Regressão linear	4	805,63	201,41	1,17
TRATAMENTOS	5	8.717,00	1.743,40	10,09 ^{**}
RESÍDUO	24	4.144,98	172,71	
TOTAL	29	12.861,98		

(**) = significativo ao nível do 1% de probabilidade.

$$\text{EQUAÇÃO DE REGRESSÃO: } Y = - 0,652 + 9,512 X'$$

$$\text{para: } 6 \times 10^1 \leq X \leq 6 \times 10^6$$

sendo:

X = potencial de inóculo.

X' = logaritmo do potencial de inóculo.

Y = decoloração vascular corrigida por transformação angular.

A simbologia empregada nas equações de regressão dos quadros 10, 11 e 12, é a mesma.

QUADRO 10 - Análise de variância considerando a regressão - Isolamento V-5 na variedade VNIIMK 8883 a diferentes potenciais de inóculo.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Regressão linear	1	3.719,00	3.719,00	48,46 ^{**}
Regressão quadrática	1	205,10	205,10	2,67
Regressão cúbica	1	341,14	341,14	4,44 ^{**}
Regressão de 4º grau	1	72,72	72,72	0,95
Regressão de 5º grau	1	15,18	15,18	0,20
TRATAMENTOS	5	4.353,14	870,63	11,34 ^{**}
RESÍDUO	24	1.841,67	76,46	
TOTAL	29	6.194,81		

(*) = significativo ao nível do 5% de probabilidade.
 (**) = significativo ao nível do 1% de probabilidade.

$$\text{EQUAÇÃO DE REGRESSÃO: } Y = 37,94 - 35,60X^1 + 12,10X^2 - 1,025X^3$$

$$\text{para: } 6 \times 10^1 \leq X \leq 6 \times 10^6$$

QUADRO 11 - Análise de variância considerando a regressão - Isolamento V-16 na variedade Estanzuela 60 a diferentes potenciais de inóculo.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Regressão linear	1	6.753,04	6.753,04	35,93 ^{**}
Desvíos da Regressão linear	4	113,35	28,34	0,15
TRATAMENTOS	5	6.866,39	1.373,28	7,30 ^{**}
RESÍDUO	24	4.511,21	187,97	
TOTAL	29	11.377,60		

(**) = significativo ao nível do 1% de probabilidade.

$$\text{EQUAÇÃO DE REGRESSÃO: } Y = 2,396 + 8,734 X'$$

$$\text{para: } 6 \times 10^1 \leq X \leq 6 \times 10^6$$

QUADRO 12 - Análise de variância considerando a regressão - Isolamento V-16 na variedade VNIIMK 8883 a diferentes potenciais de inóculo.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
Regressão linear	1	2.065,72	2.065,72	19,45 ^{xx}
Regressão quadrática	1	477,65	477,65	4,48 ^x
Regressão cúbica	1	84,21	84,21	0,79
Regressão de 4º grau	1	9,62	9,62	0,09
Regressão de 5º grau	1	2,70	2,70	0,03
TRATAMENTOS	5	2.639,44	527,89	4,97 ^{xx}
RESÍDUO	24	2.548,57	106,19	
TOTAL	29	5.188,01		

(x) = significativo ao nível do 5% de probabilidade.

(xx) = significativo ao nível do 1% de probabilidade.

$$\text{EQUAÇÃO DE REGRESSÃO: } Y = - 27,17 + 18,55 X' - 1,60 X'^2$$

$$\text{para: } 6 \times 10^1 \leq X \leq 6 \times 10^6$$

Nas figuras 3 e 4 estão representadas as curvas de regressão obtidas com os diferentes potenciais de inóculo nas quatro combinações isolamento-variedade estudadas.

4.3. Terceiro ensaio: Efeito das inoculações simples e duplas com os isolamentos V-5 e V-16 na variedade VNIIMK 8883

Os resultados do terceiro ensaio de inoculação estão apresentados no quadro 13.

FIGURA 3 - Influência do potencial de inóculo - Curvas de regressão do isolamento V-5 nas variedades Estanzuela 60 e VNIIMK 8883.

Decoloração vascular
corrigida por
Transformação angular

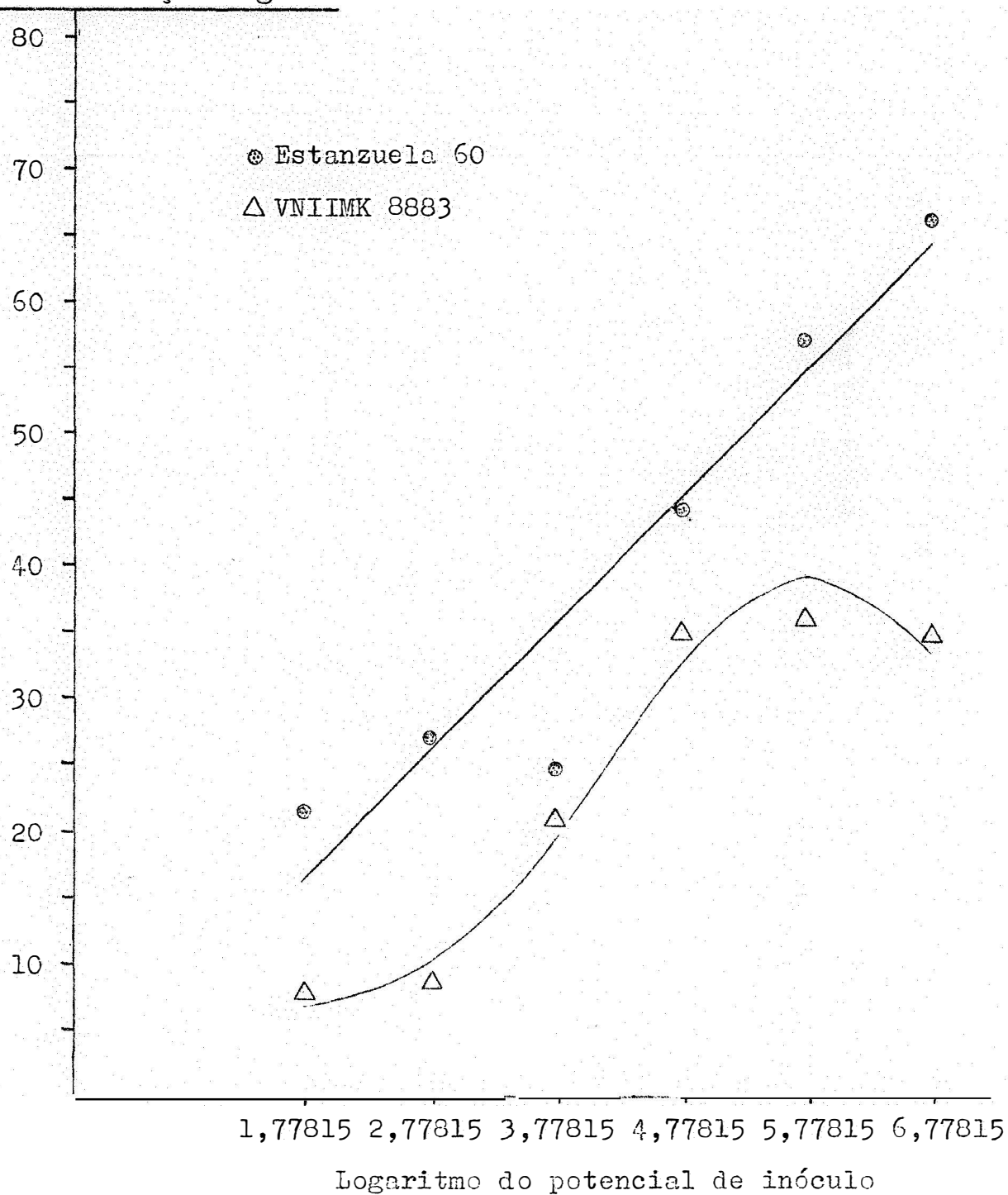
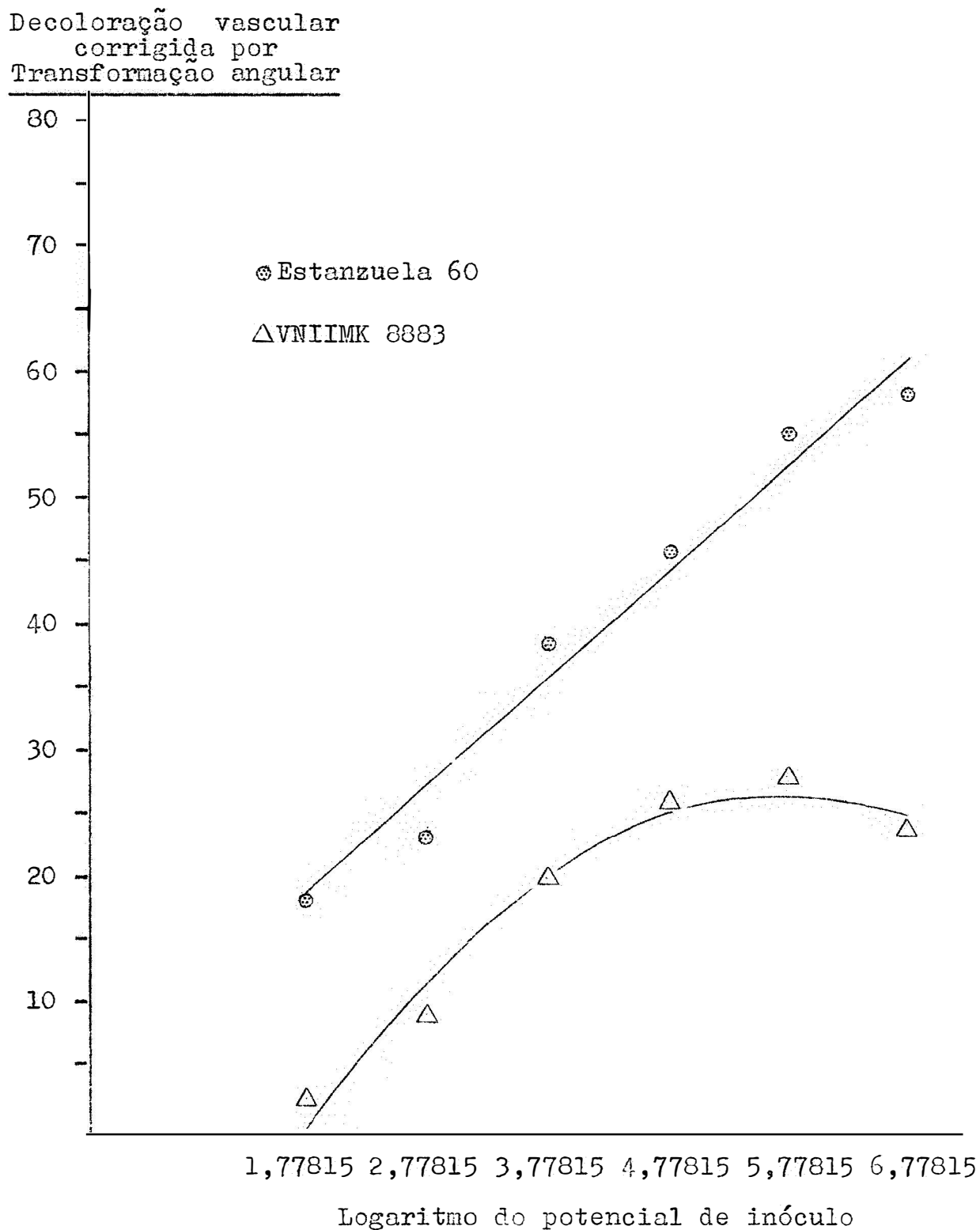


FIGURA 4 - Influência do potencial de inóculo - Curvas de regressão do isolamento V-16 nas variedades Estanzuela 60 e VNIIMK 8883.



QUADRO 13 - Resultados das inoculações simples e duplas com os isolamentos V-5 e V-16 na variedade VNIIMK 8883.

Tratamento	D e c o l o r a ç ã o v a s c u l a r ^a					Transform.	
	R e p e t i ç õ e s					Média	angular
	I	II	III	IV	V		
	P r i m e i r a l e i t u r a ^b						
V-16 ^d	5	15	5	5	30	12,00	18,90
V-5 ^d	25	10	20	5	35	19,00	24,80
V-16 + V-5 ^e	30	40	15	10	20	23,00	28,00
V-5 + V-16 ^e	25	10	40	10	30	23,00	27,80
..... ^f
Testem. ^f	0	0	0	0	0	0,00	0,00
	S e g u n d a l e i t u r a ^c						
V-16 ^d	10	5	10	10	10	9,00	17,30
V-5 ^d	25	10	20	15	30	20,00	26,20
V-16 + V-5 ^e	25	50	70	25	35	41,00	39,60
V-5 + V-16 ^e	10	30	25	40	40	29,00	32,00
..... ^f
Testem. ^f	0	0	0	0	0	0,00	0,00

^a Segundo o critério estabelecido por Wellman e modificado por Tokeshi.

^b Aos 24 dias da segunda inoculação.

^c Aos 35 dias da segunda inoculação.

^d Aos 7 dias da primeira inoculação, reinocularam-se com água-agar.

^e Aos 7 dias da primeira inoculação, reinocularam-se com os isolamentos indicados.

^f As duas inoculações com água-agar.

As análises de variância dos dados da primeira e segunda leitura do terceiro ensaio de inoculação, estão apresentadas nos quadros 14 e 15, respectivamente.

QUADRO 14 - Análise de variância da primeira leitura do ensaio de inoculações simples e duplas com os isolamentos V-5 e V-16 na variedade VNIIMK 8883.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
TRATAMENTOS	3	270,14	90,05	1,12 N.S.
RESÍDUO	16	1.287,09	80,44	
TOTAL	19	1.557,23		

C.V. = 36,01%

N.S. = não significativo.

QUADRO 15 - Análise de variância da segunda leitura do ensaio - de inoculações simples e duplas com os isolamentos V-5 e V-16 na variedade VNIIMK 8883.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F
CONTRASTE simples vs. dupla ^a	1	988,41	988,41	16,23 ^{xx}
CONTRASTE proteção cruzada ^b	1	20,05	20,05	0,33
TRATAMENTOS	3	1.331,95	443,98	7,29 ^{xx}
RESÍDUO	16	974,14	60,88	
TOTAL	19	2.306,09		

^a V-16 e V-5 vs. V-16 + V-5 e V-5 + V-16.

^b V-16 e V-16 + V-5 vs. V-5 e V-5 + V-16.

C.V. = 27,11%

(xx) = significativo ao nível do 1% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

Sendo o girassol uma planta alógama, é lógico que exista uma grande variabilidade dentro das variedades, o que explicaria, ao menos em parte, que os coeficientes de variação dos ensaios de inoculação tenham sido tão elevados.

A análise de variância dos resultados do primeiro ensaio de inoculação, apresentado no quadro 5, mostrou uma diferença altamente significativa entre os tratamentos, devida fundamentalmente ao comportamento das variedades que foram responsáveis do 79,45% desta variação. Quando se considerou o efeito promédio dos 28 isolamentos de V. albo-atrum nas 4 variedades de girassol estudadas, representado graficamente na figura 1, as variedades soviéticas demonstraram alta resistência, o que concorda com as observações de BRUNI (⌘) em Pergamino, R.A. As variedades sudamericanas foram susceptíveis ao patógeno e, embora Estanzuela 60 foi mais resistente que Ñandubay INTA, seu nível de resistência não foi satisfatório. Quando se considerou o efeito individual de cada isolamento nas 4 variedades de girassol, representado graficamente na figura 2, foi possível apreciar que o isolamento V-5 foi o mais virulento nas variedades resistentes. Este fato manifestou-se mediante os dois contrastes apresentados nos quadros 6 e 7, que explicam também parte da interação isolamento-variedade altamente significativa. Não obstante, essa diferença no comportamento do isolamento V-5, é só quantitativa e não qualitativa, já que não é suficiente para fazer variar a classe de reação das variedades resistentes, daí que não se pode considerar como uma raça diferente.

A percentagem de escape dêsse primeiro ensaio de inoculação foi de 21,77%. Quando se realizou o mesmo cálculo consi

(⌘) Comunicação pessoal.

derando somente à variedade Estanzuela 60 obteve-se uma percentagem de escape do 30,11%; entretanto foi somente do 13,15% quando se considerou à variedade Ñandubay INTA. Este fato estaria insinuando que nem todas as plantas com ausência de sintomas internos, da variedade Estanzuela 60, foram simplesmente escape. Pelo contrario, esta diferença no comportamento pode ser devida à existência de plantas resistentes dentro da variedade, o que se apoia na grande variabilidade que apresenta esta variedade para outras características.

GARRETT (5), definiu o potencial de inóculo como "a energia de crescimento disponível de um fungo parasito para produzir a infecção do hospedeiro na superficie do órgão a ser infectado". Isto implica que dentro de certos limites, a energia disponível de um organismo patógeno, e consequentemente, a severidade da doença, aumentará com o número de propágulos viáveis, como assim com a quantidade e qualidade da base nutritiva.

Os resultados do segundo ensaio de inoculação, representados graficamente nas figuras 3 e 4, indicaram para a variedade susceptível Estanzuela 60, uma relação direta entre a severidade da doença (estimada pela decoloração vascular) e o logaritmo do potencial de inóculo, nos dois isolamentos estudados, o que coincide com os trabalhos de SCHNATHORST (17) e SCHNATHORST e MATHRE (18). Pelo contrario, na variedade resistente VNIIMK 8883, existiu resposta às doses crescentes até a concentração de 6×10^4 conídios por ml de suspensão e não para doses maiores dos dois isolamentos. Embora os elementos de juizo obtidos neste ensaio não sejam suficientes para explicar essa falta de resposta às altas concentrações de inóculo da variedade VNIIMK 8883, esta poderia ser outra característica de comportamento diferencial entre as variedades de girassol susceptíveis e resistentes a V. albo-atrum.

No terceiro ensaio de inoculação, haviam sido previstas duas épocas de leitura dos sintomas, já que se presumia que o período de tempo em que as variedades susceptíveis evidenciam sintomas externos poderia ser insuficiente para estabelecer diferenças de significação estatística numa variedade resisten-

te. Assim, na primeira leitura não se obtiveram diferenças entre os tratamentos, como foi indicado pela análise de variância apresentada no quadro 14. Na segunda leitura, existiram diferenças evidentes e a intensidade dos sintomas internos foi maior - nas inoculações duplas que nas simples. Dos contrastes apresentados no quadro 15, resultou evidente que o isolamento V-16 não induziu o fenômeno de imunidade adquirida na variedade VNIIMK 8883, e a sintomatologia acrescentou-se quando reinoculou-se-a com o isolamento V-5. Ou seja, embora se tenha determinado certo grau de antagonismo in vitro entre os dois isolamentos (o V-16 inibiu o crescimento de V-5), êste processo não teve nenhum efeito quando os dois isolamentos foram inoculados afastados entre si uma semana, na mesma planta.

Êstes últimos resultados reafirmam o já estabelecido ao respeito da escassa especialização fisiológica dos isolamentos estudados, embora tivessem sido obtidos de diferentes variedades de girassol ou de diferentes localidades, como foi assinalado no quadro 2. Esta falta de especialização fisiológica poderia ser devida a que, praticamente, não existiu a pressão de seleção que exerceriam na população dêsse fungo as variedades - resistentes. Êste raciocínio que parece lógico, coincide com os trabalhos em que ALEXANDER (1) e SCHNATHORST e MATHRE (18), encontraram formas de V. albo-atrum de maior patogenicidade para o tomateiro e o algodoeiro respectivamente. Não obstante, isso não se deve considerar num sentido absolutamente estrito, já - que TOKESHI (21), achou uma raça de Fusarium oxysporum f. lycopersici de maior virulência que a comum do Estado de São Paulo, Brasil, sem que se tivesse operado êste processo de seleção por uma variedade resistente.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos nos ensaios de inoculação com 28 isolamentos de V. albo-atrum nas variedades de girassol Estanzuela 60, Ñandubay INTA, VNIIMK 6540 e VNIIMK 8883, podem-se tirar as seguintes conclusões:

6.1. Não se encontrou especialização fisiológica no patógeno, o que representa uma grande vantagem para os planos de melhoramento por resistência do girassol.

6.2. Nas variedades soviéticas VNIIMK 6540 e VNIIMK 8883, determinou-se um alto grau de resistência frente aos isolamentos de V. albo-atrum ensaiados.

6.3. As variedades sudamericanas, Estanzuela 60 e Ñandubay INTA, apresentaram alta susceptibilidade a todos os isolamentos empregados. Sua sintomatologia externa foi sempre mai r que nas variedades resistentes para graus semelhantes de decoloração vascular.

6.4. O isolamento V-5 foi o mais virulento para as variedades resistentes; no entanto, a classe de reação destas não variou e, por conseguinte, aquele isolamento não pode ser considerado uma raça nova.

6.5. A percentagem de escape obtido no primeiro ensaio de inoculação foi maior na variedade Estanzuela 60 que na Ñandubay INTA, o que sugeriu a existência de plantas resistentes dentro da primeira variedade.

6.6. Empregando os isolamentos V-5 e V-16 com diferentes potenciais de inóculo, se pode estabelecer uma outra característica de comportamento diferencial entre a variedade susceptível Estanzuela 60 e a resistente VNIIMK 8883:

6.6.1. Na variedade Estanzuela 60, a decoloração vascular guardou uma relação direta com o logaritmo do potencial de inóculo dos dois isolamentos.

6.6.2. Na variedade VNIIMK 8883, obteve-se resposta às concentrações crescentes até 6×10^4 conídios por ml de suspensão, e não para as doses maiores dos dois isolamentos empregados.

6.7. Não se registrou o fenômeno de imunidade adquirida quando inoculou-se a variedade VNIIMK 8883 com o isolamento V-16 e se reínculou uma semana após com o V-5. Isto coincide com o já estabelecido no primeiro parágrafo, a respeito da falta de especialização fisiológica dos isolamentos estudados.

7. RESUMO

Um estudo da variabilidade do parasito e do hospedeiro foi realizado na murcha ou veteado das folhas do girassol, - incitada por Verticillium albo-atrum Reinke e Berth. 1879, que é uma das doenças mais importantes desta cultura no Uruguai.

Obtiveram-se 28 isolamentos de V. albo-atrum, 11 dos quais provinieram das parcelas de experimentação do C.I.A. "A. Boerger", e os 17 restantes de diferentes localidades do Departamento de Colonia. Empregaram-se as variedades de girassol Estanzuela 60, Ñandubay INTA, VNIIMK 6540 e VNIIMK 8883.

As variedades sudamericanas, Estanzuela 60 e Ñandubay INTA, demonstraram alta susceptibilidade, enquanto que as soviéticas VNIIMK 6540 e VNIIMK 8883 foram resistentes aos isolamentos do patógeno empregados.

Não se achou especialização fisiológica no parasito. Embora o isolamento V-5 fôsse mais virulento que os restantes - para as variedades resistentes, não se diferenciou o suficiente para se constituir em outra raça.

Nos ensaios com diferentes potenciais de inóculo dos isolamentos V-5 e V-16, se pode apreciar que na variedade Estanzuela 60 a decoloração vascular guardou uma relação direta - com o logaritmo do potencial de inóculo. Na variedade VNIIMK - 8883, obteve-se resposta às concentrações crescentes até 6×10^4 conídios por ml de suspensão e não para as concentrações maiores.

Não se obteve proteção cruzada quando se inoculou a - variedade VNIIMK 8883 com o isolamento V-16 e se reinoculou uma semana após, com o V-5.

8. SUMMARY

This study deals with the host and parasite variability of Verticillium albo-atrum Reinke & Berth. 1879, on sunflowers. The fungus incites wilt or leaf mottle, one of the more important sunflower diseases in Uruguay.

Twenty-eight isolates of V. albo-atrum were obtained, 11 from different varieties of experimental plots at the C.I.A. "A. Boerger", and 17 from different locations of the department of Colonia. Sunflower varieties Estanzuela 60, Ñandubay INTA, VNIIMK 6540 and VNIIMK 8883 were employed.

While Soviet varieties VNIIMK 6540 and VNIIMK 8883 were resistant, South American varieties Estanzuela 60 and Ñandubay INTA showed high susceptibility to the isolates of the pathogen.

Physiologic specialization of the parasite was not found. Despite the fact that the V-5 isolate was the most virulent for resistant varieties, it was not sufficiently distinct to be considered as a different race.

In the assays with different inoculum potentials using V-5 and V-16 isolates, a direct relationship was found between vascular decoloration and the logarithm of inoculum potential on Estanzuela 60 variety. On VNIIMK 8883 variety, there was response to increasing concentrations up to 6×10^4 conidia per ml of suspension but not to higher concentrations.

Cross-protection was not observed when inoculating VNIIMK 8883 variety with the isolate V-16 and reinoculating with V-5 one week later.

9. LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, L.J. Susceptibility of certain Verticillium resistant varieties to an Ohio isolate of the pathogen. *Phytopathology* 52:998-1000. 1962.
2. BRUNI, O. Verticillium dahliae parásito del girasol en Argentina. Pergamino. Estación Experimental Agrícola. Informe Técnico N° 48. 9 p. 1965.
3. FISHER, R.A. e YATES, F. Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Edinburgh, Hafner, 1963. 146 p.
4. FORDICE, C. e GREEN, R.J. Mechanisms of variation in Verticillium albo-atrum. *Phytopathology* 54:795-798. 1964.
5. GARRETT, S.D. Biology of root-infecting fungi. Cambridge, University Press, 1960. 293 p.
6. HOES, J.A. Screening sunflowers for resistance to Verticillium wilt. *Phytopathology* 56:881. 1966.
7. _____ e PUTT, E.D. Diseases of sunflower in Western Canada in 1964. *Canadian Plant Disease Survey* 44:236-237. 1964.
8. ISAAC, I. e KEYWORTH, W.G. Verticillium wilt of the hop (Humulus lupulus). III. A study of the pathogenicity of isolates from fluctuating and from progressive outbreaks. *Annals of Applied Biology* 35: 243-249. 1948. (Original não consultado; citado por GARRETT, S.D. Biology of root-infecting fungi. Cambridge, University Press, 1960. 293 p.)
9. LILLY, V.G. e BARNETT, H.L. Physiology of the fungi. - N.Y., McGraw-Hill, 1951. 345 p.

10. MARTINSON, C.A. e ENGLANDER, L. Use of growth rates at high temperatures to confirm identifications of Verticillium albo-atrum and Verticillium dahliae. Phytopathology 57:821. 1967.
11. PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. 3a.ed. São Paulo, Brasil, Universidade, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1966. 404 p.
12. PRESLEY, J.T. Verticillium wilt of cotton with particular emphasis on variation of the causal organism. Phytopathology 40:497-511. 1950.
13. PUTT, E.D. Note on resistance of sunflowers to leaf mottle disease. Canadian Journal of Plant Science 38:274-276. 1958.
14. RAVA, C. Registro de enfermidades del girasol en el departamento de Colonia en 1968-69. (Não publicado).
15. SACKSTON, W.E. Diseases of sunflower in Uruguay. - Plant Disease Reporter 41:885-889. 1957.
16. _____, McDONALD, W.C. e MARTENS, J. Leaf mottle or Verticillium wilt of sunflowers. Plant Disease Reporter 41:337-343. 1957.
17. SCHNATHORST, W.C. Theoretical relationships between inoculum potential and disease severity based on a study of the variation in virulence among isolates of Verticillium albo-atrum. Phytopathology 53:888. 1963.
18. _____ e MATHRE, D.E. Host range and differentiation of a severe form of Verticillium albo-atrum in cotton. Phytopathology 56:1155-1161. 1966.
19. _____ Cross-protection in cotton with strains of Verticillium albo-atrum. Phytopathology 56:1204-1209. 1966.

20. SHMOTINA, G.E. e GORLENKO, M.V. (Morphological variability of the causal agent of Verticillium wilt under different nutritional conditions). Biol. Nauki 10:109-118. 1967. (Original não consultado; extraído de Review of Applied Mycology 47: 17. 1968.).
21. TOKESHI, H. Murcha de Fusarium em tomateiro. Estudo da variabilidade do patógeno e hospedeiro. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". U.S.P. Tese de Livre Docência. 1966. 64 p.
22. TOLMSOFF, W.J. e YOUNG, R.A. Relation of inoculum potential of Verticillium albo-atrum to development and severity of wilt in potatoes. Phytopathology 47:536. 1957.
23. VIENNOT-BOURGIN, G. Les champignons parasites des - plantes cultivées. Paris, Masson, 1949. 1850p.
24. WELLMAN, F.L. A technique for studying host resistance and pathogenicity in tomato Fusarium wilt. - Phytopathology 29:945-956. 1939.
25. WILLHELM, S. Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and field. Phytopathology 45:180-181. 1955.
26. _____, THOMAS, H.E. e JENSEN, D.D. The effect of temperature on the taxonomic characters of - Verticillium albo-atrum Rke. et Bert. Phytopathology 38:919. 1948.