

MURCHA DE VERTICILLIUM EM TOMATEIRO:

I. INFLUÊNCIA DO POTENCIAL DE INÓCULO DE *VERTICILLIUM DAHLIAE* NO COMPORTAMENTO DAS VARIEDADES DE TOMATEIRO ANGELA HIPER E MARMANDE VR¹

PAULO CEZAR CEREZINE², CHUKICHI KUROZAWA³ e MARTHA MARIA MISCHAN⁴

RESUMO - O comportamento das variedades de tomateiro Angela Hiper, suscetível, e Marmande VR, resistentes à raça 1 de *Verticillium dahliae*, sob diferentes potenciais de inóculo do patógeno, foi estudado em condições controladas. A inoculação das plântulas foi realizada de 13 a 15 dias após a sementeira, através de imersão de raízes, por 15 minutos, em suspensões de inóculo ajustadas a diferentes concentrações. Para potenciais de inóculo de 10⁴, 10⁵ e 10⁶ conídios/ml, a evolução da doença e a severidade dos sintomas de murcha vascular foi tanto maior, em ambas as variedades, quanto mais elevado o potencial de inóculo dos isolados T-1386 e T-1439 de *V. dahliae*. Já para o isolado T-1135, a variedade Marmande VR apresentou índices de doença muito baixos e lenta evolução de sintomas de quaisquer dos três potenciais de inóculo utilizados, sendo possível diferenciá-la da variedade Angela Hiper. O mesmo foi observado para os isolados T-1289 e T-1355 inoculados com 10⁶ e 10⁷ conídios/ml. Entretanto, inoculações com o isolado T-1289 à concentração de 10⁶ conídios/ml proporcionaram elevados índices de doença na variedade Marmande VR, muito embora a mesma tenha se comportado como resistente em potenciais inferiores. O potencial de cerca de 10⁶ conídios/ml mostrou ser o mais adequado para uso na identificação de raças do patógeno através da observação da reação das variedades Angela Hiper e Marmande VR de tomateiro, em condições controladas.

Termos para indexação: *Lycopersicon esculentum*, doença vascular, *V. albo-atrum* (forma microesclerótica), raças fisiológicas, variedades diferenciadas.

VERTICILLIUM WILT OF TOMATO:

I. INFLUENCE OF INOCULUM POTENTIAL OF *VERTICILLIUM DAHLIAE* ON THE BEHAVIOR OF TOMATO VARIETIES ANGELA HIPER AND MARMANDE VR

ABSTRACT - The tomato varieties Angela Hiper (susceptible) and Marmande VR (race-1 *Verticillium*-resistant) showed different behavior, depending on inoculum concentration and on the isolate used. The higher the inoculum potential of T-1386 and T-1439 isolates, the greater both the development of the disease and the severity of the wilting symptoms. Very low severity levels of wilting and slow disease development were observed when race-1-resistant cultivar Marmande VR was inoculated with T-1335 isolate at the three desired concentrations (10⁴, 10⁵ and 10⁶ conidia/ml, and its reaction was then distinguished from Angela Hiper one. A similar event occurred when T-1289 and T-1335 isolates were inoculated on Marmande VR cultivar at 10⁶ and 10⁷ conidia/ml. Nevertheless, high severity levels of wilting symptoms were observed when T-1289 isolate was inoculated on Marmande VR at inoculum concentrations of 10⁶ conidia/ml, although that variety had behaved like the resistant one when inoculated with this isolate at lower concentrations. Inoculum at concentration of 10⁶ conidia/ml was the most proper one for identifying physiological races of *V. dahliae* through measurements of the reaction of Angela Hiper and Marmande VR tomato varieties under controlled conditions.

Index terms: *Lycopersicon esculentum*, wilt disease, *V. albo-atrum* (microsclerotial form), physiological races, race-specific varieties.

INTRODUÇÃO

A murcha de *Verticillium* em tomateiro vem se tornando ao longo dos anos, uma grave doença para a cultura, em decorrência do plantio intensivo em solos que anteriormente abrigaram hospedeiros suscetíveis, contribuindo para o aumento da densidade de inóculo do patógeno. Além disso, a cultivar de tomateiro

¹ Aceito para publicação em 4 de julho de 1991. Trabalho apresentado à F.C.A. - UNESP/Botucatu, para obtenção do título M.Sc. Financiado com recursos da FAPESP.

² Eng.-Agr., M.Sc., IAPAR, Polo Regional de Curitiba, Caixa Postal 2301, CEP 80001, Curitiba, PR.

³ Eng.-Agr., Prof.-Tit., Dep. de Defesa Fitossanitária, F.C.A. - UNESP - Campus de Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18600 Botucatu, SP.

⁴ Enga.-Agr., Dra., Prof.-Assist., Dep. de Bioestatística, I.B. - UNESP - Campus de Botucatu.

estaqueado, Angela, a mais plantada atualmente, do grupo Santa Cruz, é altamente suscetível à doença (Kurozawa & Ueno 1987).

O patógeno, através da produção de grande quantidade de pseudoesclerócios (microesclerócios) nos tecidos mortos dos hospedeiros, é capaz de sobreviver no solo por longos períodos (Nelson 1950, Wilhelm 1955). Por outro lado, o amplo espectro de espécies de plantas das diversas famílias botânicas, inclusive plantas daninhas, que são infectadas por *V. dahliae*, garantem sua sobrevivência tornando ineficiente a aplicação de medidas de controle por rotação de culturas (Silva 1978). Por sua vez, a especificidade dos mecanismos de patogenicidade e as dificuldades em se controlar o patógeno estabelecido fazem da resistência varietal o método de controle de maior aplicabilidade e eficiência. Dessa forma, a partir de uma linhagem selvagem de tomateiro proveniente do Peru, foi introduzido um gene de herança simples (Ve) responsável por conferir resistência ao patógeno da murcha vascular de *Verticillium* em cultivares americanas de tomateiro para indústria (Schaible et al. 1951). Essa medida representou um grande avanço no controle da doença. Alguns anos depois, entretanto, foi constatado, em diversos países produtores de tomate para a indústria, o ataque severo de uma segunda raça de *V. dahliae* a variedades de tomateiro consideradas resistentes ao patógeno. Esse fato suscitou estudos mais abrangentes sobre a variabilidade patogênica do fungo (Alexander 1962, Cirulli 1969, Hall et al. 1972, Pegg 1974, Tjamos 1980, O'Brien & Hutton 1981). Laterrot et al. (1983) constataram a ocorrência da raça 2 de *Verticillium* afetando tomateiro industrial no estado de Pernambuco. Recentemente, duas novas linhagens de tomateiro (Ohio 11 e 12) com resistência à raça 2 de *V. dahliae* foram obtidas na Universidade de Ohio, EUA, através de programas de melhoramento genético (Berry & Oakes 1987).

A escassez de informações acerca da ocorrência de raças de *Verticillium* nas condições do estado de São Paulo tornou-se um fato limitante para a execução de um programa

racional de melhoramento de tomateiro que vise à incorporação de resistência ao agente causal da murcha de *Verticillium*. Sob esse aspecto, a definição inicial de parâmetros metodológicos que auxiliem na detecção de raças de *Verticillium* em nossas condições faz-se necessária.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do potencial de inóculo de *V. dahliae* sobre o comportamento de duas variedades de tomateiro diferenciadoras de raças do patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido sob condições de sala climatizada, com temperatura mantida entre 19 e 26°C, e a iluminação fornecida por um conjunto de oito lâmpadas fluorescentes de 40 watts cada e seis lâmpadas de luz mista, tipo M.L., de 160 watts cada, ambas da marca Phillips. Tal conjunto estava situado a 0,80 m de uma base de 1,5 x 1,2 m de dimensões, proporcionando cerca de 4.000 lux de intensidade luminosa. O regime de iluminação, alternado com escuridão, foi de 10 x 14 horas diárias.

Os isolados de *V. dahliae* utilizados (Tabela 1) foram obtidos de materiais vegetais de tomateiros infectados, coletados nos municípios de Botucatu e Indaiatuba, SP., procedendo-se ao isolamento do fungo em meio de cultura M.P.A. (maltese, 4 g; peptona, 1 g; ágar, 12 g; água destilada q.s.p. 1.000 ml) mediante a transferência de pequenas porções de tecido vascular infectado. Após quatro dias de incubação a 24°C, as colônias obtidas foram transferidas para o meio de M.P.A., para purificação dos isolados do fungo, e as culturas conservadas, à temperatura ambiente, em água destilada esterilizada, conforme metodologia de Castellani (Figueiredo 1967), e em substrato esterilizado composto por uma parte de areia grossa lavada, duas partes de esterco de curral curtido e peneirado, com 2% (p/p) de farinha de aveia e 20 ml de água destilada/100 ml de substrato.

Para a obtenção de mudas e cultivo do tomateiro utilizou-se substrato previamente autoclavado a 121°C (1 atm) por duas horas, preparado pela mistura de uma parte de areia grossa lavada, uma parte de esterco de curral curtido e peneirado, e uma parte de solo Latossolo Roxo. De acordo com análises químicas prévias, complementou-se o substrato com 275 µg de P₂O₅/cm³ (120 µg de P/cm³), sob a

TABELA 1. Relação de isolados de *Verticillium dahliae*.

Código	Local de origem	Hospedeiro	Data de isolamento
T-1289	Botucatu, S.P.	tomateiro	11.06.86
T-1335	Botucatu, S.P.	tomateiro "Angela"	28.11.86
T-1386	Botucatu, S.P.	tomateiro "Angela Zambom"	28.04.87
T-1439	Indaiatuba, S.P.	tomateiro "Angela Hiper"	14.09.87

forma de termo-fosfato magnésiano (18% de P_2O_5 ; 26,5% de CaO e 14,5% de MgO) e $130 \mu\text{g}$ de K_2O/cm^3 , sob a forma de KCl (60% de K_2O). Posteriormente à adubação, análises químicas do substrato indicaram valores médios de pH em CaCl_2 de 6,10 unidades; 1,4 meq de $H^+ + Al^{3+}/100 \text{ cm}^3$, 4,0 meq de $Ca^{2+}/100 \text{ cm}^3$, 2,8 meq de $Mg^{2+}/100 \text{ cm}^3$ e 1,47 meq de $K^+/100 \text{ cm}^3$ trocáveis; soma de bases (S) igual a 8,27 meq/100 cm^3 ; CTC igual a 9,65 meq/100 cm^3 ; saturação de bases (V) igual a 85,7% e 3,7% de matéria orgânica. Quinze dias depois da inoculação e transplante das mudas efetuou-se a aplicação de 40 ml de uma solução de fosfato diamônio (40 a 44% de P_2O_5 e 16 a 20% de N) a 0,2% (p/v) por vaso, com 800 ml de capacidade, correspondente a $60 \mu\text{g}$ de P_2O_5 e $25 \mu\text{g}$ de N/ cm^3 de substrato.

O inóculo de *V. dahliae* foi obtido em meio de B.D.A. (extrato da cocção de 200 g de batata descascada e picada; dextrose, 20 g; ágar, 12 g; água destilada, q.s.p. 1.000 ml), contido em placas-de-petri de 9 cm de diâmetro. Após cinco dias de incubação a 24°C, prepararam-se as suspensões de conídios, adicionando-se 20 ml de água destilada esterilizada, por placa-de-petri, e filtrando-as através de oito camadas de gase, transferindo-se para erlenmeyer de 250 ml e completando-se o volume para 200 ml. Com o auxílio de um hemacitômetro do tipo câmara-de-neubauer, determinou-se a quantidade de conídios nas suspensões e efetuou-se o ajuste à concentração desejada por meio de diluições em água destilada.

Para se determinar a influência de diferentes potenciais de inóculo de *V. dahliae* sobre a manifestação de sintomas de murcha, duas variedades de tomateiro diferenciadoras de raças do patógeno (Angela Hiper, suscetível; e Marmande VR, resistente à raça I do patógeno, segundo Laterrot et al. 1983) foram inoculadas com quatro isolados do fungo (T-1289, T-1335, T-1386 e T-1439) em experi-

mentos distintos. A inoculação das plântulas foi efetuada por imersão de raízes em suspensões de inóculo ajustadas às concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml por quinze minutos, no estádio inicial de emissão das primeiras folhas verdadeiras, de acordo com metodologia de Wellman (1939), citada por Silva (1978).

Para avaliação da severidade dos sintomas de murcha de *Verticillium* em tomateiro, adotou-se o método empregado por Tokeshi et al. (1966) que consiste na observação de sintomas visuais de amarelecimento e/ou sintomas de escurecimento vascular para se determinar a altura da haste com colonização. Às plantas foram atribuídas notas variáveis numa escala de 0 a 100, de acordo com a altura de inserção das folhas que apresentam sintomas, como descrito na Tabela 2. As avaliações aos 16, 22 e 28 dias após a inoculação foram realizadas pelo método citado, com adaptações, uma vez que as plantas não eram cortadas e as notas atribuídas somente em função de sintomas de amarelecimento das folhas. A avaliação final, realizada 34 dias após a inoculação, inclui corte e exame interno do sistema vascular.

O delineamento estatístico empregado nos cinco experimentos instalados foi o inteiramente casualizado com tratamentos representados pela combinação entre duas variedades de tomateiro e três potenciais de inóculo, totalizando seis grupos experimentais, com cinco repetições. Cada parcela experimental constituiu-se de um vaso de plástico com capacidade para 800 ml, contendo de quatro a seis plantas. Para efeito de análise estatística, os dados originais, expressos em notas variáveis de 0 a 100, foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$. Dos dados obtidos, efetuou-se uma análise multivariada de perfil, para medidas repetidas na mesma unidade experimental (Morrison 1967). Os indivíduos que compunham cada grupo experimental foram todos analisados em quatro épocas. Os contrastes estabelecidos permitiram efetuar regressão linear da variável medida em

TABELA 2. Critério para avaliação da murcha de *Verticillium* em tomateiro.

Nota	Sintomas apresentados pelas plantas
0	plantas sadias sem sintomas externos ou internos no caule cortado na altura do primeiro internódio, logo acima dos cotilédones.
20	vasos coloridos na região do primeiro internódio sem outros sintomas visíveis.
40	vasos coloridos até a altura da primeira folha, com pelo menos um folíolo com amarelecimento.
60	vasos coloridos até a metade do comprimento do caule, com duas ou mais folhas com amarelecimento.
80	vasos coloridos até próximo ao ponteiro; maioria das folhas murchas com exceção do ponteiro.
100	plantas mortas ou com vasos coloridos e folhas murchas até o ponteiro.

Fonte: Tokeshi et al. (1966), adaptada pelo autor.

função das épocas, verificar diferenças entre pares de médias de épocas, e entre pares de médias de grupos experimentais aos 28 dias após a inoculação. Procurou-se também, verificar a existência de paralelismo entre os perfis dos seis grupos experimentais através de comparações entre o valor de parâmetro TETA estimado e o de um X Crítico tabelado, emitidos pela própria análise multivariada de perfil. Nos casos em que se observou paralelismo entre perfis, procurou-se verificar a coincidência entre os mesmos através de comparações entre o valor estimado de F para grupos experimentais e o de um F Crítico tabelado. O nível de significância adotado para a análise multivariada de perfil foi $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolados inoculados às concentrações de 10^5 e 10^6 confídios/ml

Analisando-se a evolução dos sintomas de murcha nas variedades Angela Hiper e Marmande VR de tomateiro, inoculadas com três potenciais de inóculo do isolado T-1335 de *V. dahliae* (Tabela 3), observou-se diferença significativa entre épocas de avaliação, pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade, nos três potenciais de inóculo, para a variedade Angela

Hiper, enquanto para a variedade Marmande VR foi observada diferença significativa entre épocas nos potenciais de 10^5 e 10^6 confídios/ml. Por outro lado, os valores do contraste (a) entre épocas, significativos ao nível de probabilidade de $\alpha = 0,05$ para os três potenciais de inóculo indicaram que os sintomas apresentados pela variedade Angela Hiper evoluíram segundo o modelo linear. Esses valores, por sua vez, demonstraram a semelhança existente entre os perfis desses três grupos experimentais. Para o potencial de 10^4 confídios/ml, entretanto, o menor índice inicial de doença refletiu em índices posteriores também menores. Já para a variedade Marmande VR, o valor do contraste (a) foi significativo para as concentrações de 10^5 e 10^6 confídios/ml; os perfis desses dois grupos experimentais apresentaram-se semelhantes, com índices médios de doença muito baixos em qualquer época. Quando utilizado o potencial de 10^4 confídios/ml, não se constatou diferença significativa, pelo teste F, entre os índices de doença apresentados nas quatro épocas de avaliação, observando-se um perfil diferenciado dos demais, com pouca ou nenhuma evolução de sintomas em função do tempo (contraste a). O va-

TABELA 3. Evolução de sintomas de murcha de *Verticillium* em duas variedades de tomateiro, inoculadas com os isolados T-1335, T-1386 e T-1439, às concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 confídios/ml⁽¹⁾

Isolados	Variedades e Concentração de inóculo (confídios/ml)	Índice médio de doença após os seguintes períodos, em dias de inoculação (2).				F(3)	Contraste entre épocas ⁽⁴⁾			
		16	22	28	34		(a)	(b)	(c)	(d)
T-1335	Angela Hiper									
	10 ⁴	2,22	5,19	17,41	19,63	4,69*	64,44*	2,97 ^{ns}	12,22*	2,22 ^{ns}
	10 ⁵	7,41	17,04	37,04	48,15	22,44*	142,22*	9,63*	20,00*	11,11 ^{ns}
	10 ⁶	9,63	19,26	49,26	57,41	32,29*	173,33*	9,64*	30,00*	8,15 ^{ns}
	Marmande VR									
	10 ⁴	0	0	4,62	7,69	1,87 ^{ns}	27,69 ^{ns}	0 ^{ns}	4,62 ^{ns}	3,07 ^{ns}
T-1386	10 ⁵	0	0	2,86	14,29	9,62*	45,71*	0 ^{ns}	2,86 ^{ns}	11,43*
	10 ⁶	0	0	2,31	13,08	7,19*	41,54*	0 ^{ns}	2,31 ^{ns}	10,77*
	Angela Hiper									
	10 ⁴	6,22	11,59	15,79	18,95	1,10 ^{ns}	42,10 ^{ns}	5,26 ^{ns}	4,21 ^{ns}	3,16 ^{ns}
	10 ⁵	10,00	21,00	38,00	41,00	5,69*	110,00*	11,00 ^{ns}	17,00*	3,00 ^{ns}
	10 ⁶	13,33	28,57	45,71	48,57	11,56*	122,86*	15,24*	17,14	2,86 ^{ns}
T-1439	Marmande VR									
	10 ⁴	0,91	7,27	19,09	22,73	4,97*	77,27*	6,36 ^{ns}	11,82*	3,64 ^{ns}
	10 ⁵	10,48	21,90	47,62	55,24	16,48*	160,00*	11,43*	25,71*	7,62*
	10 ⁶	6,36	16,36	46,36	57,27	25,40*	182,73*	10,00*	30,00*	10,91*
	Angela Hiper									
	10 ⁴	3,33	6,67	13,33	18,33	2,01 ^{ns}	51,66 ^{ns}	3,34 ^{ns}	6,66 ^{ns}	5,00 ^{ns}
T-1439	10 ⁵	12,38	20,95	37,14	40,95	5,80*	101,90*	8,57 ^{ns}	16,19*	3,81 ^{ns}
	10 ⁶	18,18	30,91	45,45	55,00	8,79*	125,00*	12,73*	14,54 ^{ns}	9,55 ^{ns}
	Marmande VR									
10 ⁴	1,54	6,92	27,69	39,23	17,28*	133,28*	5,38 ^{ns}	20,77*	11,54*	
10 ⁵	5,00	12,50	35,83	50,83	19,90*	160,83*	7,50*	23,33*	15,00*	
10 ⁶	8,46	18,46	44,61	61,54	27,37*	185,38*	10,00*	26,15	16,93*	

(1) Inoculação por imersão de raízes na suspensão de confídios pelo período de 15 minutos;

(2) Dados originais segundo escala de notas variável de 0 a 100, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para fins de análise estatística;

(3) Valores de F para verificar efeito de épocas, dentro de cada grupo experimental, e sua significância ao nível de probabilidade $\alpha = 0,05$;

(4) Contrastes estabelecidos para verificar a linearidade da evolução dos sintomas em função das épocas de avaliação (a) e da existência de diferença significativa entre a média dos valores observados aos 16 e 22 (b), 22 e 28 (c) e 28 e 34 (d) dias após a inoculação:

- para o contraste (a) foram aplicados os coeficientes -3, -1, +1 e +3 às médias dos valores de cada época, respectivamente, e para os contrastes (b), (c) e (d), aplicaram-se os coeficientes -1 e +1.
- a significância dos contrastes foi verificada através de intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

lor de TETA calculado (0,3226), maior que um X Crítico a 5% de probabilidade (0,0925), indicou que a hipótese da nulidade, que atesta o paralelismo dos seis grupos experimentais, deve ser rejeitada. Assim, em termos de evolução de sintomas da doença em função do tempo, pode-se afirmar que houve pelo menos um grupo com perfil diferenciado em relação aos demais, corroborando a afirmação anterior. De acordo com a Tabela 4, observou-se que foi possível diferenciar a reação das variedades Angela Hiper e Marmande VR, aos 28 dias após a inoculação, quando inoculadas com os potenciais de 10^5 e 10^6 confídios/ml, o

mesmo não sendo observado para o potencial de 10^4 confídios/ml.

Com relação à inoculação do isolado T-1386 de *V. dahliae* em três potenciais de inóculo (Tabela 3), verificou-se diferença significativa entre épocas de avaliação pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade, no tocante aos sintomas apresentados pela variedade Angela Hiper quando inoculada com os potenciais de 10^5 e 10^6 confídios/ml. Por outro lado, o contraste (a) entre épocas, que permite verificar a linearidade da evolução dos sintomas da doença em função do tempo, foi significativo para as mesmas concentrações de inóculo.

TABELA 4. Contrastes entre médias para verificar efeito de potenciais de inóculo dos isolados T-1335, T-1386 e T-1439 de *V. dahliae* e sobre a manifestação de sintomas de murcha em duas variedades de tomateiro, 28 dias após a inoculação

Isolados	Contrastes entre médias de índices de doença dos tratamentos ^(1,2)			
	Variedades e Concentração de inóculo (confídios/ml)	Marmande VR		
		10^4	10^5	10^6
T-1335	Angela Hiper			
	10^4	12,79 ^{ns}	-	-
	10^5	-	34,18*	-
	10^6	-	-	46,95*
T-1386	Angela Hiper			
	10^4	- 3,30 ^{ns}	-	-
	10^5	-	- 9,62 ^{ns}	-
	10^6	-	-	- 0,65 ^{ns}
T-1439	Angela Hiper			
	10^4	-14,36 ^{ns}	-	-
	10^5	-	1,31 ^{ns}	-
	10^6	-	-	0,84 ^{ns}

(1) A análise de variância para se verificar o efeito de grupos experimentais (combinação entre variedades e potenciais de inóculo) dentro de dada época de avaliação (28 dias após a inoculação), indicou valores de $F = 24,38^*$ (T-1335), $5,99^*$ (T-1386) e $5,35^*$ (T-1439), para dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$;

(2) Para os contrastes efetuados foram aplicados os coeficientes - 1 e + 1 aos índices de doença apresentados pelas variedades Marmande VR e Angela Hiper, respectivamente.

A significância dos contrastes foi verificada através de intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

Esses valores, por sua vez, permitiram verificar a semelhança existente entre os perfis desses dois grupos experimentais. Entretanto, para a mesma variedade inoculada com cerca de 10^4 conídios/ml, não se constatou diferença significativa entre os índices de doença de cada época (F a 5%) que mostraram-se muito baixos. O perfil diferenciado desse grupo experimental em relação aos demais grupos da variedade Angela Hiper foi comprovado pelo valor de TETA calculado (0,2242), maior que um X Crítico a 5% de probabilidade (0,1175), indicando a rejeição da hipótese da nulidade, que atesta o paralelismo entre perfis. Com relação à variedade Marmande VR, constatou-se diferença significativa entre épocas de avaliação pelo teste F (5%), quando inoculada com as concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/ml. O valor do contraste (a) foi significativo para as mesmas concentrações de inóculo. Levando-se em consideração esses valores, pode-se observar a semelhança existente entre os três perfis destacados. Entretanto, para o potencial de 10^4 conídios/ml, o menor índice inicial de doença refletiu índices posteriores também menores. Através da Tabela 4, pode-se observar que não foi possível diferenciar a reação das variedades Angela Hiper e Marmande VR, aos 28 dias após a inoculação, para quaisquer dos três potenciais de inóculo do isolado T-1386. Assim, as variedades Angela Hiper e Marmande VR apresentaram comportamento semelhante, em termos de severidade e evolução de sintomas em função do tempo.

Analisando-se a Tabela 3, relativa à evolução dos sintomas de murcha de Verticillium nas duas variedades inoculadas com o isolado T-1439 de *V. dahliae*, às concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/ml, verificou-se que houve diferença significativa entre os valores observados nas quatro épocas de avaliação (F a 5%) quando a variedade Angela Hiper foi inoculada às concentrações de 10^5 e 10^6 conídios/ml. Por outro lado, o contraste (a) foi significativo para os respectivos potenciais do inóculo. Entretanto, não houve diferença significativa entre épocas, pelo teste F a 5% de probabilidade, para a concentração de 10^4

conídios/ml. Constatou-se, dessa forma, um perfil diferenciado em relação aos demais, observando-se reduzida evolução de sintomas da doença em função do tempo. Assim, o valor de TETA calculado (0,1886), maior que X Crítico a 5% de probabilidade (0,1050), indicou rejeição da hipótese da nulidade que atesta o paralelismo entre os perfis. Para a variedade Marmande VR, os índices de doença apresentados nas quatro épocas de avaliação diferiram significativamente entre si (teste F a 5%), aos potenciais de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/ml. O valor do contraste (a) foi significativo para as mesmas concentrações de inóculo. Levando-se em consideração os respectivos valores de (a), pode-se observar a semelhança existente entre os perfis dos três grupos experimentais da variedade Marmande VR, tendo sido observada acentuada evolução de sintomas em função do tempo, à semelhança da variedade Angela Hiper inoculada nas concentrações de 10^5 e 10^6 conídios/ml. De forma complementar, pela Tabela 4, pode-se observar que aos 28 dias após a inoculação não foi possível diferenciar a reação das duas variedades de tomateiro, quanto à severidade dos sintomas, em quaisquer dos três potenciais de inóculo utilizados.

Isolados inoculados às concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml

Através da análise da Tabela 5, observou-se a existência de diferença significativa entre épocas de avaliação, pelo teste F (5%), no tocante aos sintomas apresentados pelas variedades Angela Hiper e Marmande VR quando inoculadas com o isolado T-1289 de *V. dahliae* às concentrações de 10^6 e 10^7 conídios/ml. O valor de TETA calculado (0,0791), menor que um X Crítico a 5% de probabilidade (0,0837), indicou que a hipótese da nulidade, que atesta o paralelismo dos seis grupos experimentais deve ser aceita. Por outro lado, o valor calculado de F para grupos (16,40), maior que um F Crítico a 5% de probabilidade com 5 e 177 g.l. (2,26), indicou a existência de diferença significativa entre os seis grupos,

considerando-se o perfil global de cada um. Desta forma, os seis grupos, paralelos entre si, não foram coincidentes. Os valores do contraste (a) entre épocas, significativos para os potenciais de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml, indicaram que os sintomas apresentados pela variedade Angela Hiper evoluíram segundo o

modelo linear. Esses valores demonstraram a semelhança existente entre os perfis dos três grupos experimentais. Para 10^6 conídios/ml, entretanto, o menor índice inicial de doença refletiu índices posteriores relativamente menores. Para Marmande VR, os valores do contraste (a) foram significativos para as concen-

TABELA 5. Evolução de sintomas de murcha de *Verticillium* em duas variedades de tomateiro, inoculadas com o isolado T-1289 e T-1335 às concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml¹.

Isolados	Variedades e Concentração de inóculo (conídios/ml)	Índice de doença após os seguintes períodos, em dias de inoculação (2).				F(3)	Contraste entre épocas(4)				
		16	22	28	34		(a)	(b)	(c)	(d)	
T-1289	Angela Hiper										
	10 ⁶	38,29	49,14	56,86	65,71	12,10*	89,98*	10,85*	7,72 ^{ns}	8,85 ^{ns}	
	10 ⁷	64,52	74,84	81,94	89,68	6,04*	82,58*	10,32*	7,10 ^{ns}	7,74 ^{ns}	
	10 ⁸	70,71	80,71	85,71	92,86	4,02*	71,45*	10,00 ^{ns}	5,00 ^{ns}	7,15 ^{ns}	
	Marmande VR										
	10 ⁶	12,14	15,00	18,57	25,71	3,55*	44,28*	2,86 ^{ns}	3,57 ^{ns}	7,14 ^{ns}	
10 ⁷	34,00	38,00	41,33	53,33	11,42*	61,32*	4,00 ^{ns}	3,33 ^{ns}	12,00*		
10 ⁸	67,10	69,68	69,68	78,06	2,27 ^{ns}	32,88 ^{ns}	2,58 ^{ns}	0 ^{ns}	8,38 ^{ns}		
T-1335	Angela Hiper										
	10 ⁶	36,77	54,84	69,68	83,87	30,00*	156,14*	18,07*	14,84*	14,19*	
	10 ⁷	55,56	69,44	78,33	88,33*	13,72*	107,20*	13,88*	8,89 ^{ns}	10,00 ^{ns}	
	10 ⁸	72,94	78,82	84,12	90,59	3,40 ^{ns}	58,25*	5,88 ^{ns}	5,30 ^{ns}	6,47 ^{ns}	
	Marmande VR										
	10 ⁶	10,83	13,33	14,17	15,83	0,51 ^{ns}	15,84 ^{ns}	2,50 ^{ns}	0,84 ^{ns}	1,66 ^{ns}	
10 ⁷	23,33	25,00	28,33	46,67	18,29*	73,35*	1,67 ^{ns}	3,33 ^{ns}	18,34*		
10 ⁸	40,77	43,85	46,15	54,61	4,61*	43,82*	3,08 ^{ns}	2,30 ^{ns}	8,46*		

(1) Inoculação por imersão de raízes na suspensão de conídios pelo período de 15 minutos;

(2) Dados originais, segundo escala de notas variável de 0 a 100, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para fins de análise estatística;

(3) Valores de F para verificar efeito de épocas, dentro de cada grupo experimental, e sua significância ao nível de probabilidade $\alpha = 0,05$;

(4) Contrastes estabelecidos para verificar a linearidade da evolução dos sintomas em função das épocas de avaliação (a) e da existência de diferença significativa entre a média dos valores obtidos aos 16 e 22 (b), 22 e 28 (c) e 28 e 34 (d) dias após a inoculação:

. para o contraste (a) foram aplicados os coeficientes -3, -1, +1 e +3 e para os contrastes (b), (c) e (d), aplicaram-se os coeficientes -1 e +1.

. a significância dos contrastes foi verificada através de intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

trações de 10^6 e 10^7 conídios/ml. Os perfis desses dois grupos experimentais apresentaram-se semelhantes quanto à evolução dos sintomas. Entretanto, a inoculação do isolado T-1289 à concentração de 10^6 conídios/ml resultou em índices iniciais de doença consideravelmente menores, refletindo índices posteriores também menores. Quando utilizado o potencial de 10^6 conídios/ml, não se constatou diferença significativa entre as quatro épocas de avaliação (F a 5%). Observaram-se índices elevados de doença em qualquer época. Por outro lado, pode-se observar (Tabela 6) que os potenciais de inóculo de 10^6 e 10^7 conídios/ml do isolado T-1289 permitiram diferenciar as duas variedades de tomateiro quanto à intensidade de sintomas apresentados aos 28 dias após a inoculação. Entretanto, quando o mes-

mo isolado foi inoculado à concentração de 10^6 conídios/ml, não se constatou diferença significativa entre as duas variedades.

Analisando-se a Tabela 5 com relação ao comportamento da variedade Angela Hiper submetida a três potenciais de inóculo do isolado T-1335 de *V. dahliae*, verificou-se diferença significativa entre os valores observados nas quatro épocas de avaliação (F a 5%) para os três potenciais de inóculo (10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml). Por sua vez, o contraste (a) foi significativo para os respectivos potenciais de inóculo. Entretanto, à concentração de 10^6 conídios/ml a variedade Angela Hiper apresentou elevados índices de doença desde a avaliação inicial. Quanto à variedade Marmande VR, os índices de doença apresentados nas quatro épocas de avaliação diferiram sig-

TABELA 6. Contrastes entre médias para verificar efeito de potenciais de inóculo dos isolados T-1289 e T-1335 de *V. dahliae* e sobre a manifestação de sintomas de murcha em duas variedades de tomateiro, 28 dias após a inoculação

Contrastes entre médias de índices de doença dos tratamentos ^(1,2)				
Isolados	Variedades e Concentração de inóculo (conídios/ml)	Marmande VR		
		10^6	10^7	10^8
T-1289	Angela Hiper			
	10^6	38,29*	-	-
	10^7	-	40,61*	-
	10^8	-	-	16,03 ^{ns}
T-1335	Angela Hiper			
	10^6	55,51*	-	-
	10^7	-	50,00*	-
	10^8	-	-	37,97*

(1) A análise de variância para se verificar o efeito de grupos experimentais (combinação entre variedades e potenciais de inóculo) dentro de dada época de avaliação (28 dias após a inoculação), indicou valores de $F = 15,53^*$ (T-1289) e $33,84^*$ (T-1335), para dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$;

(2) Para os contrastes efetuados foram aplicados os coeficientes - 1 e + 1 aos índices de doença apresentados pelas variedades Marmande VR e Angela Hiper, respectivamente.

A significância dos contrastes foi verificada através de intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

nificativamente entre si (F a 5%) quando inoculada com os potenciais de 10^7 e 10^8 confídios/ml. O valor do contraste (a), que mede a evolução linear dos sintomas de doença, foi significativo para as mesmas concentrações de inóculo. Entretanto, não houve diferença significativa entre os índices de doença nas quatro épocas para a concentração de 10^6 confídios/ml. Observou-se, dessa forma, um perfil diferenciado desse grupo experimental em relação aos demais, tendo sido constatados reduzidos índices de doença em qualquer época. Assim, o valor de TETA calculado (0,2061), maior que um X Crítico a 5% de probabilidade (0,0875), indicou a rejeição da hipótese que atesta o paralelismo dos seis grupos experimentais, corroborando a observação anterior. Por outro lado, foi possível diferenciar a reação das variedades Angela Hiper e Marmande VR ao isolado T-1335 mesmo quando esta última foi inoculada à concentração de 10^8 confídios/ml, muito embora, aos 28 dias após a inoculação, os índices de doença apresentados por "Marmande VR" tenham sido relativamente superiores aos da inoculação com 10^6 e 10^7 confídios/ml.

Sob o aspecto da influência exercida pelo potencial de inóculo de *V. dahliae* sobre a manifestação de sintomas de murcha nas variedades do tomateiro Angela Hiper, suscetível, e Marmande VR, resistente à raça 1 do patógeno (Laterrot et al. 1983), verificou-se que a severidade da doença e a evolução dos sintomas foi tanto maior quanto mais elevado o potencial de inóculo dos isolados T-1386 e T-1439 (Tabelas 3 e 4). Entretanto, nas condições experimentais do presente trabalho, a variedade Angela Hiper, quando inoculada com os mesmos isolados à concentração de 10^4 confídios/ml, apresentou lenta evolução de sintomas de murcha e baixos índices de doença, o que não foi observado nos potenciais de 10^5 e 10^6 confídios/ml. Pelos resultados obtidos observou-se a necessidade da utilização de potenciais de inóculo de *V. dahliae* superiores a 10^4 confídios/ml para que maiores índices de doença possam ser atingidos, especialmente na variedade Angela Hiper, considerada como

padrão de suscetibilidade.

Os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4 indicaram a eficácia da resistência apresentada pela variedade Marmande VR ao isolado T-1335 de *V. dahliae*, mesmo à concentrações de inóculo relativamente altas, como 10^6 confídios/ml. Entretanto, inoculações com os isolados T-1335 e T-1289, provavelmente da raça 1 do patógeno, à concentração de 10^8 confídios/ml, proporcionaram índices de doença relativamente elevados se comparados com a inoculação à concentração de 10^6 confídios/ml (Tabelas 5 e 6). Para o potencial de 10^7 confídios/ml foi possível diferenciar a reação da variedade Marmande VR em relação à da variedade Angela Hiper; entretanto, índices elevados de doença foram observados ao final das avaliações. Pelo exposto, o potencial de inóculo de 10^8 confídios/ml mostrou ser o mais adequado para experimentos objetivando a identificação de raças do patógeno através da observação da reação das variedades Angela Hiper e Marmande VR, nas referidas condições. Por sua vez, o fato de não ter sido possível diferenciar a reação das variedades Angela Hiper e Marmande VR aos isolados T-1386 e T-1439 do patógeno é um forte indicativo para a ocorrência de mais de uma raça fisiológica de *V. dahliae* nas condições do estado de São Paulo.

Embora não haja um valor comum estabelecido para a concentração de inóculo a ser utilizado em inoculações artificiais de *Verticillium* em tomateiro, há um consenso, entre diversos autores, de que o potencial de inóculo deve possuir uma concentração que seja suficiente para garantir a infecção das plântulas suscetíveis. Por sua vez, foi observado que a severidade da doença era tanto maior quanto mais elevado o potencial de inóculo no solo (Ashworth Junior et al. 1979, Frank et al. 1975, Grogan et al. 1979). Suspensões de confídios ajustadas a concentrações que variam entre 10^5 e 10^6 confídios/ml têm sido empregadas com frequência em inoculações de plântulas de tomateiro com *V. dahliae* (Grogan et al. 1979, Laterrot et al. 1983, Silva 1978, Skotland 1971), o que demonstra a coerência

das observações efetuadas anteriormente.

Nô tocante ao aspecto relativo à época de avaliação da doença, pode-se constatar, de forma geral, que os sintomas observados nas variedades de tomateiro evoluíram relativamente pouco entre a avaliação efetuada aos 28 dias após a inoculação e a efetuada aos 34 dias.

CONCLUSÕES

1. O potencial de inóculo de 10^6 confídios/ml foi o mais adequado para experimentos objetivando a identificação de raças fisiológicas do patógeno através da observação da reação das variedades Angela Hiper e Marmande VR.

2. Potenciais de inóculo de 10^7 e 10^8 confídios/ml afetaram a reação de resistência da variedade Marmande VR à raça 1 de *V. dahliae*, à qual a mesma é resistente.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, L.J. Susceptibility of certain *Verticillium*-resistant tomato varieties to an Ohio isolate of the pathogen. **Phytopathology**, v.52, p.988-1000, 1962.
- ASHWORTH JUNIOR, L.J.; HUISMAN, O.C.; HARPER, D.M.; STROMBERG, L.K. *Verticillium* wilt disease of tomato: influence of inoculum density and root extension upon disease severity. **Phytopathology**, v.69, p.490-492, 1979.
- BERRY, S.Z.; OAKES, G.L. Ohio 11 and 12, *Verticillium* wilt-race 2 resistant greenhouse tomato breeding lines. **Hortscience**, v.22, p.167, 1987.
- CIRULLI, M. Uno isolato di *Verticillium dahliae* verso varietà resistenti di pomodoro. **Phytopathologia Mediterranea**, v.8, p.132-136, 1969.
- FIGUEIREDO, M.B. Aplicação do Método de Castellani para conservação de fungos fitopatogênicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v.1, p.79-81, 1967.
- FRANK, J.A.; WEBB, R.E.; WILSON, D.R. The effect of inoculum levels on field evaluations of potatoes for *Verticillium* wilt resistance. **Phytopathology**, v.65, p.225-228, 1975.
- GROGAN, R.G.; IANNOU, N.; SCHNEIDER, R.W.; SALL, M.A.; KIMBLE, K.A. *Verticillium* wilt on resistant tomato cultivars in California: virulence of inoculum density to disease incidence. **Phytopathology**, v.69, p.1176-1180, 1979.
- HALL, H.; KIMBLE, K.A.; SMITH, P.G. An isolate of *Verticillium* found pathogenic to wilt-resistant tomatoes. **California Agriculture**, v.26, n.9, p.3, 1972.
- KUROZAWA, C.; UENO, B. Comportamento de progênies e cultivares de tomateiro à murcha de *Verticillium*. **Summa Phytopathologica**, v.13, p.31, 1987.
- LATERROT, H.; MELO, P.C.T.; BLANCARD, D. Ocorrência da raça 2 de *Verticillium* em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) no Estado do Pernambuco, Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.1, p.22-25, 1983.
- MORRISON, M. **Multivariate Statistical Methods**. New York: M.C. Graw-Hill, 1967. 388p.
- NELSON, R. **Verticillium wilt peppermint**. [S.l.:s.n., 1950. 259p. (Michigan Agricultural Experimental Station Technical Bulletin, 221).
- O'BRIEN, R.G.; HUTTON, D.G. Identification of race 2 of *verticillium* wilt in South-east Queensland. **Australasian Plant Pathology**, v.10, p.56-58, 1981.
- PEGG, G.F. *Verticillium* diseases. **Review of Plant Pathology**, v.53, p.157-182, 1974.
- SCHAIBLE, L.; CANNON, O.S.; WADDOUPS, V. Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in a tomato cross. **Phytopathology**, v.41, p.986-990, 1951.
- SILVA, G.S. **Variabilidade de *Verticillium alboatrum* e sua patogenicidade a algumas ervas daninhas**. Piracicaba: USP-ESALQ, 1978. 41p. Dissertação de Mestrado.
- SKOTLAND, C.B. Pathogenic and non pathogenic *Verticillium* species on south central Washington. **Phytopathology**, v.61, p.435-436, 1971.

TJAMOS, E.C. Occurrence of race 2 of *Verticillium dahliae* in Greece. **Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki**, v.12, p.216-226, 1980.

TOKESHI, H.; GALLI, F.; FUROZAWA, C. Nova raça de *Fusarium* do tomateiro em São Paulo.

Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", v.23, p.217-227, 1966.

WILHELM, S. Longevity of the *Verticillium* wil fungus in the laboratory and field. **Phytopathology**, v.45, p.180-181, 1955.