

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO E PROTEÇÃO CRUZADA
DE *Verticillium albo-atrum* Reinke & Bert. EM TOMATEIRO
(*Lycopersicon esculentum* Mill.)

NICÉSIO FILADELFO JANSSEN DE ALMEIDA PINTO

Eng.º-Agr.º - EMBRAPA

Orientador: Prof. Dr. Ferdinando Galli

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Março, 1978

4
06/88

55/150-12
PIN
1978

Ao

Prof. HASIME TOKESHI
pelo incentivo e colaboração,

MINHA HOMENAGEM

Aos

meus pais
JOSÉ PINTO FILHO
e
TEODORA ALMEIDA RODRIGUES

MEU RECONHECIMENTO

A

minha esposa
MARIA DE FÁTIMA COELHO GOMES JANSSEN

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos:

ao Prof. Dr. FERDINANDO GALLI, pela valiosa orientação apoio e ensinamentos durante a realização deste trabalho;

ã EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) , ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO e TECNOLÓGI CO (C.N.Pq.) e ao Depattamento de Fitopatologia da Escola Supe rior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que me propiciaram con dições para o Curso de Pós-Graduação;

ao Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER e ao Prof. Dr. CLÉLIO LIMA SALGADO, pela colaboração na revisão dos originais;

ao colega HENRY EVEN BAJUNGU, pela versão do resumo para o Inglês;

aos colegas de curso. Eng^os Agr^os GILSON SOARES DA SILVA e JOAQUIM REZENDE PEREIRA pelo apoio e amizade constantes;

aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ especialmente aos Srs. ALCÍDIO ANDRIOLLI e BENEDITO RODRIGUES de MORAIS, pelos auxílios prestados nos laboratórios e na ins talação dos experimentos;

Aos funcionários da Biblioteca Central da ESALQ, na pes soa do Sr. LUIS CARLOS VERÍSSIMO;

ao Sr. ANTONIO VITTI pelos excelentes trabalhos datilo gráficos;

e a todos os colegas e professores, que direta ou indire tamente contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. Origem dos Isolados de <i>V. albo-atrum</i> e sua preservação	12
4.2. Cultivares de Tomate	12
4.3. Preparo do Inóculo	13
4.3.1. Obtenção e Preparo de Conídios	13
4.3.2. Obtenção e preparo de microescleródios	13
4.4. Tratamentos de Sementes	14
4.5. Preparo do Solo	14
4.6. Produção de Mudanças de Tomateiro	15
4.7. Reisolamento	15
4.8. Critérios de Avaliação	15
4.9. Esterilização do Solo, Vasos de Alumínio e Caixas de Madeira	16
4.10. Experimento I: Metodologia de Inoculação de <i>V. albo-atrum</i> em Tomateiro	16
4.10.1. Infestação de sementes com conídios	16
4.10.2. Infestação de sementes com microescleródios ..	17
4.10.3. Infestação do solo com conídios	18
4.10.4. Infestação do solo com microescleródios	19
4.10.5. Mergulho de raízes em suspensões de conídios ..	20
4.11. Experimento II: Proteção Cruzada	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Experimento I: Metodologia de Inoculação de <i>Verticillium albo-atrum</i> em Tomateiro	22
5.1.1. Infestação de sementes com conídios	22
5.1.2. Infestação de sementes com microescleródios	23

	<u>Página</u>
5.1.3. Infestação do solo com conídios	23
5.1.4. Infestação do solo com microescleródios	24
5.1.5. Mergulho de raízes em suspensão conidial	25
5.2. Experimento II: Proteção Cruzada	27
6. CONCLUSÕES	29
7. SUMMARY	30
8. LITERATURA CITADA	31
9. APÊNDICE	35

1. RESUMO

O autor estudou diferentes métodos de inoculação de *Verticillium albo-atrum* em tomateiro, para subsidiar o desenvolvimento de trabalhos, visando a obtenção de resistência à murcha de *Verticillium*. Também estudou proteção cruzada entre 2 isolados, com diferentes graus de patogenicidade.

Os trabalhos foram conduzidos em casa de vegetação com controle parcial de temperatura.

Os métodos de inoculação foram conduzidos em épocas diferentes e não puderam ser estatisticamente comparados.

O método de mergulho de raízes, em suspensão conidial, mostrou-se muito drástico, com plantas enfezadas e precocidade na exteriorização de sintomas. Possivelmente se mostrará o melhor quando for comparado simultaneamente com os métodos de infestação do solo com conídios, infestação do solo com microescleródios, infestação de sementes com conídios e infestação de sementes com microescleródios. Contudo, a afirmativa é puramente especulativa.

A interação dos dois isolados de *V. albo-atrum* promoveu alto nível de proteção cruzada em tomateiro, quando o isolado pouco patogênico teve sua concentração conidial 10 e 100 vezes maior que a do isolado muito patogênico.

2. INTRODUÇÃO

Verticillium albo-atrum Bke. e Bert. é um dos mais importantes parasitas vasculares de plantas superiores. Sua extensa gama de hospedeiros, que inclui importantes espécies agrícolas, entre elas o tomateiro e sua ampla distribuição de um extremo a outro das regiões temperadas do mundo enfatizam sua importância. No Brasil, é uma doença crônica que pode causar até 30% na queda de produção, sem causar a morte da planta.

Introduções de variedades resistentes têm sido realizadas por diversas companhias industriais e seu cultivo está se generalizando. As variedades Roma VF e Napoli VF representam 70% e 20%, respectivamente, da área de tomateiro industrial no Estado de São Paulo. Estas variedades, entretanto, apresentam diversos defeitos para a industrialização e, principalmente, suscetibilidade a diversas doenças, que normalmente são secundárias para o tomateiro estaqueado. Ademais, a resistência pode ser quebrada pelo surgimento de novo "strain" de *V. albo-atrum*.

Variedades resistentes adaptadas as nossas condições climáticas é o método ideal de controle, pois minimizam o custo de produção e são acessíveis aos agricultores.

Foi realizado um levantamento bibliográfico sobre métodos de inoculação com *V. albo-atrum*, com o objetivo de avaliá-los em nossas condições, para se precisar qual o mais eficiente e viável a ser utiliza-

do em trabalhos de melhoramento de tomateiro. Assim, foram avaliados, utilizando o cultivar "Bonny best", os métodos de infestação de sementes com conídios, infestação de sementes com microescleródios, infestação do solo com conídios, infestação do solo com microescleródios e método de mergulho de raízes em suspensão conidial de *V. albo-atrum*.

Controle biológico de doenças de plantas tem sido tentado pelo uso de organismos não patogênicos, ou pouco patogênicos contra os patogênicos.

Utilizando dois isolados de *V. albo-atrum*, sendo um de baixa e o outro de alta patogenicidade, usando-os em mistura a concentrações diferentes de conídios, pretendeu-se estudar a influência de um isolado sobre o outro no desenvolvimento de murcha em plantas de tomate Santa Cruz var. Kada, para fornecer subsídios aos trabalhos de melhoramento de tomate, visando resistência a *V. albo-atrum*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Muitos "strains" de *Verticillium*, causando murcha em plantas, produzem micélio escuro de repouso ou microescleródio e a posição taxonômica destes tipos tem sido o objeto de muitas controvérsias. Segundo HASTIE (1973), a espécie *V. albo-atrum* (Reinke & Berthold, 1879) tem prioridade sobre *V. dahliae* (Klebahn, 1913). A descrição original tem sido interpretada por muitos autores para incluir micélio escuro de repouso e microesclerócio, sendo *V. albo-atrum* e *V. dahliae* tidos como sinônimos. Entre os autores encontramos: ISAAC (1949), RUDOLPH (1931), EASTON et alii (1972), PRESLEY (1941), BENSON e ASHWORTH, Jr. (1976), GALANOPOULOS e TRIBE (1974), BARNES (1968), SCHNATHORST e MATHRE (1966), etc.

De acordo com WILHELM (1951), *V. albo-atrum* é um fungo invasor do solo, sendo sua existência saprofítica limitada a uma precária locação em material de plantas invadido enquanto patogênico, e sua persistência dependente da durabilidade de estruturas de resistência.

THANASSOULOPOULOS e KITSOS (1974) relataram ser o enfezamento um sintoma típico da murcha de *Verticillium* em tomateiro, especialmente quando as plantas são infectadas no início do estágio de desenvolvimento.

WILHELM (1955) relatou que *Verticillium albo-atrum* persistiu por 13 anos em meio de cultura, sobrevivendo por intermédio de micro-

escleródio no estágio seco da cultura e por 14 anos em solo de campo livre de hospedeiros, refletindo a longevidade da estrutura de resistência.

GREEN, Jr. (1969), estudando o potencial de inóculo e sobrevivência de conídio e microescleródio, determinou que o número mínimo de conídios para 100% de infecção em tomate, usando planta indicadora foi 5×10^4 / de solo, comparado a 100 microescleródios/g de solo. O potencial de inóculo com conídios decresceu de 100% a zero após 3 semanas. Contudo, não houve redução no potencial de inóculo com microescleródio após 7 semanas.

Segundo SCHREIBER e GREEN, Jr. (1962), em solo mineral, a percentagem de infecção em plantas indicadoras, crescidas em solo infestado com microescleródio, não declinou após 82 semanas e com micélio-conídio caiu para zero após 14 semanas.

GREEN, Jr. (1960) constatou que em solo orgânico micélio-conídio não persistiu além de 36 semanas e após 82 semanas, o nível de inóculo no solo não esterilizado infestado com microescleródio foi de 81,3%.

WILHELM (1950) não encontrou nenhuma relação entre tipo de solo, condições climáticas envolventes, ou passado histórico da cultura do terreno, para que a distribuição vertical de *Verticillium* fosse aparente. A máxima profundidade encontrada foi de 0,9 m.

EMMATTY e GREEN, Jr. (1969) demonstraram a sensibilidade de microescleródio a fungistase do solo e a inibição da germinação pela lavagem com água na ausência do solo. Visto que esses propágulos germinaram quando as lixiviações foram descontínuas. A inversão da fungistase do solo pode ser corrigida pela adição de açúcares e amino-ácidos.

Segundo SCHREIBER e GREEN, Jr. (1963), mudanças na rizosfera induzida por exsudatos de raízes de plantas de tomate, aparentemente estimula a germinação de microescleródios, permitindo-lhes entrar a processo de infecção, e que aminoácidos e outros compostos contendo nitrogênio foi a fração de exsudato de raiz de tomate.

ROBERTS (1943), ROBERTS (1944) e WALKER et alii (1954) reportaram que infecções de plantas de tomate por *V. albo-atrum* foram estimuladas pela aplicação de adubos nitrogenados. Aplicações de fosfatos não tinham efeito significativo no progresso da doença, mas uma deficiência em potássio tende a estimulá-la. Em deficiência de nitrogênio ocorreu sempre um retardamento na infecção. Plantas recebendo adequados suprimentos de nutrientes minerais obtiveram grande resistência à infecção.

KIRALY et alii (1970) relataram para cultivo de *Verticillium albo-atrum* "in vitro" que o ótimo desenvolvimento ocorre com pH 5,9-6,3; temperatura de 24-27°C; fonte de carbono a L-arabinose e maltose. A formação de novos "strains com respeito à morfologia, fisiologia e virulência, é o resultado do processo parassexual ou mutação.

NELSON e WILHELM (1953) determinaram que a temperatura letal a *V. albo-atrum* de rosa e tomate foi de 47°C para hifas e conídios e 50°C para hifas, conídios e microescleródios.

POLLOCK e DRYSDALE (1976) explicaram a ausência de *V. albo-atrum* no ápice de plantas inoculadas de tomate de alta resistência, devido a uma redução na colonização secundária, sendo que estes tecidos foram infectados pela inoculação com conídios através do caule.

Na verificação da relação hospedeiro/parasita, entre tomate e isolados patogênicos de *Verticillium*, GRIFFITHS e ISAAC (1966) notaram que a penetração por formas hialinas dos diferentes isolados foi muito mais lenta que para culturas com estruturas de resistência. Em campos de ensaios ficou demonstrada que a patogenicidade das formas hialinas foi reduzida, sugerindo uma falta de agressividade para o isolado na ausência de estruturas de resistência. Frequentemente, formas hialinas não tiveram êxito em penetrar intracelularmente os tecidos da raiz e sim penetração intercelular. Nenhum apressório tem sido demonstrado em *Verticillium*.

Segundo SELMAN e PEGG (1957), o desenvolvimento de plantas jovens de tomate infectadas com *V. albo-atrum* apresenta a área foliar mais reduzida pela infecção, sendo isto devido a uma dificuldade das folhas em se expandirem mais do que a uma diminuição na taxa de produção foliar.

JONES e CRILL (1975) mostraram que sintomas típicos de murcha de *Verticillium* em "seedlings" de tomate, principalmente flacidez, abscisão de cotilédones e impedimento de desenvolvimento da planta, ocorreram com 10-14 dias após inoculação sobre plantas de variedades suscetíveis e tolerantes. Nenhum sintoma de murcha apareceu em "seedlings" inoculados de Tropic, o qual possui o gene Ve para resistência à murcha de *Verticillium*.

KNAVEL et alii (1965) verificaram que enxertos resistentes exibiram descoloração vascular sem a presença de *V. albo-atrum*, indicando que certamente os compostos poderiam ser sintetizados pelos organismos na planta, com subsequente translocação destes compostos, entre os tecidos da planta, para produzir a descoloração vascular. O fungo nunca foi encontrado em tecido, mostrando descoloração vascular e isto indica a possibilidade de toxinas.

HORNER (1953) testou a patogenicidade de *V. albo-atrum* de vários hospedeiros em hortelã pimenta. Constatou que todos os isolados cresceram no caule, e que os sintomas típicos de murcha somente foram expressos por isolados, originalmente obtidos de hortelã pimenta com sintomas de murcha.

LEVY e ISAAC (1976), estudando a colonização de tecido observaram que microescleródios são formados na superfície de planta hospedeira anterior à invasão, sugerindo um pré-requisito para a colonização. Em plantas resistentes, poucas hifas alcançaram a colonização interna, e quando penetraram, raramente progrediram além dos tecidos corticais, onde há produção de microescleródio em contraposição com plantas suscetíveis, que se dá no xilema.

SCHEFFER et alii (1956), analisando os aspectos fisiológicos da murcha de *Verticillium*, observaram que a transpiração foi inibida antecedendo e acompanhando a expressão de sintomas. Desfunção vascular na forma de descoloração e bloqueio dos vasos foi evidente.

Segundo HEALE e GUPTA (1972), altas concentrações de exopectina liase coincidiram com o ataque da murcha, sugerindo que esta enzima pode estar envolvida nos processos, comandando o bloqueio dos vasos do xilema. Nenhuma endopoligalacturonase nem celulase estaria implicando em murchamento, sendo detectadas somente após observação de avançados sintomas.

DIXON e PEGG (1969) concluíram que tiloses sempre ocorrem subsequente a colonização hifálica da raiz, caule e xilema peciolar. Sua formação resultou da reação específica do "strain" do fungo e hospedeiro, não constitui um mecanismo primário de resistência, e que lise de hifas e tiloses não parecem ser relacionadas.

Estudando a invasão vascular de lúpulo, TALBOYS (1958) encontrou que sintomas agudos estavam usualmente associados com intensa colonização micelial do sistema vascular e suaves tiloses. Suaves sintomas estavam associados com escassa colonização micelial e intensas tiloses associadas à hiperplasia do xilema.

De acordo com PEGG e DIXON (1969), tiloses têm sido consideradas como estruturas de defesa do hospedeiro, retardando o desenvolvimento de hifas nos vasos ou a rápida colonização por conídios. Contudo, as tiloses para prevenirem a distribuição do fungo, devem retardar concomitantemente o transporte de água mais eficiente do que seria capaz o patógeno. Além disso, se tiloses podem retardar ou prevenir a distribuição do fungo, elas devem também reduzir a severidade da doença. Isso não foi totalmente constatado.

SINHA e WOOD (1967), analisando resistência e suscetibilidade de plantas de tomate, concluíram que tiloses sugerem ser iniciadas não diretamente por metabólitos do parasita, mas por substâncias formadas

pelo hospedeiro como uma resposta a injúria do parasita. Substâncias anti-fúngicas aparecem nos elementos vasculares, e estas finalmente atingem concentrações, que reduzem ou inibem o crescimento do parasita, causando também lise de hifas.

PEGG e VESSEY (1973) observaram que plantas de tomate sa-
dias e infectadas com *V. albo-atrum* possuíam uma enzima constitutiva, a N acetil-glucosamina, capaz de hidrolizar quitina de hifas. Ele estava presente em extratos de folha, caule, tecidos de raiz e seiva de xilema . A infecção de plantas de tomate resultou num aumento significativo na ati-
vidade da quitinase, que foi muito maior na reação suscetível.

TJAMOS e SMITH (1974), estudando fitoalexinas em tomate, reportaram que segmentos de caule de tomate resistente inoculados com sus-
pensão de esporos de *V. albo-atrum*, acumularam mais o composto antifúngi-
co, Risitina, em tecido vascular, do que segmentos de caule suscetíveis . Risitina não foi detectada em extratos de tecido vascular não inoculado. Diversos outros compostos antifúngicos também foram acumulados em caule , especialmente na variedade resistente. Assim, a reação da variedade re-
sistente a *V. albo-atrum* é considerada como uma resposta hipersensível , envolvendo acúmulo de Risitina e outros compostos como fitoalexina.

De acordo com POLLOCK e DRYSDALE (1976) em plantas de toma-
te de cultivar de baixa resistência inoculadas com *V. albo-atrum*, o aumen-
to de compostos fenólicos, de enzimas e a quantidade de fungo, foi bem maior do que em plantas do cultivar de alta resistência. As diferenças nos níveis dessas substâncias nos 2 cultivares podem ser um reflexo da di-
ferença na quantidade do fungo presente nas plantas.

BELL (1969), citado por POLLOCK e DRYSDALE (1976), sugeriu que a velocidade de produção do inibidor pode ser tão importante como a concentração final na determinação do nível de resistência de um hospedei-
ro.

TOKESHI (1971), estudando proteção cruzada em tomateiro, demonstrou que o cultivar New York resistente a murcha de *Verticillium*, mas

suscetível à murcha de *Fusarium* e o cultivar Heinz 1548, resistente à murcha de *Fusarium*, mas suscetível à murcha de *Verticillium*, quando inoculados simultaneamente em concentrações diferentes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 1 e *Verticillium albo-atrum* apresentaram proteção cruzada com *Verticillium* no cultivar New York e com *Fusarium* no cultivar Heinz 1548.

MULLER (1958), citado por TOKESHI (1971), estudando fitoalexinas, reportou que tubérculos de batata resistentes a uma raça de *Phytophthora infestans* e suscetível a uma segunda, tornou-se resistente a segunda raça se os tubérculos tinham sido pré-inoculados com a raça a qual foram resistentes.

SCHNATHORST (1966), trabalhando com 2 "strains" de *V. albo-atrum* em algodoeiro, sendo um moderado e o outro severamente patogênico, demonstrou que quando o "strain" moderado foi inoculado e uma inoculação desafio com o "strain" severo foi procedida uma semana mais tarde, com o potencial de inóculo inferior ao do "strain" moderado, as plantas foram protegidas da severa murcha de *Verticillium*.

Segundo DAVIS (1967), plantas de tomate foram mais resistentes à murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* quando primeiro inoculadas com formae speciales de *Fusarium oxysporum* não patogênicas ao tomateiro.

De acordo com WILSON (1958), proteção cruzada entre o fungo da ferrugem do feijão, *Uromyces phaseoli typica*, e o vírus do mosaico do fumo (TMV) foi demonstrado em tecidos de folha de feijão. Folhas de feijão infectadas com TMV mostraram uma resistência à ferrugem e folhas com ferrugem mostraram uma resistência à infecção de TMV.

YARWOOD (1956), trabalhando com fungos da ferrugem relatou que uredosporos de *Uromyces phaseoli* foram colocados em folhas de girasol antes da inoculação das folhas com *Puccinia helianthi* ou em companhia com o inóculo, as folhas foram protegidas da infecção de *P. helianthi*. Si

milarmemente, esporos de *P. helianthi* protegeram folhas de feijão da infecção de *Uromyces phaseoli*.

Efeitos marcantes de antagonismo local entre o organismo da ferrugem da aveia, *Puccinia coronata* e o organismo da ferrugem foliar do trigo, *Puccinia recondita*, foram verificados por JOHNSTON e HUFFMAN (1958). Folhas de "seedlings" de trigo suscetível a *Puccinia recondita* foram inoculadas com uredosporos de *Puccinia coronata*, antecedendo a inoculação de *Puccinia recondita*. As pústulas de ferrugem desenvolvidas nas folhas foram poucas em número e de um tipo de infecção diferente daquelas sobre plantas inoculadas só com *Puccinia recondita*.

Segundo LOVREKOVICH e FARKAS (1965) pre-tratamento de folhas de fumo com suspensão de *Pseudomonas tabaci*, mortas pelo aquecimento, tem induzido proteção contra infecção por *Pseudomonas tabaci*.

BOZARTH, HECHT e ROSS (1962) reportaram que folhas de fumo pre-tratadas com *Thielaviopsis basicola* e inoculadas por desafio com TMV e vice-versa, apresentaram muito pequenas e poucas lesões induzidas respectivamente pelo vírus e pelo fungo, do que em plantas controle.

BORLAUG (1945), citado por TOKESHI (1971), estudou o efeito das raças 6 e 11 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* em produção de linho. Plantas inoculadas com uma mistura das raças 6 e 11 tinham muito baixa percentagem de plantas doentes em condições de campo e casa de vegetação.

MATTA (1966), citado por TOKESHI (1971), reportou que sintomas de murcha de *Fusarium* em tomate foram reduzidos em plantas pre-inoculadas com *Verticillium dahliae*, *F. oxysporum* f. sp. *dianthae* e *f. oxysporum* f. sp. *callistephi*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Origem dos Isolados de *V. albo-atrum* e sua Preservação

O isolado T₂, Q₁ e IB669 foram obtidas, respectivamente, de tomateiro procedente de Monte Mor (SP), quiabeiro de Itapuí (SP) e berinjela de Jardinópolis (SP).

Os isolamentos foram efetuados em placas de Petri com Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e posterior preservação em tubos de ensaio com 5 g de solo esterilizado, conforme MENEZES (1975).

Por ocasião das inoculações, procedeu-se a repicagem dos mesmos em placas de Petri com BDA, e daí para tubos de ensaio também com BDA, incubados em estufa a 23-24°C até o momento do preparo do inóculo.

4.2. Cultivares de Tomate

Utilizou-se do cultivar "Bonny Best", gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Hasime Tokeshi, para metodologia de inoculação, e de Santa Cruz Kada, gentilmente cedido pela Cooperativa Central de Cotia (SP), para o estudo de proteção cruzada. "Bonny Best" apresenta alta suscetibilidade a *V. albo-atrum* e Santa Cruz Kada moderada tolerância.

4.3. Preparo do Inóculo

4.3.1. Obtenção e Preparo de Conídios

Na produção de conídios usou-se o meio líquido de Tochinai, cuja composição segundo TUIITE (1969) é de 10,0 g de peptona; 0,5 g de fosfato monopotássico; 0,25 g de sulfato de magnésio; 20,0 g de maltose; 1000 ml de água destilada.

Foram usados frascos de 250 ml, com 100 ml de meio de Tochinai esterilizado a 111°C por 20 minutos. 5 ml de sulfato de estreptomicina a 100 ppm foram colocados em tubos de BDA inclinado com cultura pura do isolado. Após suave agitação, os 5 ml de suspensão fúngica foram transferidos para os frascos de 250 ml, que permaneceram em agitador por 3 a 4 dias. A suspensão conidial foi filtrada em lã de vidro e papel lente para remover fragmentos miceliais (GREEN Jr. 1969). A contagem da suspensão conidial padrão foi realizada no Hemocitômetro de Newbauer. O inóculo foi acondicionado em caixa de isopor com gelo e levada a casa de vegetação onde foi utilizado.

4.3.2. Obtenção e preparo de microescleródios

Na produção de microescleródios foram adicionados 5 ml de sulfato de estreptomicina a 100 ppm em tubo com cultura de *V. albo-atrum*. Após suave agitação, 1 ml de suspensão fúngica foi transferido para placas de Petri com BDA diluído à metade e incubadas em estufa a 23-24°C por 7 a 10 dias. O uso de BDA diluído visou evitar o abundante crescimento vegetativo, promovendo, assim, maior produção de microescleródios.

Após a incubação, procedeu-se a remoção dos microescleródios, adicionando água destilada estéril às placas de Petri e raspando suavemente com pincel.

A suspensão obtida foi passada em peneiras de 200 mesh, que

retinha fragmentos de meio e micélio da suspensão. Seguiu-se filtração em papel de filtro Whatman 1, obtendo no filtrado parte dos conídios, e no papel de filtro microescleródios e conídios.

O papel de filtro foi lavado com água estéril, e por centrifugação a 500 rpm/5 minutos separou-se os conídios por decantação. Os microescleródios foram resuspenso em água estéril e procedeu-se a contagem em lupa com 60 aumentos, usando 0,02 ml de suspensão em lâminas de vidro.

O inóculo foi acondicionado em caixa de isopor com gelo e levado a casa de vegetação, onde foi utilizado.

4.4. Tratamento de Sementes

Sementes de tomate cultivar "Bonny best" foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 5% (Q-Boa) diluída na proporção de 1:10, sob vácuo intermitente por 5 minutos mais 25 minutos em repouso (TOKESHI, 1971), imediatamente lavadas com água destilada estéril 3 vezes e colocadas para secagem à sombra.

4.5. Preparo do Solo

Solo recém esterilizado foi seco ao ar (T.F.S.A.), para se obter o fator de correção do solo (C). Em seguida, foi seco em estufa a 180°C por 6 h (T.F.S.E.), para determinar o teor de umidade da T.F.S.A. (Terra Fina Seca ao Ar).

O fator de correção do solo foi de $C = 0,82$; para ajustes de solo normal a solo seco ao ar. O teor de umidade da T.F.S.A. foi de 4%.

A composição granulométrica do solo revelou: 15,8% de argi-

la; 9,6% de areia muito grossa; 30,2% de areia grossa; 24,8% de areia média; 8,4% de areia fina; 1,7% de areia muito fina; 25,3% de silte.

4.6. Produção de Mudanças de Tomateiro

Mudanças de tomateiro do cultivar "Bonny Best" e Santa Cruz ka da foram obtidas pela sementeira em 6 fileiras em caixas de madeira esterilizadas (41,0 cm x 31,0 cm x 9,5 cm) com solo esterilizado e efetuou-se desbaste para obtenção de mudanças homogêneas e vigorosas.

4.7. Reisolamento

Para constatação da presença de *V. albo-atrum*, em tecidos de xilema com descoloração, os caules das plantas foram imersos em hipoclorito de sódio 5% (Q-Boa), na diluição de 1:10 por 1 minuto. Em seguida, transferiu-se seções de 5-10 mm aseticamente, para placas de Petri com BDA e colocadas em estufa a 23-24°C por 7 dias.

4.8. Crítérios de Avaliação

Para classificação de plantas doentes, baseou-se nos critérios utilizados por TOKESHI (1966) modificado como segue:

- Classe 0 (zero)* - plantas sem sintomas externos ou internos, observados no caule, cortado ao nível do solo;
- Classe 20* - vasos coloridos até 1/5 do comprimento do caule, com ou sem outros sintomas visíveis;
- Classe 40* - vasos coloridos até 2/5 do comprimento do caule, com pelo menos uma folha amarelecida;
- Classe 60* - vasos coloridos até 3/5 do comprimento do caule, com 2 ou mais folhas amarelecidas;

Classe 80 - vasos coloridos até 4/5 do comprimento do caule, maioria de folhas murchas, com exceção do ponteiro;

Classe 100 - vasos coloridos até o ponteiro, plantas mortas ou folhas murchas até o ponteiro.

Todas as plantas foram cortadas ao nível do solo, seccionadas no sentido longitudinal, para constatação da coloração dos vasos do xilema do caule e do pecíolo.

4.9. Esterilização do Solo, Vasos de Alumínio e Caixas de Madeira

Para todos os experimentos, o solo, os vasos e as caixas foram autoclavados a 121°C por 2 horas.

4.10. Experimento I: Metodologia de Inoculação de *V. albo-atrum* em Tomateiro

4.10.1. Infestação de sementes com conídios

Foi montado um experimento inteiramente casualizado, usando-se 4 tratamentos, com 5 repetições e 8 plantas por vaso.

Os tratamentos consistiam em infestação de sementes, previamente tratados, com suspensão de conídios do isolado T₂ nas concentrações de, respectivamente, 3×10^7 ; 3×10^6 ; 3×10^5 e 3×10^4 conídios/ml.

Para isso, 1 g de semente, acondicionada em gaze bem fina, foi mergulhada por 5 minutos em 30 ml da suspensão conidial do tratamento, e, imediatamente, semeada em vasos de alumínio esterilizado com 2 litros de capacidade, com solo recém esterilizado. Após a germinação, procedeu-se o desbaste, deixando 7 plantas periféricas e 1 central.

Foram promovidos choques hídricos nas plantas, para morte de ponta de raízes e liberação de exsudatos, segundo BEKER e SNYDER

(1965), propiciando a germinação dos conídios e a penetração do fungo no hospedeiro. Todos os tratamentos culturais necessários foram empregados.

A avaliação se deu 45 dias após a infestação e semeadura, utilizando-se dos critérios do item 4.8, sendo o experimento A montado em 29/07/77 e avaliado em 12/09/77, e o experimento B em 01/10/77 e avaliado em 15/11/77.

4.10.2. Infestação de sementes com microescleródios.

Foi montado um experimento inteiramente casualizado, usando-se 3 tratamentos, com 5 repetições e 8 plantas por vaso.

Os tratamentos consistiam na peletização de sementes, previamente tratadas, usando-se Carboximetilcelulose (C.M.C.) como adesivo e Vermiculita moída e esterilizada como agente secante. A quantidade de C.M.C. utilizada foi 10,0 g/litro de água. A proporção de microescleródio do isolado T₂ por semente foi de 50:1; 100:1 e 150:1. Os microescleródios foram colocados na solução de C.M.C., e, em seguida, procedeu-se a peletização das sementes.

Sementes peletizadas foram semeadas em vaso de alumínio esterilizado com 2 litros de capacidade, com solo recém esterilizado e procedeu-se o desbaste nos vasos, deixando 7 plantas periféricas e 1 central. Choques hídricos foram promovidos às plantas, para favorecer o ataque do fungo e todos os tratamentos culturais necessários foram devidamente empregados.

A avaliação do experimento se deu 45 dias após a semeadura, em vasos, utilizando-se dos critérios do item 4.8., sendo o experimento A montado em 03/12/77 e avaliado em 17/01/78, e o experimento B em 11/12/77 e avaliado em 25/01/78.

4.10.3. Infestação do solo com conídios

Foi montado um experimento inteiramente casualizado, usando-se 3 tratamentos, com 5 repetições e 8 plantas por vaso.

Os tratamentos consistiam na infestação do solo, com suspensão de conídios do isolado T₂ nas concentrações de, respectivamente, 10⁶ conídios/g de solo, 10⁵ conídios/g de solo e 10⁴ conídios/g de solo, ajustado a solo seco ao ar.

Solo recém esterilizado suficiente para o enchimento de um vaso, e ajustado a solo seco ao ar, foi colocado em bandeja de alumínio. Procedeu-se a infestação com pulverizações intermitentes do solo com suspensões conidiais, misturando bem o solo, para homogeneização da infestação. Foi utilizado um aplicador manual e água destilada como veículo. Sua quantidade variou em função da umidade apresentada pelo solo a ser infestado.

Mudas de tomateiro cultivar "Bonny best" com 12 a 14 dias de idade foram transplantadas para vasos imediatamente após a infestação do solo e cada vaso recebeu 7 plantas periféricas e 1 central, sendo que após o plantio as mudas ficaram 2 a 3 dias sob cobertura de telas de pano para se recuperar do choque do transplante.

Todos os tratos culturais necessários foram devidamente empregados e choques hídricos foram promovidos às plantas, para favorecer o ataque do fungo.

30 dias após plantio das mudas em solo infestado, procedeu-se a avaliação do experimento, utilizando-se dos critérios do item 4.8., sendo o experimento A avaliado em 22/12/77 e o experimento B em 12/01/78. Os resultados foram analisados estatisticamente pela comparação das médias dos tratamentos pelo teste de Tukey (GOMES, 1973).

4.10.4. Infestação do solo com microescleródios

Foi montado um experimento inteiramente casualizado, usando-se 3 tratamentos, 5 repetições e 8 plantas por vaso.

Os tratamentos consistiam na infestação do solo, com microescleródios do isolado T₂, nas quantidades de, respectivamente, 100, 150 e 200 microescleródios/grama de solo ajustado a solo seco ao ar.

Solo recém esterilizado suficiente para o enchimento de um vaso, e ajustado a solo seco ao ar, foi colocado em bandeja de alumínio. Procedeu-se a infestação por intermédio de pulverizações intermitentes ao solo com suspensão de microescleródios, misturando bem o solo para homogeneização da infestação. Utilizou-se de aplicador manual e água destilada como veículo. Sua quantidade variava em função da umidade apresentada pelo solo a ser infestado.

Mudas de tomateiro cultivar "Bonny best" com 12 a 14 dias de idade foram transplantadas para vasos com solo infestado, imediatamente após infestação do solo. Cada vaso recebeu 7 plantas periféricas e 1 central, sendo que após o plantio as mudas ficaram 2 a 3 dias sob cobertura de tela de pano, para se recuperar do choque de transplante.

Todos os tratos culturais necessários foram devidamente empregados e choques hídricos foram promovidos às plantas, para favorecer o ataque do fungo.

30 dias após o plantio das mudas em solo infestado, procedeu-se a avaliação do experimento, utilizando-se dos critérios do item 4.8., sendo o experimento A avaliado em 19/12/77 e o experimento B em 11/01/78. Os resultados foram analisados estatisticamente pela comparação das médias dos tratamentos pelo teste de Tukey.

4.10.5. Mergulho de raízes em suspensões de conídios

Foi montado um experimento inteiramente casualizado, usando-se 3 tratamentos, com 5 repetições e 8 plantas por vaso.

Os tratamentos consistiam no mergulho de raízes em suspensão de conídios do isolado T₂ nas concentrações de, respectivamente, 3×10^5 ; 3×10^6 e 3×10^7 conídios/ml.

Na inoculação usou-se o método de WELLMAN (1939) e um feixe de 50 mudas e 40 ml de inóculo em cada tratamento.

Mudas de tomateiro cultivar "Bonny best" com 12 a 14 dias de idade foram arrancadas das caixas de madeira, procurando não ferir demasiadamente as raízes; procedendo, em seguida, a lavagem das raízes em água corrente de torneira, mergulhando-as na suspensão de conídios e deixando-as em repouso por 3 minutos. Foram plantadas em vaso de alumínio esterilizado com capacidade de 2 litros e com solo esterilizado. Cada vaso recebeu 7 plantas periféricas e 1 central, sendo que após o plantio, as plantas ficaram 2 a 3 dias sob cobertura de tela de pano, para se recuperar do choque do transplante.

Todos os tratos culturais necessários foram empregados e 30 dias após a inoculação, procedeu-se a avaliação do experimento, utilizando-se dos critérios do item 4.8, sendo o experimento A avaliado em 02/12/77 e o experimento B em 21/12/77. Os resultados foram analisados estatisticamente pela comparação das médias dos tratamentos pelo teste de Tukey.

4.11. Experimento II: Proteção Cruzada

Foi montado um experimento inteiramente casualizado, com 8 tratamentos, 5 repetições e 8 plantas por vaso, usando-se dos isolados Q₁ e IB669.

O teste de patogenicidade revelou ser o isolado Q₁ muito patogênico e IB669 de baixa patogenicidade, quando mudas de tomateiro Santa Cruz Kada foram inoculadas pelo método de mergulho de raízes. Os tratamentos usados estão contidos no Quadro abaixo:

Tratamentos	Concentração de Conídios por ml	
	Isolado Q ₁	Isolado IB669
Controle	0	0
T ₁	2x10 ⁶	0
T ₂	0	2x10 ⁶
T ₃	2x10 ⁶	2x10 ⁷
T ₄	2x10 ⁶	2x10 ⁶
T ₅	2x10 ⁶	2x10 ⁵
T ₆	1x10 ⁶	2x10 ⁶
T ₇	2x10 ⁵	2x10 ⁷
T ₈	0	2x10 ⁷

40 ml de suspensão conidial foram utilizados para a inoculação com os isolados individuais. Na mistura de isolados, utilizou-se 20 ml de suspensão de cada isolado. As raízes do tomateiro permaneciam imersas na suspensão conidial por 3 minutos. As mudas inoculadas foram plantadas em vasos de alumínio esterilizados com capacidade de 2 litros, com solo esterilizado. Cada vaso recebeu 7 plantas periféricas e 1 central, e após o plantio as plantas ficaram 2 a 3 dias sob cobertura de tela de pano, para se recuperar do choque do transplante.

Todos os tratamentos culturais necessários foram devidamente empregados e 30 dias após inoculação das plantas, procedeu-se a avaliação do experimento, utilizando-se dos critérios do item 4.8. sendo o experimento A avaliado em 21/01/78 e o experimento B em 25/01/78. Os resultados foram analisados estatisticamente pela comparação das médias dos tratamentos pelo teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento I: Metodologia de Inoculação de *Verticillium albo-atrum* em Tomateiro.

5.1.1. Infestação de sementes com conídios.

Em nenhum dos tratamentos as plantas apresentaram descoloração vascular ou sintomas foliares, e não se conseguiu reisolar o fungo das raízes e caules de plantas oriundas de sementes infestadas.

O desinfetante usado no tratamento das sementes poderia interferir na penetração do fungo nas plantas. Assim, usando sementes tratadas com o desinfetante e sementes tratadas com água estéril, constatou-se a não penetração do fungo nas plantas, mesmo em infestação com pesada concentração de conídios.

A não colonização dos tecidos vasculares pode ser explicada assim: a) possivelmente a temperatura do solo atingiu valores superiores ao máximo, suportado pelos conídios infestantes da semente, impedindo ou prejudicando a germinação, ou penetração do fungo. ZENTMYER (1949) observou que em inoculações com conídios nenhum sintoma de murcha de *Verticillium* ocorreu em abacateiro quando a temperatura do solo atingiu 35°C; b) em campo naturalmente infestado com conídios de *V. albo-atrum*, quando plantas suscetíveis estão presentes exsudam substâncias, que propiciam a germinação desses propágulos segundo SCHREIBER e GREEN,

Jr. (1963). Em plantas provenientes de sementes infestadas com conídios, o fenômeno pode não ocorrer, ou ocorrer tardiamente, por ocasião dos choques hídricos, quando os conídios já perderam sua viabilidade.

5.1.2. Infestação de sementes com microescleródios

Apenas 5% do total das plantas do experimento apresentaram descoloração vascular e sintomas foliares. Aqui também, a não colonização dos tecidos vasculares pode ser explicada, assim: a) possivelmente, a temperatura do solo atingiu valores superiores ao máximo suportado para germinação dos microescleródios ou penetração do fungo. BENSON e ASHWORTH, Jr. (1976) infestaram solo com microescleródios e constataram que estes propágulos permaneciam viáveis às temperaturas de 26--30°C; b) em campo naturalmente infestado com microescleródios de *V. albo-atrum*, quando plantas suscetíveis estão presentes, exsudam substâncias, que propiciam a germinação desses propágulos, segundo SCHREIBER e GREEN, Jr. (1963). Em plantas provenientes de sementes infestadas com microescleródios, o fenômeno pode não ter ocorrido, ou ocorrido tardiamente com os choques hídricos. Em compensação, o estado fisiológico da planta não propiciou a penetração e colonização dos tecidos vasculares.

5.1.3. Infestação do solo com conídios

No tratamento T_1 com 10^4 conídios/grama de solo seco ao ar não ocorreu colonização dos tecidos do xilema e sintomas externos nas plantas. Contudo, nos tratamentos T_2 e T_3 respectivamente 10^5 e 10^6 conídios/grama de solo seco ao ar, as plantas apresentaram sintomas externos e descoloração vascular (Tabela 1)

As análises de variâncias dos experimentos A e B (Tabelas 3 e 4, no Apêndice) revelam não ocorrer diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre T_2 e T_3 , quando suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey com $\Delta = 19,65$ e $10,64$ respectivamente.

Os resultados dos experimentos A e B discordaram dos apresentados por GREEN, Jr. (1969), onde as plantas foram mantidas em câmara de crescimento, sob uma condição de 14 horas de luz diária a 28°C e 20°C no escuro.

Os resultados dos mesmos experimentos revelam que o potencial de inóculo requerido com conídios, para promover infecção nas plantas, mesmo em baixo nível de infecção, é relativamente alto, sugerindo que esses propágulos sejam de pequena significância como inóculo do solo.

Possivelmente, devido às altas temperaturas registradas no decorrer dos experimentos, atingindo algumas vezes 34,5°C, foi bloqueado ou prejudicado o estabelecimento do ciclo das relações patógeno-hospedeiro. Segundo GRIFFITHS e ISAAC (1966) a temperatura ótima de estabelecimento da relação patógeno-hospedeiro é aproximadamente 25°C.

5.1.4. Infestação do solo com microescleródios

Os tratamentos T_1 , T_2 e T_3 respectivamente 100, 150 e 200 microescleródios/grama de solo seco ao ar, apresentaram suas plantas com sintomas externos e descoloração vascular (Tabela 1).

As análises de variância dos experimentos A e B (Tabelas 5 e 6, no Apêndice) revelam não ocorrer diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos T_1 , T_2 e T_3 , quando suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey com $\Delta = 23,61$ e $21,96$ respectivamente.

Os resultados dos experimentos A e B estão em conformidade com os apresentados por GREEN, Jr. (1969).

Sendo os microescleródios estruturas de resistência do fungo, certamente os efeitos das condições ambientais, principalmente a temperatura, foram menos prejudiciais do que para os conídios usados na infestação do solo. A sobrevivência dos microescleródios superou a dos conídios, propiciando maior chance de infectar as plantas.

Apesar de terem sido conduzidos em épocas diferentes, as flutuações de temperaturas foram basicamente idênticas nos dois experimentos, tendo a temperatura do ar atingido 34,5°C em alguns dias.

5.1.5. Mergulho de raízes em suspensão conidial.

Os tratamentos T_1 , T_2 e T_3 respectivamente 3×10^5 , 3×10^6 e 3×10^7 conídios/ml de suspensão, apresentaram suas plantas com sintomas externos e descoloração vascular (Tabela 1).

A análise de variância do experimento A (Tabela 7, no Apêndice) revela ocorrer diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre T_3 e T_1 , quando suas médias foram comparadas pelo Teste de Tukey com $\Delta = 10,98$.

A análise de variância do experimento B (Tabela 8, no Apêndice) revela ocorrer diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade entre T_3 e T_1 e entre T_3 e T_2 , quando suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey com $\Delta = 8,26$.

Os resultados dos experimentos A e B revelam, provavelmente, o efeito das épocas de condução dos experimentos, em que as condições de luz e temperatura foram bem diferentes. O experimento B foi conduzido em época mais chuvosa ou mais nublada, ocorrendo assim, temperaturas mais baixas que favoreciam o ataque do fungo.

Este método foi o mais drástico na infecção das plantas, que se mostraram inicialmente enfezadas, devido ao ataque do patógeno. Apresenta grande viabilidade prática.

Dos métodos estudados, foi aquele em que a expressão dos primeiros sintomas ocorreu mais cedo, de 7 a 10 dias após a inoculação.

Tabela 1. Estimativas das médias dos tratamentos, 30 dias após a infestação do solo ou inoculação de plantas com *Verticillium albo-atrum**

Tratamentos	Métodos de Inoculação					
	ISC		ISMe		MR	
	EXP.A	EXP.B	EXP.A	EXP.B	EXP.A	EXP.B
C	0	0	0	0	0	0
T ₁	0	0	37,50 ^a	40,00 ^a	49,00 ^b	56,00 ^c
T ₂	8,00 ^a	8,50 ^a	42,50 ^a	44,00 ^a	54,00 ^{ab}	59,50 ^{bc}
T ₃	20,00 ^a	18,50 ^a	55,00 ^a	49,00 ^a	63,00 ^a	69,00 ^a

* - Média de 5 repetições, 1 vaso com 8 plantas por repetição.

ISC -Infestação do solo com conídios.

ISMe -Infestação do solo com microescleródios

MR -Mergulho de raízes em suspensão de conídios.

EXP.A -Experimento A

EXP.B -Experimento B

C -Controle

T₁ -10⁴ conídios/g de solo seco ao ar, 100 microescleródios/g de solo seco ao ar e 3 x 10⁵ conídios/ml de suspensão, respectivamente para ISC, ISMe e MR.

T₂ -10⁵ conídios/g de solo seco ao ar, 150 microescleródios/g de solo seco ao ar e 3 x 10⁶ conídios/ml de suspensão, respectivamente para ISC, ISMe e MR.

T₃ -10⁶ conídios/g de solo seco ao ar, 200 microescleródios/g de solo seco ao ar e 3 x 10⁷ conídios/ml de suspensão, respectivamente para ISC, ISMe e MR.

- Médias com a mesma letra em uma coluna são estatisticamente idênticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

- Critérios de avaliação conforme item 4.8. de Materiais e Métodos.

5.2. Experimento II: Proteção Cruzada

Em todos os tratamentos as plantas apresentaram sintomas externos e descoloração vascular.

Quando os dois isolados foram misturados na mesma proporção (T_4), nenhuma proteção foi conseguida. O mesmo ocorreu, quando a concentração do isolado muito patogênico correspondia à metade da concentração do isolado pouco patogênico (T_6). Utilizando-se a concentração conidial do isolado pouco patogênico, 10 vezes maior que a do isolado muito patogênico (T_3), a proteção passou a ser manifestada. O maior grau de proteção cruzada foi conseguido, quando a concentração do isolado pouco patogênico foi 100 vezes maior que a do isolado muito patogênico (T_7), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Estimativas das médias dos tratamentos, 30 dias após a inoculação, pelo método de mergulho de raízes, com suspensão conidial do isolado Q_1 e IB669 de *Verticillium albo-atrum**.

Tratamentos	Concentração de Inóculo por ml			
	Isolado Q_1	Isolado IB669	Experimento A	Experimento B
C	0	0	0	0
T_1	2×10^6	0	54,00 ^b	58,00 ^b
T_2	0	2×10^6	16,50 ^a	22,50 ^a
T_3	2×10^6	2×10^7	34,00 ^a	37,00 ^a
T_4	2×10^6	2×10^6	52,50 ^b	55,00 ^b
T_5	2×10^6	2×10^5	46,00 ^b	53,00 ^b
T_6	1×10^6	2×10^6	48,00 ^b	52,50 ^b
T_7	2×10^5	2×10^7	20,00 ^a	24,50 ^a
T_8	0	2×10^7	17,50 ^a	23,50 ^a

- * - Média de 5 repetições, com 1 vaso com 8 plantas por repetição
- Média com a mesma letra em uma coluna são estatisticamente idênticas ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.
- Critérios de avaliação conforme o item 4.3 de Materiais e Métodos.

As análises de variâncias dos experimentos A e B (Tabelas 9 e 10, no Apêndice) revelam que T_1 , T_4 , T_5 e T_6 diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade de T_2 , T_3 , T_7 e T_8 , quando suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey com $\Delta = 13,54$ e $9,10$ respectivamente.

Os experimentos A e B foram conduzidos na mesma época e revelaram que o mecanismo da proteção cruzada está relacionado com as proporções de inóculo de cada um dos dois isolados usados nas inoculações. Estes resultados estão em conformidade com os de SCHNATHORST e MATHRE (1966) que estudaram proteção cruzada em algodoeiro com isolados de *Verticillium albo-atrum*, e com TOKESHI (1971) que obteve proteção cruzada entre *Fusarium* e *Verticillium* em tomateiro.

A interação de dois isolados, de patógenos de plantas, é muito importante nos programas de melhoramento, visando variedades resistentes às doenças.

A proteção cruzada é um mecanismo de controle biológico. Assim, sementes transportando internamente uma estirpe pouco patogênica, podem ser usadas como medida de controle biológico de uma estirpe mais patogênica.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

1. A infestação de sementes com conídios não propiciou a penetração do patógeno em nenhuma planta,
2. A infestação de sementes com microescleródios não apresentou resultados favoráveis, pois o número de plantas com sintomas foi insignificante.
3. A infestação do solo com conídios não foi expressiva como método de inoculação.
4. A infestação do solo com microescleródios é eficiente para trabalhos de inoculação.
5. O mergulho de raízes, em suspensão conidial, foi o que apresentou melhores resultados.
6. A interação de dois isolados de *V. albo-atrum*, distintos em patogenicidade, promoveu alto nível de proteção cruzada.
7. O grau de proteção cruzada dependeu da concentração de inóculo do isolado protetor.

7. SUMMARY

Methods of inoculating *Verticillium albo-atrum* in tomatoes were investigated with the objective of supplementing other studies in trying to obtain resistance to wilt due to *Verticillium*. Also investigated was the effects of cross-protection by two isolates with different degrees of pathogenicity in the same host plant.

All the experiments were carried out in a green house whose temperature could be partially controlled. Methods of inoculation were realised during different seasons and therefore they cannot be compared statistically.

Pricking roots of tomato plants kept in conidial suspension provoked a very drastic reaction in these plants; they suffered very heavily and the appearance of external symptoms was very rapid. Most likely this method would have been better appreciated if it had been executed simultaneously with other methods of infesting the soil with microesclerotia, infestation of seeds with conidia or microsclerotia; however, this is purely speculative.

The interaction of two isolates of *V. albo-atrum* induced a high degree of cross-protection in tomatoes when the conidial concentration of the less pathogenic isolate was 10 and 100 times more than that of the more pathogenic one.

8. LITERATURA CITADA

- BAKER, K.F. e W.C. SNYDER, 1965. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In: Ecology of Soil-borne plant pathogens. University of California Press, Berkley, Los Angeles, p.170-186.
- BARNES, E.H., 1968. Atlas and Manual of Plant Pathology. New York, A. C.C. Division of Meridith Corporation, 325 p.
- BENSON, D.M. e L.J. ASHWORTH, Jr., 1976. Survival of *Verticillium albo-atrum* on nonsuscept roots and residues in field soil. *Phytopathology* 66:883-887.
- BOZARTH, R.F., E.I. HECHT e A.F. ROSS, 1962. Systemic acquired resistance against tobacco mosaic virus resulting of localized infections by *Thielaviopsis basicola* in tobacco leaves. *Phytopathology* 52:4 (Abstr.)
- DAVIS, D., 1967. Cross protection in *Fusarium* wilt diseases. *Phytopathology* 57:311-314.
- DIXON, G.R. e G.F. PEGG, 1969. Hyphal lysis and tylose formation in tomato cultivars infected by *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 53:109-118.
- EASTON, G.D., M.E. NAGLE e D.L. BAILEY, 1972. *Verticillium albo-atrum* carried by certified seed potatoes into Washington and control by chemicals. *Am. Potato J.* 49:397-402.
- EMMATTY, D.A. e R.J. GREEN; Jr., 1969. Fungistasis and the behavior of the microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* 59:1590-1595.
- GALANAPOULOS, N. e H.T. TRIBE, 1974. Conidial survival in *Verticillium dahliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 63:85-91.

- GREEN Jr., R.J., 1960. The survival of *Verticillium albo-atrum* in muck soils. *Phytopathology*, 50:637.
- GREEN Jr., R.J., 1969. Survival and inoculum potential of conidia and microesclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology* 59:874-876.
- GOMES, F. PIMENTAL, 1973. Curso de Estatística Experimental. 5a. Edição. São Paulo, Livraria Nobel S.A. 430 p
- GRIFFITHS, D.A. e I. ISAAC, 1966. Host/parasite relationships between tomato and pathogenic isolates of *Verticillium*. *Ann. Appl. Biol.* 58:259-272.
- HASTIE, A.C., 1973. Hybridization of *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 60:511-523.
- HEALE, J.B. e D.P. GUPTA, 1972. Mechanism of vascular wilting induced by *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 58:19-28.
- HORNER, C.E., 1953. Pathogenicity of *Verticillium* isolates from various hosts on peppermint. *Phytopathology* 43:588.
- ISAAC, I., 1949. A comparison study of pathogenic isolates of *Verticillium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 32:138-157.
- JOHNSTON, C.O. e M.D. HUFFMAN, 1958. Evidence of local antagonism between two cereal rust fungi. *Phytopathology* 48:69-70.
- JONES, J.P. e P. CRILL, 1975. Reaction of resistant, tolerant and susceptible tomato varieties to *Verticillium* wilt. *Plant Dis. Reprtr.* 59:3-6
- KIRALY, Z., Z. KLEMENT, F. SOLYNDY e S. VOROS, 1970. *Verticillium* wilt. p. 427-433. In: Methods in Plant Pathology. Budapest, Akadémiai Kiadó.
- KNAVEL, D.E., H.C. MOHR e C.E. CHAPLIN, 1965. Reaction of tomato varieties to *Verticillium* wilt and movement of the organism through grafted plants. *Am. Soc. Hort. Sci.* 87:415-419.
- LEVY, J. e I. ISAAC, 1976. Colonization of host tissue of varying resistance to *Verticillium dahliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67:91-94
- LOVREKOVICH, L. e G.L. FARKAS, 1965. Induced protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. *Nature*, 205:823-824.
- MENEZES, M. 1975. Preservação de patógenos no melhoramento de plantas. Apostila, Piracicaba, ESALQ-USP, 26 p.

- NELSON, P.E. e S. WILHELM, 1953. Thermal death range of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 43:589.
- PEGG, G.F. e G.R. DIXON, 1969. The reactions of susceptible and resistant tomato cultivars to strains of *Verticillium albo-atrum*. *Ann. appl. Biol.* 63:389-400.
- PEGG, G.F. e J.C. VESSEY, 1973. Chitinase activity in *Lycopersicon esculentum* and its relationship to the in vivo lysis of *Verticillium albo-atrum* mycelium. *Physiol. Plant Path.* 3:207-222.
- POLLOCK, C.J. e R.B. DRYSDALE, 1976. The growth of *Verticillium albo-atrum* in two cultivars of tomato. *Phytopathology Z.* 86:353-356.
- POLLOCK, C.J. e R.B. DRYSDALE, 1976. The role of phenolic compounds in the resistance of tomato cultivars to *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology Z.* 86:56-66.
- PRESLEY, J.T., 1941. Saltants from a monospore culture of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 31:1135-1139.
- ROBERTS, F.M., 1943. Factors influencing infection of the tomato by *Verticillium albo-atrum*. *Ann. Appl. Biol.* 30:327-331.
- ROBERTS, F.M., 1944. Factors influencing infection of the tomato by *Verticillium albo-atrum* II. *Ann. Appl. Biol.* 31:191-193.
- RUDOLPH, B.A., 1931. *Verticillium* hadromycosis. *Hilgardia* 5:197-353.
- SCHFFER, R.P., S.S. GOTHOSKAR, C.F. PIEROSON e R.P. COLLINS, 1956. Physiological aspects of *Verticillium* wilt. *Phytopathology* 46:83-87.
- SCHNATHORST, W.C. e D.E. MATHRE, 1966. Cross-protection in cotton with strains of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 56:1204-1209.
- SCHREIBER, L.R. e R.J. GREEN, Jr., 1962. Comparative survival of mycelium, conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in mineral soil. *Phytopathology* 52:288-289.
- SCHREIBER, L.R. e R.J. GREEN, Jr., 1963. Effect of root exudates on germination of conidia, and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by the soil fungistatic principle. *Phytopathology* 53:260-264.
- SELMAN, I.W. e G.F. PEGG, 1957. An analysis of the growth response of young tomato plants to infection by *Verticillium albo-atrum*. *Ann. Appl. Biol.* 45:674-681.
- SELMAN, G.W.F., 1959. Direct observation of *Verticillium albo-atrum* in soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 42:312-321.

- SINHA, A.K. e R.K.S. WOOD, 1967. An analysis of responses of resistant and of susceptible tomato plants to *Verticillium* infection. *Ann. Appl. Biol.* 59:143-154.
- TALBOYS, P.W., 1958. Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 41:249-260.
- THANASSOULOPOULOS C.C. e G.T. KITSOS, 1974. Stem length of tomato for evaluating the severity of attack by *Verticillium* wilt. *Phytopathology* 64:258-261.
- TJAMOS, E.C. e I.M. SMITH, 1974. The role of phytoalexins in the resistance of tomato to *Verticillium* wilt. *Physiol. Plant Path.* 4: 249-259.
- TOKESHI, H., 1966. Murcha de *Fusarium* em tomateiro. Estudo da variabilidade do patógeno e hospedeiro. Piracicaba, ESALQ, 64 p. (tese Livre-Docência).
- TOKESHI, H., 1971. Cross-protection in tomato with *Fusarium* and *Verticillium* wilt pathogens. The Ohio State University, 72 p (Ph.D. Thesis).
- TUITE, J., 1969. Plant Pathological methods fungi and bacteria. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 239 p.
- WALKER, J.C., M.E. GALEGLY, Jr., J.R. BLOOM e R.P. SCHEFFER, 1954. Relation of plant nutrition to disease development. VII. *Verticillium* wilt of tomato. *Amer. J. Bot.* 41:760-762.
- WELLMAN, F.L., 1939. A technique for studying host resistance and pathogenicity in tomato *Fusarium* wilt. *Phytopathology* 29:945-956.
- WILHELM, S., 1950. Vertical distribution of *Verticillium albo-atrum* in soils. *Phytopathology* 40:368-376.
- WILHELM, S., 1951. Is *Verticillium albo-atrum* a soil invader or a soil inhabitant? *Phytopathology* 41:944-945.
- WILHELM, S., 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* 45:180-181.
- WILSON, E.M., 1958. Rust-TMV., cross-protection and necrotic-ring reaction in bean. *Phytopathology* 48:228-231.
- YARWOOD, C.E., 1956. Cross protection with two rust fungi. *Phytopathology* 46:540-544.
- ZENTMYER, G.A., 1949. *Verticillium* wilt of avocado. *Phytopathology* 39:677-682.

9. APÉNDICE

Tabela 3. Análise de variância da infestação do solo com conídios de *V. albo-atrum*. Experimento A

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	366,02	366,02	2,03 ^{n.s}
Resíduo	8	1.445,20	180,65	
Total	9	1.811,22		

$$S = 13,44$$

$$C.V. = 95,66\%$$

$$\Delta = 19,56.$$

Tabela 4. Análise de variância da infestação do solo com conídios de *V. albo-atrum*. Experimento B.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	250,00	250,00	4,68 ^{n.s}
Resíduo	8	427,50	53,44	
Total	9	677,50		

$$S = 7,31$$

$$C.V. = 54,15\%$$

$$\Delta = 10,64.$$

Tabela 5. Análise de variância de infestação do solo com microescleródios de *V. albo-atrum*. Experimento A.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	2	812,50	406,25	2,06 n.s.
Resíduo	12	2.362,50	196,88	
Total	14	3.175,00		

S = 14,03

C.V. = 31,18%

Δ = 23,61

Tabela 6. Análise de variância da infestação do solo com microescleródios de *V. albo-atrum*. Experimento B

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	2	222,53	111,27	0,65 n.s.
Resíduo	12	2.042,20	170,18	
Total	14	2.264,73		

S = 13,05

C.V. = 29,35%

Δ = 21,96

Tabela 7. Análise de variância de inoculação de raízes em suspensão conidial de *V. albo-atrum*. Experimento A.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	2	503,33	251,67	5,95 *
Resíduo	12	507,50	42,29	
Total	14	1.010,83		

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade

S = 6,50

C.V. = 11,75%

Δ 10,94

Tabela 8. Análise de variância de inoculação de raízes em suspensão conidial de *V. albo-atrum*. Experimento B.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	2	524,13	262,07	10,86 *
Resíduo	12	289,60	24,13	
Total	14	813,73		

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade

S = 4,91

C.V. = 7,98%

Δ = 8,26.

Tabela 9. Análise de variância da inoculação com suspensão conidial dos dos isolados Q₁ e IB669 de *V. albo-atrum*. Experimento A.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	7	9.108,59	1.301,23	29,69*
Resíduo	32	1.402,50	43,83	
Total	39	10.511,09		

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade

$$S = 6,62$$

$$C.V. = 18,36\%$$

$$\Delta = 13,54$$

Tabela 10. Análise de variância da inoculação com suspensão conidial dos isolados Q₁ e IB669 de *V. albo-atrum*. Experimento B.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	7	8.487,50	1.212,50	57,22 *
Resíduo	32	678,00	21,19	
Total	39	9.165,50		

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade

$$S = 4,60$$

$$C.V. = 12,29\%$$

$$\Delta = 9,10$$