

UMA GRAVE MICOSE DO BERSIM:

Aureobasidium caulivorum (Kirchner) B. Cooke

por

JORGE FRANCISCO PINTO GÂNHAO
Engenheiro Agrônomo

INTRODUÇÃO

O nosso insuficiente património pecuário é, entre outras causas, um dos principais males de que enferma a Agricultura Nacional. Assim, por exemplo, a importação de carne, peles, curtumes e lãs custa anualmente ao País uma verba superior a 400 mil contos (*), quantia fabulosa se pensarmos que, ao nível europeu, a actual conjuntura económica sugere que se evitem desnecessárias sangrias de divisas. Desta maneira, na solução do problema forraginoso reside certamente uma das maiores esperanças da Lavoura Nacional, pelo melhor aproveitamento das terras e o conseqüente e necessário aumento da produção de proteínas, leite e outros artigos. Além disso, e o que é também muito importante, poder-se-á elevar o depauperado nível de fertilidade dos nossos solos e, simultaneamente, permitir então a exploração de certas culturas até agora consideradas aleatórias e deficitárias, ao mesmo tempo que concorrerá para reduzir os perigos da erosão.

Entre as diversas forragens susceptíveis de representarem um importante papel na constituição de uma Agricultura progressiva e mais consentânea com os ditames da Técnica, avulta o bersim (*Trifolium alexandrinum* L.). Com efeito, trata-se de uma leguminosa que HELBLING (1958-59) considera das mais valiosas para o nosso País,

(*) *Fomento Pecuário*. (Exposição feita pelo Sr. Secretário de Estado da Agricultura, na Escola Superior de Medicina Veterinária em 22 de Fevereiro de 1962).

em face de poder ser utilizada verde ou fenada e até em pastagem directa, ao mesmo tempo que «devido à percentagem relativamente baixa de celulose que contém e à macieza das folhas, é forragem muito tenra, muito apetecida por todos os animais, quer bovinos, ovinos ou suínos, e bem assim pelas aves de capoeira que se mostram ávidas por este alimento. Mas é particularmente para as vacas leiteiras que se recomenda, dada a maneira como influi no aumento de secreção láctea e teor butiroso do leite. Não transmite qualquer aroma ou sabor desagradável ao leite e seus derivados, o que nem sempre sucede com algumas outras forragens». Além disso, é susceptível de ser cultivada em regime de sequeiro e regadio e como é dotada de muito rápido desenvolvimento, pode suportar seis e mais cortes, adaptando-se bem a solos argilosos, quer estes sejam ou não calcários e ainda aos francos ou siliciosos frescos. Contudo, expandiu-se mais na região dos basaltos de Lisboa e nas Lezírias do Ribatejo, por desfrutar aqui de melhores condições ecológicas.

Se acrescentarmos ainda que, mercê das suas condições agro-climáticas, o nosso País está a ser solicitado à produção e exportação de sementes e que, justamente neste sector, existe um prometedor mercado para o bersim, julgamos assim ter realçado suficientemente a importância económica de que se reveste esta óptima leguminosa.

O facto de a partir de 1957, se ter notado que uma grave doença estava a tomar um carácter limitante da cultura, conduziram CABRAL e PINTO-GANHÃO (1959) à identificação do respectivo agente causal, o deuteromiceta *Aureobasidium caulivorum* (Kirchn.) B. Cooke [= *Kabatiella caulivora* (Kirchn.) Karak.]. O problema que surgiu exigia pela sua natureza, um rápido e atento estudo tendente a averiguar a possibilidade de debelar a doença, ao mesmo tempo queurgia também sustar o desalento dos utilizadores de bersim, os quais já haviam iniciado uma drástica redução da área normalmente cultivada. Foi assim que resolvemos empreender o estudo da biologia e da ecologia do parasita, ao mesmo tempo que, fiéis aos princípios que devem nortear essencialmente um diplomado da Universidade Técnica, nos propúnhamos empenhar todo o nosso esforço no sentido de podermos contribuir com algo para a resolução de um problema que ameaçava transformar-se num novo desaire para a já tão periclitante economia agrária.

O presente trabalho foi elaborado ao longo dos últimos cinco anos e não nos foi fácil contornar as dificuldades inerentes à escassa informação bibliográfica sobre o parasita, a qual na grande maioria

dos casos se referia apenas a aspectos relacionados com *Trifolium pratense* L., uma leguminosa que não obstante possuir o maior interesse para muitos países, está longe de apresentar essa importância para o nosso. Houve, portanto, muito que investigar e nem sempre as tentativas para acertar lograram êxito fácil.

Além da revisão bibliográfica sobre o parasita e onde focamos os mais importantes aspectos que o caracterizam, apresentamos em Material e Métodos as principais técnicas seguidas nos trabalhos laboratoriais efectuados, incluindo um método inédito que consideramos de interesse em vários sectores ligados à investigação laboratorial e tecnológica.

Num capítulo dedicado ao estudo do parasita em bersim e em meios artificiais de cultura, considerámos também a eficácia relativa de alguns fungicidas sobre os esporos do parasita, convencidos da viabilidade económica em combatê-lo através de tratamentos fitossanitários, em face do valor económico da cultura do bersim, dos actuais meios de aplicação e da existência de uma boa gama de produtos de que, hoje em dia, a Sanidade Vegetal pode lançar mão.

Noutro capítulo dedicado às Inoculações Experimentais conduzidas em estufa de campo, fizemos o estudo da avaliação do grau de susceptibilidade de diversas forragens ao fungo e, simultaneamente, da influência da temperatura do ar e da humidade relativa sobre a sua patogenicidade.

Finalmente, numa secção de um capítulo dedicado a Ensaio de Campo, pretendemos averiguar possíveis meios de disseminação do parasita e estudar alguns meios de luta, nomeadamente a desinfecção das sementes. Noutra secção, efectuámos o estudo da aplicação de tratamentos fungicidas visando a protecção da cultura do bersim, ao mesmo tempo que analisámos as principais condições meteorológicas que precederam e acompanharam a expansão da doença e seu declínio.

Não obstante a apresentação muito sumária deste trabalho, é fácil avaliar que não teria sido possível levar a cabo a tarefa empreendida sem a colaboração e os recursos materiais que dispusemos sempre no Laboratório de Patologia Vegetal «Veríssimo de Almeida». Na pessoa do seu Director, o Ex.^{mo} Prof. Eng.^o Agrónomo Raul de Garcia Cabral, testemunhamos o mais profundo reconhecimento, pelas inúmeras facilidades concedidas. Porque seria fastidioso referir agora Aqueles a quem somos devedores de atenções e valiosa colaboração,

expressamos oportunamente e ao longo deste trabalho, o nosso reconhecimento.

Não querendo também esquecer os Colegas que, de qualquer maneira, nos dispensaram o seu apoio, aqui se registam as gratas saudações de quem entende que omitir, não é olvidar.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ACERCA DO *AUREOBASIDIUM*
CAULIVORUM (KIRCHN.) B. COOKE

1. Nomenclatura

A doença foi assinalada pela primeira vez em 1902 por Kirchner, na Alemanha, sobre *Medicago sativa* L. (STEVENS, 1921). O parasita foi então classificado como sendo o *Gloeosporium caulivorum* Kirchner, um deuteromiceta da Família *Melanconiaceae*. Porém, KARAKULIN (1923), de acordo com BUBAK (1907), considerou o fungo como pertencente ao género *Kabatiella*, em virtude de os conídios se formarem sobre conidióforos relativamente largos e então aquele passou a designar-se por *Kabatiella caulivora* (Kirch.) Karak. Todavia, CIFERRI *et alt.* (1956), baseados em estudos com culturas puras e outras investigações, consideraram o género *Kabatiella* Bubak sinónimo de *Aureobasidium* Viala e Boyer (COOKE, 1959). Posteriormente, CIFERRI (1958) cria uma nova família nos Fungos Imperfeitos, a *Aureobasidiaceae*, cujos componentes se caracterizam essencialmente pela produção de radulasporos, que são esporos formados sobre minúsculas espículas que saem da parede da hifa. Segundo COOKE (1962), CIFERRI (1958) não tomou em consideração um aspecto muito importante que VIALA e BOYER (1891) descrevem para o género *Aureobasidium* e que diz respeito à formação de radulasporos sobre espículas inseridas num órgão em forma de basídio e resultante do intumescimento de uma célula da hifa (fig. 24).

As nossas observações, feitas ao longo do presente trabalho, estão de acordo com COOKE (1962), o que nos leva a aceitar a nova combinação proposta por este autor para a espécie em estudo. Assim, passaremos também a designá-la por *Aureobasidium caulivorum* (Kirchner) B. Cooke.

A forma perfeita deste parasita ainda não foi encontrada na natureza. Contudo, GRINCHENKO e COLOTELO (1963) conseguiram já a obtenção de ascocarpos a partir da inoculação de uma suspensão de conídios de duas estirpes do fungo sobre grãos de milho e fragmentos do caule e folhas de *Trifolium pratense* L. esterilizados em autoclave e embebidos no meio de Sach, para o que as culturas foram depois mantidas a 10° C. durante 60-90 dias.

Na Grã-Bretanha a micose é conhecida vulgarmente por *scorch clover* e nos E. U. A. por *northern anthracnose*.

2. Plantas hospedeiras

Não foi sem certa surpresa que verificámos, através de uma intensa pesquisa bibliográfica que, no campo, o fungo atacava predominantemente o trevo violeta (*Trifolium pratense* L.). Assim, praticamente, todas as referências, com raras excepções, diziam respeito a esta leguminosa. Em relação ao bersim (*T. alexandrinum* L.) apenas colhemos as informações de que causava severos prejuízos na Alemanha, além da sua ocorrência num talhão experimental na Polónia e, em cultura, na Noruega e Austrália.

O fungo foi ainda assinalado no campo, em *Medicago sativa* L., *Trifolium incarnatum* L., *T. repens* L., *T. subterraneum* L. e *Anthyllis vulneraria* L. Contudo, alguns autores verificaram, mediante inoculações experimentais, que o parasita pode atacar ainda outras espécies. Assim, SAMPSON (1928) e SAMPSON e WESTERN (1954) referem que estão nestas condições o *T. hybridum* L., *T. resupinatum* ssp. *suaevolens* (Wild.) Dinsm., e *Medicago lupulina* L. Por sua vez, WALKER (1956) refere o *T. dubium* Sibth. e COLE e COUCH (1957) as seguintes: *T. angustifolium* L., *T. fragiferum* L., *T. glomeratum* L., *T. hirsutum* Thunb., *T. medium* L., *T. pallidum* Waldst. & Kit., *Medicago sativa* e *Melilotus alba* (L.) Desr. Finalmente, HANSON (1957) verificou a sua patogenicidade sobre *T. lappaceum* L., *T. resupinatum* L., *T. striatum* L. e *T. wormskjoldii* Lehm.

3. Distribuição geográfica

Europa — Foi na Alemanha, conforme já referimos, que KIRCHNER (1902) registou pela primeira vez o fungo, sobre *Medicago sativa*. Posteriormente e no mesmo país, HEY (1945) referiu-o em *T. pratense* e *T. incarnatum*, enquanto WELTZIEN (1958) afirma que provoca importantes danos em bersim, no Sudoeste da Alemanha. Além destes autores, também FRANDBSEN (1956) refere severos prejuízos sobre *T. pratense* não só neste país como ainda na Holanda.

Na Dinamarca, já GRAM (1932) e GRAM *et altera* (1928) haviam assinalado o fungo, respectivamente, em *T. pratense* e *Antyllis vulneraria* e na Bélgica, MARCHAL (1936) cita-o também como importante parasita daquele hospedeiro.

Em Itália, GODANICH (1935) relata o seu parasitismo sobre trevo violeta, enquanto JANKOWSKA (1929) na Polónia e JORSTAD (1945) na Noruega, registaram-no respectivamente, naquele hospedeiro e em bersim.

Na Checoslováquia é citado por BAUDYS (1924) e, na Rússia, SMARODS (1930) e TOMSON (1934) referem-no em *Trifolium* sp., enquanto MINYAEVA (1951) o descreve sobre trevo violeta. Na Hungria, o parasita foi registado em 1915 por HEGYI e em 1952 (ANÓNIMO) o fungo é assinalado na Jugoslávia, igualmente em *T. pratense*, enquanto NÜESCH (1961) afirma que, neste hospedeiro, a doença está muito disseminada na Suíça. Também sobre a mesma leguminosa, PERSECA (1962?) regista o seu aparecimento na Roménia.

Na Inglaterra, segundo SAMPSON e WESTERN (1954), a micose foi observada pela primeira vez em 1920, igualmente em trevo violeta, próximo de Cambridge.

Em Portugal, CABRAL e PINTO-GANHÃO (1959) assinalaram a doença pela primeira vez, em bersim e, no material colhido na Herdade das Silveiras, em Samora Correia, registaram também a presença simultânea de *Ascochyta imperfecta* Peck, embora esta espécie não revelasse importância de maior. Em Julho de 1959, o fungo em estudo foi por nós isolado e identificado sobre *T. resupinatum* ssp. *suaveolens*, numa cultura vizinha de bersim fortemente atacado, na Tapada da Ajuda, Lisboa.

Ásia — HARA (1954) refere a presença do parasita no Japão, sobre um hospedeiro que não foi possível apurar, em virtude de não

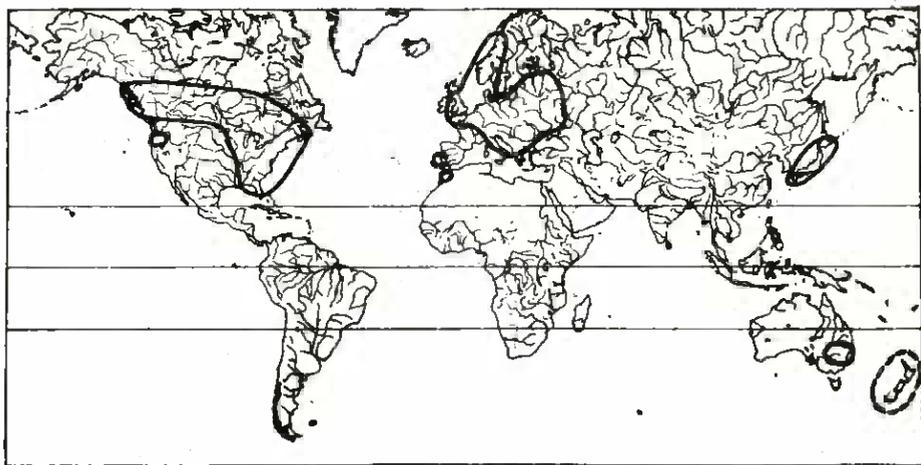
conseguirmos consultar o trabalho original que, aliás, traz a lista dos hospedeiros em japonês.

África — Neste Continente e até à data, o fungo só foi assinalado em Marrocos por MIÈGE (1921), sobre *T. repens*.

América do Norte — Em 1910, FULTON assinalou a micose nos E. U. A. em *T. pratense* e, posteriormente, MONTEITH (1926) refere-a também no mesmo hospedeiro. Mais recentemente, HOLLOWELL (1943, 1961), ELLIOTT (1952), COLE e COUCH (1957, 1958, 1959), ATHOW (1957), ATHOW e RALPH (1957), entre outros, citam invariavelmente o parasita também sobre trevo violeta. De uma maneira geral, a doença, grassa nos estados do Norte daquele país e, daí, a designação de *northern anthracnose* que lhe foi dada nos E. U. A.

Também no Canadá o seu parasitismo sobre *T. pratense* é referido por GOULDEN e STEVENSON (1949) e COLOTELO e GRINCHENKO (1962).

No mapa seguinte publicado pelo Commonwealth Mycological Institute, em 1958, pode-se observar a actual distribuição geográfica do *A. caulivorum*; a círculo tracejado assinalámos a doença em Portugal e Nova Zelândia.



Mapa I — Distribuição geográfica do *A. caulivorum*

4. Sobrevivência

Segundo BUTLER e JONES (1955), os conídios do fungo podem sobreviver na semente seca de *T. pratense*, pelo menos durante 18 meses, em condições de infectar as cotilédones e as primeiras folhas das plântulas.

Por sua vez, COLE e COUCH (1957) demonstraram que pecíolos infectados do mesmo hospedeiro e guardados nas condições de campo durante 13 meses, mantiveram o parasita em condição viável. Além disso, verificaram também que os conídios perduraram durante pelo menos 8 meses, quer em lâminas de vidro secas, quer sobre sementes, ou ainda no solo com humidade da capacidade de campo. Estes autores (1958) conseguiram também isolar o fungo de *T. pratense* atacado, depois de guardado ao ar livre durante 400 dias, mas não após 450. Resultado semelhante foi conseguido com conídios conservados em solo esterilizado e não esterilizado, após mais de 300 dias. Além disso, verificaram ainda que os esporos conseguiram sobreviver 380 dias a 3°, 6° e 9° C., e até durante 20 meses à baixa temperatura de -10° C.

Mais recentemente, MARTIN (1959) constatou também que o fungo consegue resistir aos invernos de Wisconsin em lesões nos caules, pecíolos e folhas de *T. pratense*, assim como no solo. Da mesma maneira, LEACH (1962) verificou que o parasita sobreviveu durante 27 meses em sementes de *T. incarnatum* infectadas, conservadas à temperatura ambiente.

5. Disseminação

MINYAEVA (1951) verificou experimentalmente que as sementes de *T. pratense* são importantes fontes de disseminação da doença e quando estão infectadas, a presença de manchas características sobre elas, são os únicos indícios de que se encontram contaminadas, além de originarem plantas de fraco desenvolvimento. Mais recentemente, COLE e COUCH (1958) demonstraram também que a doença era transmitida por esta via.

Segundo provou experimentalmente MILLER (1955), um coleóptero da família *Scolytidae*, o *Hylastinus obscurus*, que ataca as raízes de *T. pratense* (COMSTOCK, 1940), pode actuar como vector do parasita, em virtude de facilmente transportar sobre o corpo os conídios do fungo.

A chuva pode desalojar facilmente os esporos existentes nas lesões das plantas atacadas, conforme verificaram COLE e COUCH (1957) e, por sua vez, MARTIN (1959) afirma que o vento pode disseminar o parasita quando as plantas estão húmidas, mas que tal disseminação deixa de ser importante se aquelas estiverem secas.

6. Factores favoráveis à doença

Para BUTLER e JONES (1955), a doença em *T. pratense* é favorecida por condições de muita humidade, como as que se verificam quando a cultura se apresenta bastante densa. Em certas regiões, a micose surge periodicamente depois de anos de ausência, parecendo ser estimulada por largas variações de temperaturas, com moderadas mas frequentes chuvas (BAUDYS, 1924). Por sua vez, ROBERTS (1957) parece confirmar de certo modo estas indicações quando afirma que, no Estado de New York, a doença aparece sempre que a temperatura média local está próxima ou acima da normal durante Março, Abril, e Maio e que neste último mês haja cerca de 20 dias com uma queda pluviométrica mínima diária de 0,25 mm.

Segundo SIGRIANSKI e POTAPOVA (1937), a doença desenvolve-se no campo a uma temperatura média de 9° a 16,2° C. e a uma humidade relativa de 79 a 85 %.

II

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção de preparações histológicas permanentes

Fixação

Utilizámos o fixador cromo-acético com formalina, de Nawaschin-Randolph, preparado pouco antes da colheita do material atacado. Pequenos troços do caule com necroses foram cortados e colocados prontamente num frasco contendo aquele fixador, durante 48 horas. Passado este tempo, o material foi lavado em água corrente durante período idêntico.

Desidratação

Esta operação foi obtida introduzindo o material sucessivamente e durante 24 horas, em cada um dos componentes da seguinte escala dos álcoois:

Álcool etílico a 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90° e 100°.

Inclusão em parafina

Do álcool absoluto o material foi transferido para uma mistura de 3 partes de álcool absoluto para uma xilol, onde se manteve durante 24 horas e igual período de tempo nas sucessivas misturas de: partes iguais de álcool absoluto e xilol; 1 parte de álcool absoluto

para 3 de xilol e, finalmente, em xilol puro. Uma vez saturado este último com aparas de parafina, com ponto de fusão de 50°-52° C., o material foi colocado na estufa a 54° C. durante 48 horas.

Seguiu-se a inclusão do material em blocos de parafina (50°-52°C.).

Coloração

Uma vez obtidos os cortes histológicos no micrótomo regulado para a espessura de 12 μ , estes foram seguidamente estendidos em água tépida sobre lâminas de vidro previamente tratadas com albumina de Mayer.

Seguiu-se a coloração com hematoxilina Heidenhain-Safranina, cujas fases apontamos resumidamente:

- I — Desparafinação em xilol.
- II — Hidratação, passando sucessivamente por álcool a 100°, 95°, 90°, 70°, 50°, 30°, 10° e água destilada.
- III — Aplicação de alúmen férrico a 3 % durante 20 minutos.
- IV — Lavagem em água destilada.
- V — Coloração com Hematoxilina-Heidenhain acompanhada ao microscópio.
- VI — Lavagem em água destilada.
- VII — Coloração com safranina.
- VIII — Passagem rápida pelos álcoois a 70°, 80°, 90°, 95 e 100°.
- IX — Lavagem em xilol.
- X — Montagem em bálsamo do Canadá.

2. Método para avaliação da esporulação do *A. caulivorum* em diferentes meios de cultura

Sempre que se pretende avaliar a esporulação de qualquer fungo em diferentes meios de cultura, depara-se invariavelmente com dificuldades de diversa ordem, algumas delas derivadas da deficiência dos processos adoptados, outras porque implicam geralmente uma demorada e fastidiosa contagem.

Estes factos levaram-nos a tentar conseguir um processo que permitisse evitar, tanto quanto possível, aqueles inconvenientes e que, ao mesmo tempo, oferecesse suficiente rigor para que pudéssemos estabelecer com segurança os diferentes graus de esporulação verificados.

Ao cabo de várias tentativas, conseguimos estabelecer um método que consideramos expedito e com possibilidade de ter outras aplicações.

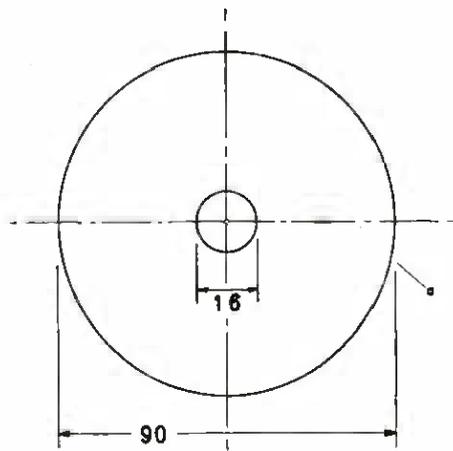
Para o estudo da esporulação do *A. caulivorum* servimo-nos de culturas em placas de Petri contendo diferentes meios gelosados, com 20 dias de idade e mantidas à temperatura de $20^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ C. Destas culturas retiramos por meio de um anel cortante com cerca de 2 mm de diâmetro, dois cilindros ou discos de gelose, sendo um extraído a meio do crescimento da colônia e outro na periferia desta. Os cilindros eram seguidamente introduzidos num tubo de ensaio contendo um ou mais * centímetros cúbicos de água e, por agitação do tubo durante um certo periodo de tempo, obtinha-se uma suspensão dos esporos.

Em cada tubo correspondente ao meio gelosado utilizado e por cada centímetro cúbico da suspensão, lançava-se depois uma gota de azul de algodão previamente filtrado e aquecia-se ligeiramente o tubo a fim de permitir uma maior fixação do corante pelos esporos. Seguidamente, a suspensão assim corada, era retirada do tubo por meio de uma pipeta e lançada num dispositivo que se obtém da seguinte maneira:

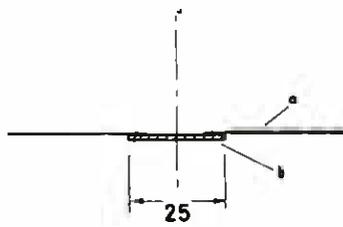
Utilizando um corta-buchas com o calibre de 16 mm, retira-se a um papel de filtro Whatman n.º 40, com 9 cm de diâmetro, uma superfície circular correspondente (fig. 1). Seguidamente, espalha-se um pouco de cola Duco Cement numa faixa de cerca de 3 mm à volta da abertura feita no papel e cola-se este sobre uma das faces de uma lâmina de vidro (fig. 2). Logo a seguir assenta-se verticalmente um tubo de vidro com 3-4 cm de comprimento, 16 mm de diâmetro interno e 2 mm de espessura, numa das suas extremidades (perfeitamente lisa), sobre o bordo da superfície circular da lâmina de vidro definida pela abertura feita no papel de filtro (fig. 3). Em seguida, fixa-se o tubo ao papel espalhando a cola referida à volta da sua extremidade, bem como sobre o papel, tal como mostra a fig. 4. Este pormenor é importante, pois conforme tivemos ocasião de verificar, só assim a colagem resulta perfeitamente.

Passado o tempo suficiente para que se consolide a colagem, lança-se a suspensão dos esporos no dispositivo acabado de referir; algum tempo depois, o líquido começa a ser removido do tubo por

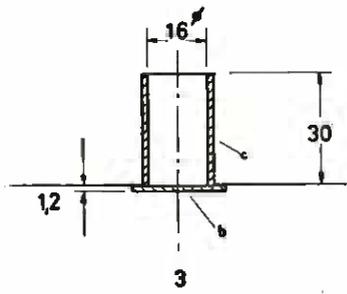
(*) Se a suspensão de esporos for demasiado densa, só uma conveniente e prévia diluição permitirá uma contagem perfeita.



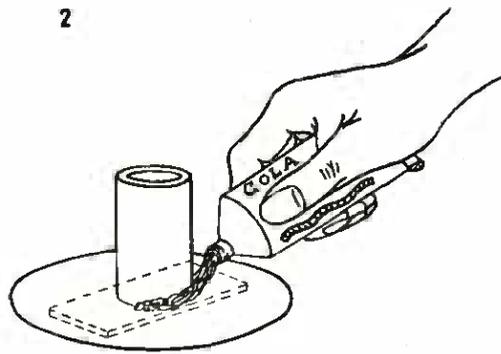
1



2



3



4

- a- Papel de filtro
- b- Lamina de vidrio
- c- Tubo de vidrio

Escala de 1:2

Figuras de 1 a 4

meio da sucção lateral desenvolvida pelo papel de filtro e, tão lentamente, que assegura uma sedimentação perfeita e bastante uniforme sobre a lâmina de vidro, dos esporos em suspensão. Com efeito, quer no centro, quer junto ao bordo do círculo, a densidade dos esporos é sensivelmente a mesma, o que faz com que qualquer campo observado ao microscópio seja bastante representativo da densidade existente. Para isso, bastará apenas destacar a lâmina e observá-la ao microscópio.

Em certos casos, se as diferenças na esporulação para os meios ensaiados forem graduais e perceptíveis, poderá até resultar vantajoso documentar apenas a relativa densidade dos esporos aderentes à lâmina, por meio de micro-fotografias. Caso contrário, haverá necessidade de recorrer a contagens, facto que nos levou a estabelecer as fórmulas que a seguir deduzimos e que, quanto a nós, apresentam grande simplicidade e permitem apurar valores com apreciável grau de rigor. Assim, sendo

v = volume da suspensão (ml)

D = diâmetro do tubo (cm)

d = diâmetro do campo microscópio (cm)

n = número de esporos por campo ou média das contagens de esporos em vários campos

A área do campo óptico será

$$a = \frac{\pi d^2}{4}$$

e A da superfície circular definida pelo diâmetro interno do tubo

$$A = \frac{\pi D^2}{4};$$

se designarmos por

n — o valor da contagem em a

N — o valor da contagem em A

$$N = \frac{An}{a} = \frac{D^2n}{d^2}$$

Como ao volume v da suspensão corresponde N , a 1 ml corresponderá a concentração

$$c = \frac{D^2}{vd^2} \times n \quad (1)$$

Para

$$k = \frac{D^2}{d^2}$$

$$c = \frac{kn}{v} \quad (2)$$

Por meio de um micrómetro verificámos que para uma objectiva 10x e uma ocular 15x, o diâmetro do campo óptico (d) do microscópio é 0,112 cm; sendo assim, e dado que $D = 1,6$ cm, então

$$k = \frac{(1,6)^2}{(0,112)^2} = 204,0$$

e, consequentemente:

$$c = \frac{204 n}{v} \quad (3)$$

ou, simplesmente,

$$c = \frac{200 n}{v} \quad (4)$$

se não for exigido grande rigor, dado que se comete apenas um erro de 2 %.

Se

$$v = 1, \quad c = 200 n \quad (5)$$

ou

$$c = 204 n \quad (6)$$

O número total de esporos T , existente num determinado volume V (em ml) da suspensão inicial de esporos referida à unidade padrão estabelecida será

$$T = cV \quad (7)$$

Quer dizer, as fórmulas deduzidas permitem não só avaliar o número de esporos por centímetro cúbico, isto é, a concentração, como também o número total de esporos existentes num determinado volume da suspensão, relativamente à unidade padrão estabelecida (no nosso caso os 2 cilindros de gelose com 2 mm de diâmetro retirados respectivamente a meio do raio e da periferia da colónia do fungo).

O processo pode aplicar-se indistintamente quer a partir dos meios líquidos ou gelosados e permite ainda o estudo da morfologia dos esporos nos mesmos.

Em virtude de permanecer sempre sobre a lâmina de vidro uma película de líquido que o papel de filtro não consegue remover, pode-se colocar depois uma lamela sobre a superfície circular que, devidamente lutada, poderá constituir uma preparação e permitir observações posteriores a curto prazo.

Com ligeiras adaptações, o método poderá ser também aplicado noutros estudos laboratoriais e prevemos que, nos meios industriais, resultará vantajoso na avaliação de partículas sólidas suspensas em líquidos. Além disso, contamos desenvolver outras aplicações no futuro, nomeadamente a utilização do processo na detecção de esporos de fungos em sementes.

3. Influência do pH no crescimento e esporulação do *A. caulivorum*

A) *Preparação dos extractos de batata glucosada a 2 % com diferentes valores de pH*

Os extractos foram preparados utilizando soluções tampões de ácido tartárico 0,1N, ácido cítrico 0,3N e soda cáustica 0,1N. As quantidades destes reagentes empregadas foram dadas pela curva de titulação do extracto de batata glucosada a 2 %, a qual foi obtida da seguinte maneira: sobre 50 c. c. de extracto lançámos 10 c. c. de ácido cítrico e igual volume de ácido tartárico. Em seguida, fomos lançando volumes sucessivos de soda cáustica e, ao mesmo tempo, íamos obser-

vando a variação do pH sofrida, por meio do Potenciômetro de Beckman.

Como tivéssemos verificado que o extracto de batata glucosada adicionado dos ácidos tartárico e cítrico ficasse com um pH ligeiramente superior a 3, houve necessidade de tamponizar a solução, em virtude de pretendermos estudar também aquele valor. Para isso, lançámos ácido clorídrico 0,25N sobre o extracto até o pH baixar para 2 e, em seguida, adicionámos soda cáustica até alcançarmos o pH 3.

Para todos os extractos aos diferentes valores de pH obtidos pela maneira indicada, houve depois que fazer uma correcção, de acordo com a alteração sofrida numa esterilização a 120°C. durante 25 minutos, tendo em vista a preparação do respectivo meio gelosado.

B) *Preparação dos meios gelosados*

Adicionámos 1,8 % de agar aos extractos de batata glucosada a 2 % com os valores desejados de pH, indo tudo a esterilizar no autoclave, à temperatura de 120°C. durante 25 minutos. Como os meios gelosados para os valores de pH 3 e pH 4 não tivessem solidificado com a quantidade de agar acima referida, conseguimos estabelecer por tentativas que, para obter a solidificação daqueles meios, seria necessário adicionar, respectivamente, 5 e 3 vezes a dose normal de agar.

4. **Determinação da eficácia relativa de alguns fungicidas sobre esporos de *A. caulivorum***

A) MATERIAL

Fungicidas

Estudámos a eficácia dos seguintes fungicidas:

Minerais:

Sulfato de cobre (padrão)

Oxicloreto de cobre com 50 % de cobre metal

Óxido cuproso com 50 % de cobre metálico

Orgânicos:

«captane» (83 % de Triclorometiltiotetra-hidroftalimida)
zinebe (65 % de Etileno-bis-ditiocarbamato de zinco)
zirame (90 % de Dimetilditiocarbamato de zinco)
Tiocianato de Dinrofenilo (com 45 % de matéria activa)

Fungo

O *A. caulivorum* foi cultivado em tubos de ensaio com gelose inclinada de batata glucosada a 2 %, à temperatura de $20^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Os esporos utilizados nos ensaios foram retirados quando as culturas tinham 7 dias de idade.

Atomizador

Os esporos foram distribuídos sobre a superfície do agar por meio de um atomizador manual, com base nos bicos de BURGERJON (1956).

B) MÉTODOS

Seguimos a técnica de Germinação em Placas de Agar proposta por GATTANI (1954), com algumas alterações introduzidas por TOMAZ (1958).

Estabelecidas as seis concentrações a utilizar para cada fungicida, fizemos igual número de diluições em água destilada, a partir duma suspensão-mãe, de maneira a que cada uma ficasse com uma concentração do fungicida dez vezes superior à que deveria ser utilizada no ensaio.

Empregámos um meio constituído por um extracto de bersim (sem raízes) a 1 % + agar a 1 %, por termos verificado que o referido extracto favorecia a germinação dos esporos (Cap. III). O meio, após a sua preparação era distribuído por tubos de ensaio, ficando cada um com 9 ml. Mantendo depois os tubos em banho-maria a 43°C ., lançava-se em cada, 1 ml da diluição do fungicida correspondente e assim se obtinha a concentração final desejada. Uma vez homogeneizado o seu conteúdo, cada tubo era despejado numa placa

de Petri com 7 cm de diâmetro, tendo-se utilizado três placas por cada concentração.

Solidificado o conteúdo das placas (meio gelosado + fungicida), colocavam-se num plano inclinado a 45° e atomizavam-se com uma suspensão de esporos, regulando ao microscópio a sua distribuição à ampliação 100x, até se obterem 35 a 50 esporos por campo. Aguardava-se depois que as gotículas secassem e, seguidamente, fechavam-se as placas e colocavam-se na estufa a $20^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Embora GATTANI (1954) recomendasse 18 a 20 horas de incubação, resolvemos adoptar o período de 16 horas porque ao fim daquele tempo os esporos apresentavam já hifas de tal modo desenvolvidas que dificultavam as contagens.

No termo do período de incubação adoptado, procedia-se à contagem dos esporos germinados e não germinados, à ampliação 100x do microscópio com o auxílio de dois contadores manuais.

Em cada placa faziam-se duas contagens em campos opostos, obtendo-se assim 6 repetições para cada concentração.

ESTUDO DO PARASITA

A) EM BERSIM

1. Sintomatologia externa da doença

Um campo de bersim fortemente atacado pelo *A. caulivorum* apresenta uma tonalidade acastanhada, como se as plantas tivessem sido chamuscadas. Este aspecto deve-se ao facto de os caules ostentarem lesões castanho-escuras, não sendo raro encontrarem-se quebrados, ao mesmo tempo que as folhas denunciam uma forte murchidão.

De uma maneira geral, os primeiros sintomas da doença aparecem no caule, pouco acima do solo, sob a forma de pequenas lesões castanhas semelhantes a traços que, pouco a pouco, vão alastrando e, por fim, ganham uma forma mais ou menos elíptica. No centro destas lesões nota-se então uma mancha central deprimida, castanha, com numerosas pontuações mais claras, correspondentes às frutificações; marginando essa mancha existe uma pequena orla castanho-escura. Com o tempo, essas manchas desenvolvem-se longitudinalmente, atingindo por vezes alguns centímetros. Mais tarde, tornam-se necróticas e chegam mesmo a fendilhar o caule que, sob a acção do vento, quebra facilmente, o mesmo se verificando pela actividade do próprio parasita que, com frequência, acaba por o circundar completamente.

Os pecíolos são também susceptíveis e as lesões do tipo circundante que surgem com frequência, fazem com que os folíolos depressa murchem.

Nas folhas também o ataque se verifica e os sintomas traduzem-se, normalmente, pela existência de pequenas manchas castanho-escuras em ambas as páginas.

Nem mesmo durante as inoculações que efectuámos sobre bersim, ou outras leguminosas forrageiras, encontrámos mais elementos a acrescentar à sintomatologia descrita minuciosamente por CABRAL e PINTO-GANHÃO (1959). Foi em bersim que verificámos, de longe, a maior intensidade de ataque e, em qualquer das outras cultivares ensaiadas, os sintomas observados nunca foram além de pequenas lesões castanhas nos caules e pecíolos (figs. 28 a 32) e, mesmo assim, em número reduzido.

2. Sintomatologia interna da doença

O estudo anátomo-patológico foi executado a partir de caules de bersim naturalmente infectado, com diferentes graus de ataque e colhido na Tapada da Ajuda, Lisboa. As preparações permanentes foram feitas de acordo com as técnicas laboratoriais descritas em Material e Métodos.

O exame, que incidiu sobre mais de dois mil cortes histológicos, permitiu-nos referir que, duma maneira geral, o micélio do fungo é um tanto grosseiro, extremamente escasso e com frequência corre ao longo da epiderme e logo abaixo desta. Contudo, algumas vezes foi possível observá-lo já em pleno parênquima clorofilino, ao nível das fibras pericíclicas.

À medida que o ataque se desenvolve, a fiada das células da epiderme parasitada achata-se fortemente, acabando por perder a individualidade. Sobre esta epiderme que dir-se-ia esmagada, erguem-se então densos grupos mas dispersos de conidióforos que fazem lembrar um estroma, onde surgem os típicos conídios fauciformes (fig. 5).

Outro aspecto digno de ser salientado refere-se ao facto de na vizinhança de qualquer zona necrosada, as paredes das células circundantes apresentarem uma ligeira descoloração acastanhada, quando nos tecidos sãos a cor conferida pelos corantes utilizados é azul-arroxeadada. Isto parece denotar que o desenvolvimento micelial é praticamente inter-celular, o que está de acordo com as observações de SAMPSON (1928), em *T. pratense*. Na verdade, para nós torna-se extremamente difícil afirmar, tal como MARTIN (1959), que o micélio

se desenvolve também intra-celularmente, uma vez que onde isto poderia dar-se, os tecidos estão fortemente desorganizados, subsistindo aí um emaranhado de paredes celulares de mistura com substâncias semelhantes a gomas. Estas, de maneira alguma poderão ser confundidas com micélio, porquanto apresentam uma coloração amarelada, enquanto que este, perante os corantes utilizados, surge arroxeadado.

A desorganização dos tecidos, provocada certamente pela actividade enzimática do fungo, é de tal modo intensa que a sua acção se faz sentir logo sobre as fibras pericíclicas, mesmo que a zona necrosada se situe junto à epiderme (fig. 6). Com efeito, estas ganham uma coloração mais intensa e adquirem um aspecto desorganizado, não obstante o parênquima clorofilino suprajacente parecer são.

Quando o corte abrange uma zona fortemente necrosada, verifica-se que a desorganização com frequência atinge severamente o floema e, não raramente, afecta com gravidade as camadas periféricas do xilema (fig. 7). Contudo, os feixes lenhosos parecem impedir que a desorganização celular se verifique mais profundamente. Na verdade, e perante o que nos foi dado observar, o colapso dos tecidos e, consequentemente, o fendilhamento do caule parece verificar-se sempre através dos raios medulares (fig. 8).

3. Diagnose do fungo

O exame microscópico do parasita, a partir de cortes realizados sobre lesões no caule de bersim, permitiu-nos estabelecer que as frutificações são de tamanho muito variável.

Os conídios são hialinos, ligeiramente fauciformes e medem $12-23 \times 3-5 \mu$. Estão inseridos sobre conidióforos grossos e dispostos tão densamente que sòmente em dois cortes distintos conseguimos observar a sua individualidade. Para estes casos, apurámos as dimensões de $13,3-31,9 \times 1,3-3,9 \mu$. Talvez porque os conídios se destacassem durante os cortes, foram raras as frutificações que os apresentaram e, nestes casos, não nos foi possível averiguar concretamente o número dos inseridos em cada conidióforo. Contudo, sòmente num corte nos pareceu que existiam quatro conídios sobre o mesmo.

Ainda no que respeita as dimensões dos conídios, SAMPSON e WESTERN (1954) indicam que sobre *T. pratense*, aqueles têm as seguintes dimensões: $8-24 \times 2,5-3,5 \mu$. Desta maneira, infere-se que as

nossas determinações são ligeiramente superiores às apontadas por estes autores, o que é perfeitamente admissível, dado que os hospedeiros são diferentes. Para mais, verificámos que sobre *T. resupinatum* ssp. *suaveolens* (trevo da Pérsia) naturalmente infectado por *A. caulivorum* na Tapada da Ajuda, os conídios obtidos das lesões nos caules, mediam $11-23 \times 2,4-4 \mu$.

B) EM MEIOS ARTIFICIAIS DE CULTURA

1. Caracteres culturais do *A. caulivorum* em diversos meios gelosados

a) Determinação do meio mais favorável ao crescimento

O fungo foi cultivado simultâneamente nos seguintes meios gelosados: Dox, malte, batata simples, batata glucosada a 2%, cenoura e bersim.

Utilizando culturas puras mantidas em gelose de batata glucosada a 2%, obtidas por isolamento a partir de plantas de bersim (*T. alexandrinum*), inoculámos seis placas de Petri para cada meio de cultura.

O inóculo era constituído por minúsculos cilindros, com cerca de 2 mm de diâmetro, retirados das referidas culturas em placas, por meio de uma agulha terminada em anel cortante e colocado no centro de cada placa. Todas as placas foram depois incubadas na estufa a $23^{\circ} \text{C.} \pm 0,5^{\circ} \text{C.}$

Em virtude de o crescimento do fungo se ter revelado muito lento, mantivemos o ensaio durante um mês e, em intervalos de 48 horas, registávamos os crescimentos das colónias obtidos pela média aritmé-

QUADRO 1

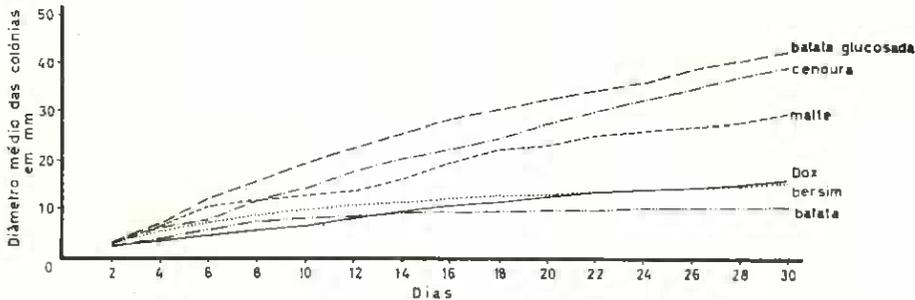
Crescimentos médios (mm) do fungo em seis meios de cultura ao longo do período de um mês

Dias \ Geloses	Dias														
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
batata glu- cosada	3,0	6,9	12,1	15,8	19,5	22,6	25,4	28,0	30,2	32,4	34,2	36,0	39,0	40,9	42,6
batata	2,2	4,0	5,7	7,2	8,0	8,7	9,1	9,3	9,6	9,8	9,8	10,3	10,3	10,3	10,5
cenoura	3,1	6,3	7,3	11,6	14,1	17,8	20,6	22,5	24,6	27,3	30,0	32,5	34,6	37,1	39,3
bersim	3,0	5,1	7,1	8,2	9,9	10,9	11,3	12,2	12,9	13,1	13,5	14,1	14,5	15,0	15,5
Dox	2,5	3,5	4,4	5,2	6,3	8,0	9,4	10,4	11,6	12,4	13,2	13,9	14,6	15,2	15,9
malte	2,6	6,5	10,3	11,6	12,8	13,8	16,1	19,8	22,1	23,2	25,0	26,1	27,0	27,8	29,6

tica de duas leituras diametraais ortogonais em cada placa, onde os diâmetros tinham sido previamente marcados a tinta da China. Elaborámos então o Quadro 1 e, a partir deste, o Gráfico I, onde figura em abcissas o número de dias considerado e, em ordenadas, os valores dos crescimentos médios do fungo em cada meio, durante o mesmo período de tempo.

GRÁFICO I

Crescimentos médios (mm) do fungo em seis meios de cultura ao longo do período de um mês



A análise do presente gráfico permite concluir que o *A. caulivorum* cresce melhor nas geloses de batata glucosada, cenoura e malte e, muito menos nos meios de Dox, bersim e batata.

Gelose de batata glucosada a 2% — Foi este o meio em que o *A. caulivorum* atingiu maior crescimento, tendo alcançado o diâmetro médio de 42,6 mm ao fim de 30 dias.

A colônia apresenta (fig. 9) um contorno irregular e bastantes sulcos orientados radialmente. O micélio mostra uma coloração verde-escura, de aspecto viscoso na zona central da colônia, enquanto na orla exterior se apresenta, dum modo geral, finamente pulverulento, verde-oliváceo.

Na face inversa da placa, a zona central correspondente à mancha com aspecto viscoso, ostenta uma coloração cinzento-amarelada bastante permeável à luz, enquanto a superfície restante se apresenta cinzento-escura. Além disso, a colônia mostra-se fendilhada nas regiões correspondentes aos sulcos da face superior.

Gelose de cenoura — Este meio ocupa o 2.º lugar quanto ao crescimento do fungo, o qual atingiu o diâmetro médio de 39,3 mm ao fim de 30 dias.

A colônia apresenta um contorno bastante irregular (fig. 10),

sendo a zona central ocupada por micélio verde-oliváceo com aspecto pulverulento. Na orla exterior, o micélio mergulha no meio gelosado, onde originou uma tonalidade verde-escura.

Na face inversa da placa e na zona central, a colónia surge opaca com pequenas fendas junto ao centro, enquanto a orla exterior se apresenta verde-escura e um tanto permeável à luz.

Gelose de malte — O fungo alcançou neste meio o diâmetro médio de 29,6 mm ao fim do tempo já referido, ocupando o 3.º lugar, quanto à sua preferência.

A colónia apresenta um contorno bastante irregular (fig. 11) e, numa zona central em que o micélio está em elevação, tem um aspecto pulverulento de coloração cinzento-esverdeada que se estende depois junto à superfície da gelose até alcançar uma zona periférica em que mergulha mesmo na gelose. O micélio assim imerso dá origem nessa zona a uma coloração verde-escura.

Na face inversa da placa, a colónia apresenta a zona correspondente à elevação, com uma coloração homogênea semelhante à do meio gelosado, enquanto a restante superfície mostra uma tonalidade escura e uniforme. Em algumas placas aparece ainda uma fenda diametral.

Gelose de Dox — Este meio ocupa o 4.º lugar de preferência pelo fungo, o qual atingiu o diâmetro médio de 15,9 mm ao fim de 30 dias.

A colónia tem um contorno irregularmente arredondado (fig. 12) e o micélio é muito compacto, de coloração verde-escura e apresenta alguns sectores cinzento-claros. Além disso, a colónia mostra um perfil sobre-elevado, em que o micélio forma depressões e elevações, oferecendo um aspecto verrucoso.

Na face inversa da placa nota-se uma tonalidade mais clara, apresentando a colónia algumas fendas radiais.

Gelose de bersim — Ao contrário do que se poderia supor, este meio ocupa o penúltimo lugar, no que respeita ao crescimento, pois o fungo alcançou apenas o diâmetro médio de 15,5 mm, ao cabo de 30 dias.

A colónia (fig. 13) apresenta um contorno um tanto arredondado em que o micélio mostra um aspecto curioso. Assim, na zona central é negro e compacto e, numa orla seguinte, já se apresenta branco e floconoso, para na orla periférica se mostrar, de novo, negro e compacto, com aspecto verrugoso.

Na face inversa da placa, a colónia apresenta uma tonalidade escura uniforme e uma auréola acastanhada à sua volta.

Gelose de batata simples — Foi neste meio que o fungo evidenciou menor crescimento, atingindo apenas 10,5 mm de diâmetro médio, ao cabo de 30 dias.

A colônia apresenta um contorno irregular (fig. 14), com bordos finamente franjados. O micélio é pulverulento, de cor cinzento-arroxeadada e superficial na zona central; na periferia da colônia mergulha no meio gelosado, onde dá origem a uma coloração branco-amarelada.

Na face inversa da placa, acentuam-se as colorações referidas.

b) *Determinação do meio mais favorável à esporulação*

Para o estudo da esporulação do *A. caulivorum* nos meios gelosados de batata, batata glucosada a 2 %, bersim, cenoura, Dox e malte, inocularam-se placas de Petri contendo os meios referidos, mediante o processo já referido anteriormente. As placas foram seguidamente colocadas na estufa a $22^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ C. e após 20 dias de incubação e para cada meio, retirámos da respectiva colônia por meio de um anel cortante com cerca de 2 mm de diâmetro, dois cilindros ou discos com crescimento do fungo, sendo um extraído da periferia da colônia e outro sensivelmente a meio do raio. Seguidamente, ambos os cilindros eram introduzidos num pequeno tubo de ensaio contendo 1, 2 ou 3 c. c. de água destilada, de acordo com a esporulação manifestada numa prévia suspensão, dado que a contagem seria feita ao microscópio e, portanto, o campo óptico não deveria apresentar uma excessiva densidade de esporos que dificultasse aquela operação.

Utilizou-se em seguida o dispositivo da fig. 4 descrito em Material e Métodos, que permite avaliar a esporulação a partir da concentração de esporos numa suspensão em 1 ml de água, relativamente à unidade padrão estabelecida (no nosso caso, os 2 cilindros de gelose com 20 mm de diâmetro, já referidos).

Para cada meio fizeram-se contagens em 10 campos ópticos ao acaso. Conforme se pode observar no Quadro 2, os registos obtidos parecem demonstrar que a distribuição dos esporos na lâmina é bastante regular.

No Quadro 2A figura o número médio de esporos por campo óptico (n) e a correspondente concentração dada pela fórmula $c = 204 \cdot n$, por nós deduzida em Material e Métodos, dado que em todos os casos se deve retirar apenas 1 ml. da suspensão inicial de esporos, por meio de uma pipeta graduada, que se descarrega no dispositivo já referido. Na última coluna figuram os valores totais da

ESTAMPA I

Aspectos anátomo-patológicos em caules de bersim naturalmente infectados pelo *A. caulivorum*.

Figura 5 — *Frutificação do A. caulivorum constituída por densos conidióforos, onde se observam alguns conídios fauciformes. Note-se ainda a desorganização do parênquima clorofilino subjacente e a coloração escura, anormal, das fibras pericíclicas.*

Figura 6 — *Ataque incipiente junto à epiderme e efeito à distância do A. caulivorum sobre as fibras pericíclicas.*

Figura 7 — *Quatro frutificações do A. caulivorum sobre uma epiderme e parênquima clorofilino completamente destroçados. Além das fibras pericíclicas, o floema foi severamente desorganizado, assim como algumas camadas do xilema.*

Figura 8 — *Severas necroses afectando todas as zonas referidas nas figs. anteriores; note-se que o caule está prestes a fendilhar, perante o colapso dos raios medulares, tal como indicam as setas.*

ESTAMPA II

Aspectos assumidos pelas colónias do *A. caulivorum* ao fim de 30 dias e a $23^{\circ} \pm 0^{\circ},5$ C. nos seguintes meios gelosados:

Figura 9 — *Em gelose de batata glucosada a 2%*

Figura 10 — *Em gelose de cenoura*

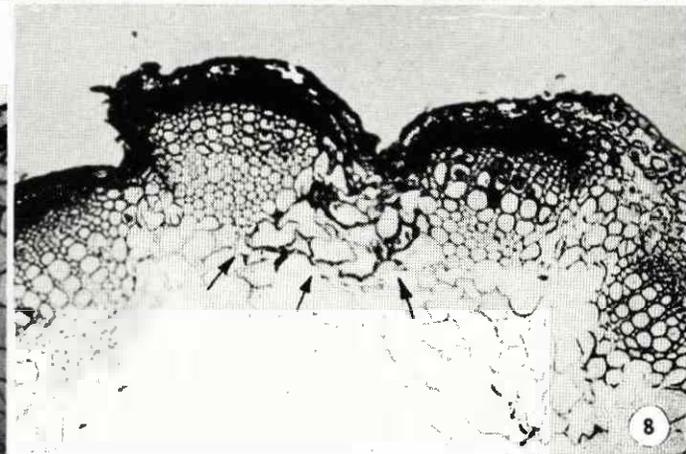
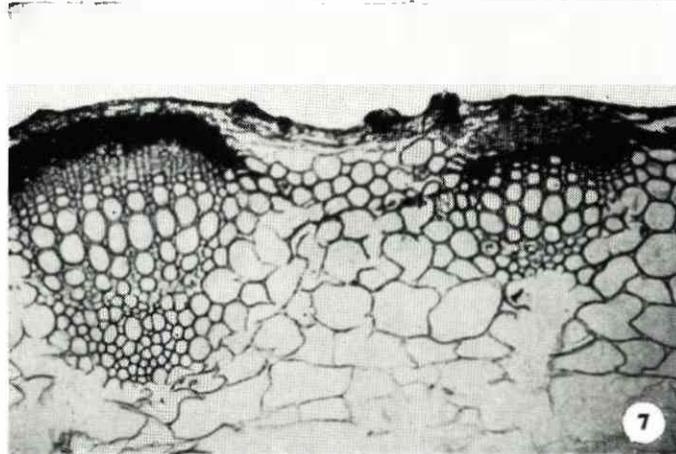
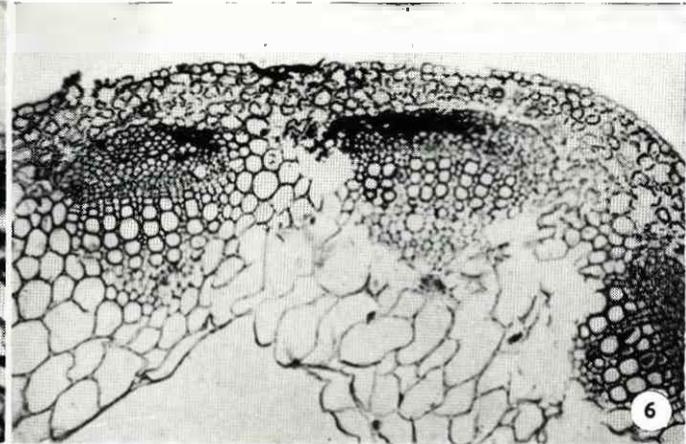
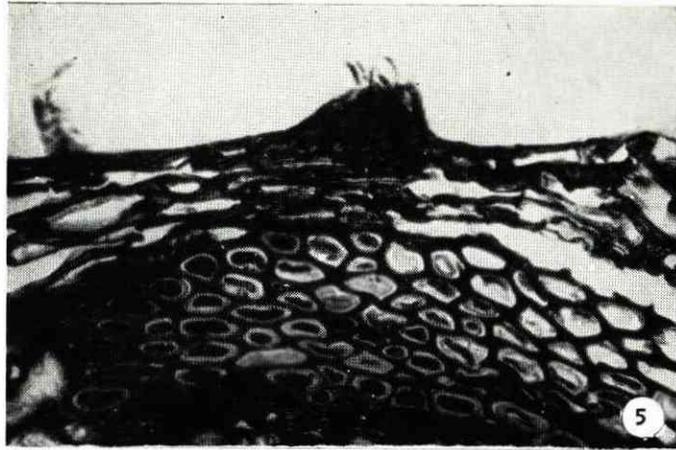
Figura 11 — *Em gelose de malte*

Figura 12 — *Em gelose Dox*

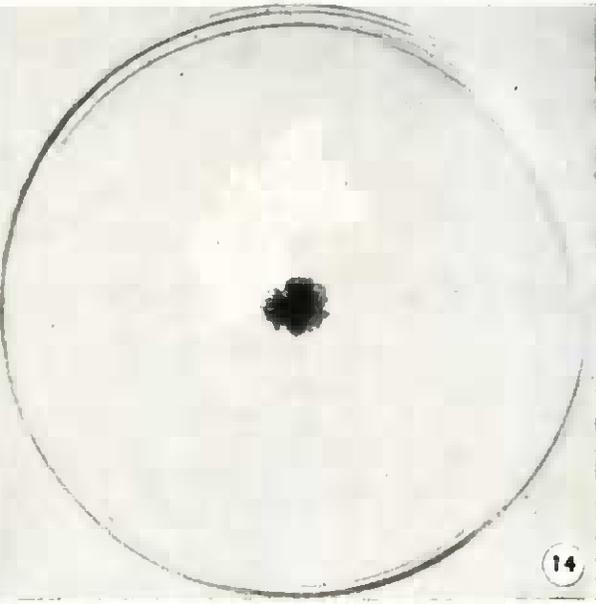
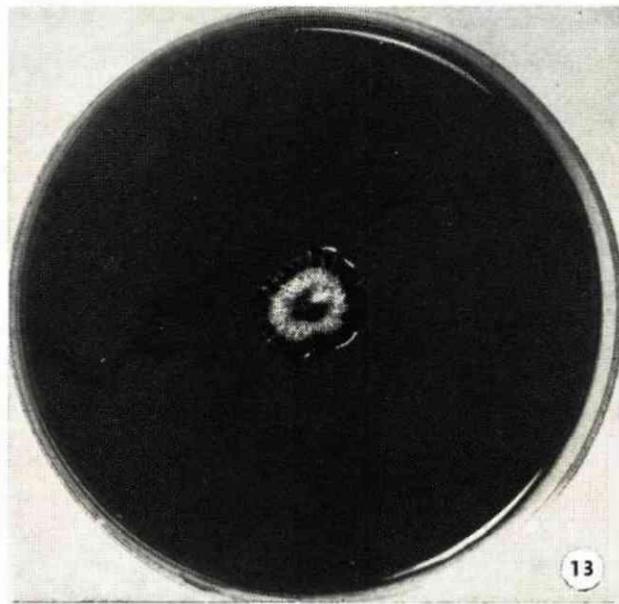
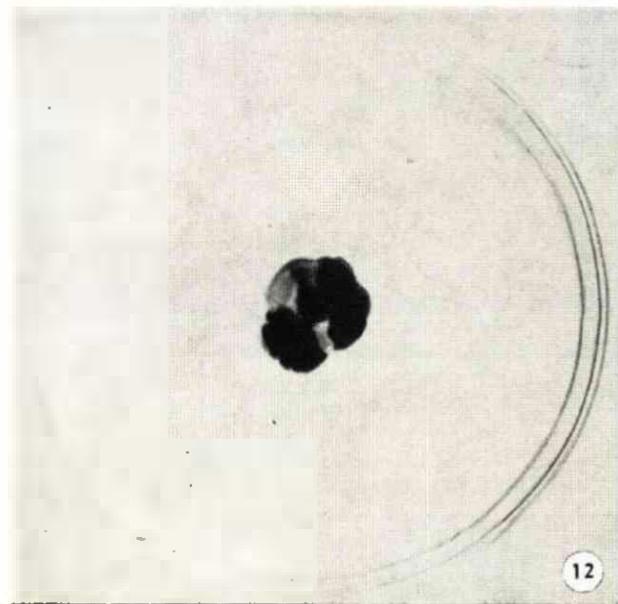
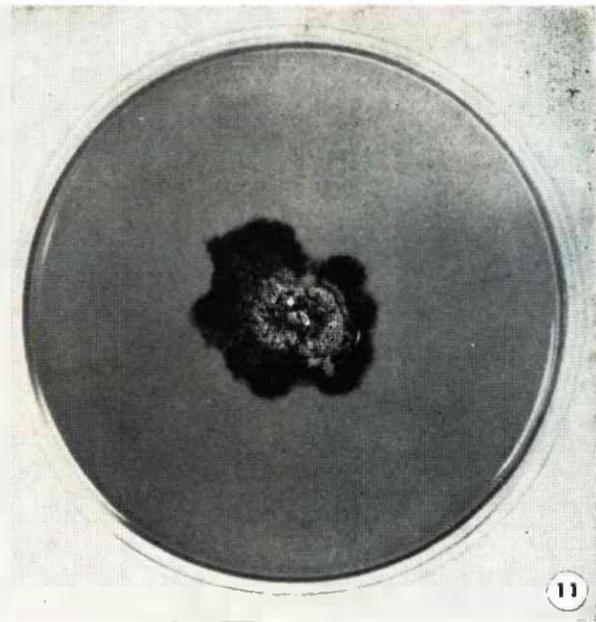
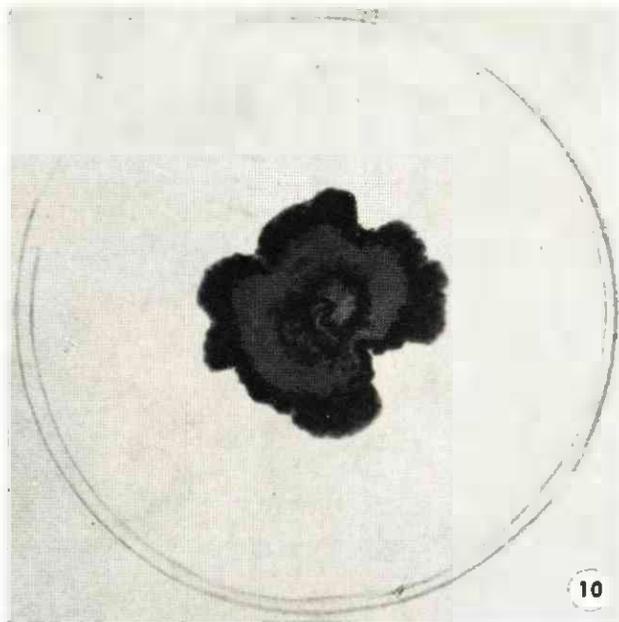
Figura 13 — *Em gelose de bersim*

Figura 14 — *Em gelose de batata*

ESTAMPA I



ESTAMPA II



QUADRO 2

Esporos existentes em 10 campos ópticos à ampliação 150X do microscópio, para cada meio de cultura ensaiado

Geloses	Campos ópticos										Total de esporos
	1.º	2.º	3.º	4.º	5.º	6.º	7.º	8.º	9.º	10.º	
batata	51	46	47	53	53	48	46	50	56	47	497
batata glucos. a 2 %	5	7	5	4	3	5	5	7	5	6	52
bersim	152	147	151	144	143	156	134	150	133	158	1468
cenoura	42	25	25	39	29	33	27	32	35	37	324
Dox	10	11	7	10	6	8	7	9	11	11	90
malte	42	46	48	39	48	38	51	46	52	43	453

QUADRO 2A

Meios gelosados	Número médio de esporos por campo óptico n	Número de esporos em 1 ml de suspensão em água c = 204 n	Número total de esporos no volume V da suspensão inicial T = cV
batata	50	10 200	30 600
batata glucosada a 2 %	5	1 020	1 020
bersim	147	29 988	59 976
cenoura	32	6 528	13 056
Dox	9	1 836	1 836
malte	45	9 180	9 180

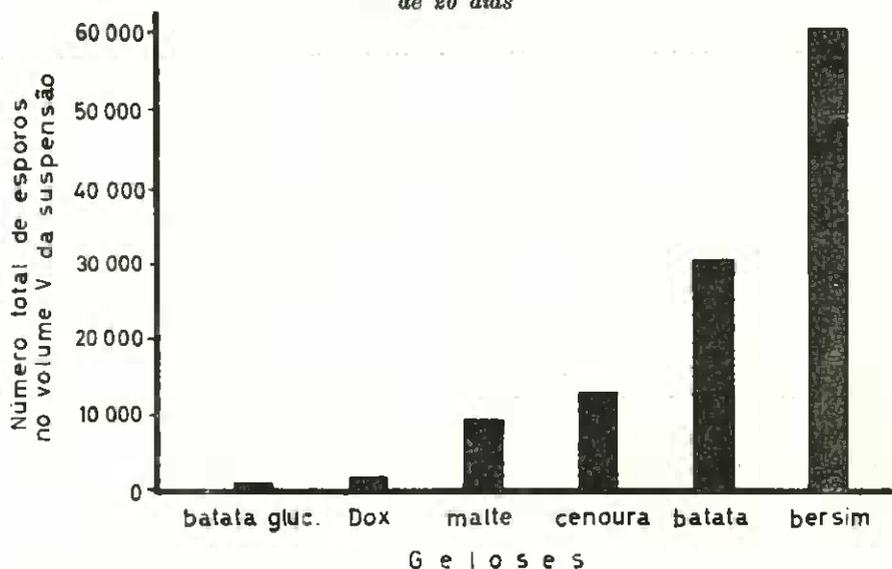
esporulação (T) para cada meio e referidos à unidade padrão estabelecida, tomando em conta o volume V (em ml) da suspensão inicial de esporos.

A partir dos valores de T, elaborámos o Gráfico II, que vinca bem a posição relativa de cada meio de cultura ensaiado na esporulação do *A. caulivorum*.

Em face do referido Gráfico, podemos concluir que, nas condições decorrentes do ensaio, o fungo esporula melhor em gelose de bersim e, logo a seguir, na de batata, apesar de o valor obtido para este meio ser cerca de metade do primeiro. Ocupando o 3.º lugar e ainda com apreciável esporulação, situa-se a gelose de cenoura; seguidamente e por ordem decrescente, os meios de malte, Dox e batata glucosada a 2 %, onde a esporulação não foi tão expressiva, principalmente em relação aos dois primeiros meios.

GRÁFICO II

Esporulação do A. caulivorum em seis meios de cultura a $22^{\circ} \pm 0,5^{\circ} C.$, ao fim de 20 dias



2. Influência da temperatura no crescimento do *A. caulivorum*

Uma vez que o fungo tinha revelado maior crescimento em gelose de batata glucosada a 2 %, escolhemos este meio para avaliarmos a influência da temperatura no seu crescimento. Preparámos para cada temperatura 6 placas de Petri, contendo esse meio, as quais foram inoculadas segundo o sistema adoptado anteriormente.

As placas foram submetidas, durante 20 dias, às seguintes temperaturas (com oscilação de $\pm 0,5^{\circ} C.$): $17^{\circ} C.$, $20^{\circ} C.$, $21^{\circ} C.$, $22^{\circ} C.$, $23^{\circ} C.$, $24^{\circ} C.$, $25^{\circ} C.$, $26^{\circ} C.$ e $27^{\circ} C.$

Os crescimentos das colónias foram obtidos pela média aritmética de duas leituras diametraes ortogonais, a partir das quais elaborámos o Quadro 3 e o Gráfico III, tomando para abcissas o número de dias considerado e para ordenadas os valores dos diâmetros médios atingidos durante o mesmo período de tempo. Neste gráfico apenas representámos os crescimentos do fungo para as temperaturas de 17° , 20° , 22° , 24° , 26° e $27^{\circ} C.$, em virtude de muitos dos valores referentes às temperaturas intermédias serem muito semelhantes e, portanto, de difícil representação gráfica.

QUADRO 3

Crescimentos médios (mm) do fungo em gelose de batata glucosada, a diversas temperaturas

Tempe- raturas	Dias									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
17° C.	2,0	3,7	7,0	11,8	15,5	17,2	18,3	20,2	21,7	22,0
20° C.	3,7	8,5	11,8	15,8	20,6	23,2	26,2	28,8	30,3	32,5
22° C.	4,3	9,3	13,2	17,5	22,8	27,5	31,7	35,0	37,8	41,0
24° C.	5,0	9,0	12,0	17,0	22,0	26,5	30,0	33,3	35,2	36,5
26° C.	4,3	7,2	11,8	14,0	22,8	26,5	29,5	32,2	34,5	35,6
27° C.	3,7	5,8	6,5	8,3	11,5	13,5	15,8	18,3	20,0	22,0

No gráfico IIIa apresentamos a variação do crescimento, com todas as temperaturas ensaiadas, ao fim do período considerado.

GRAFICO III

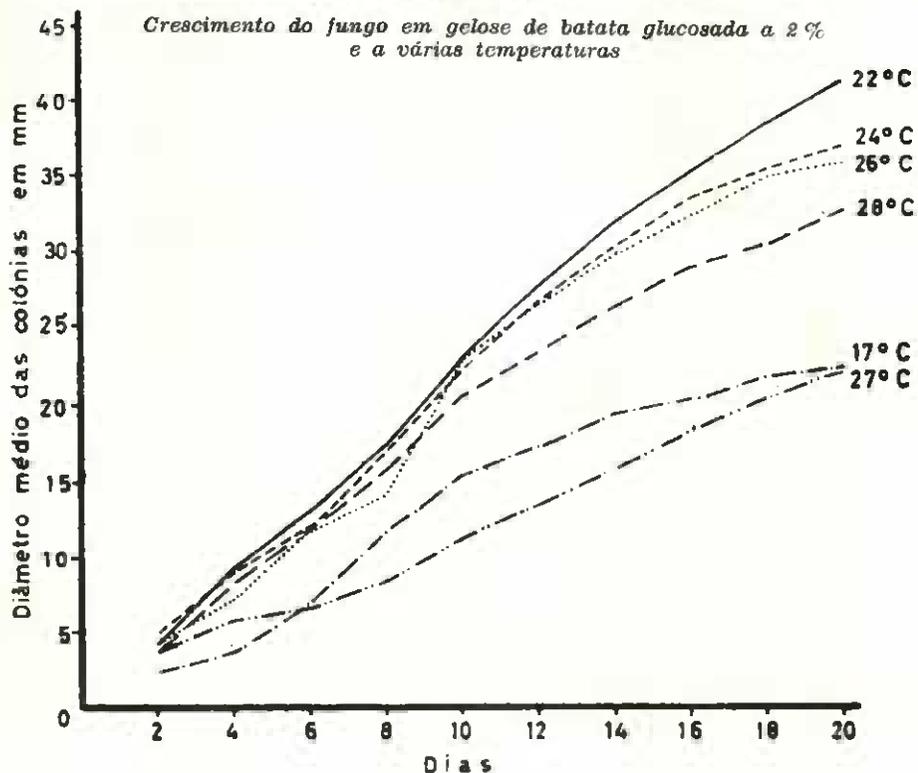
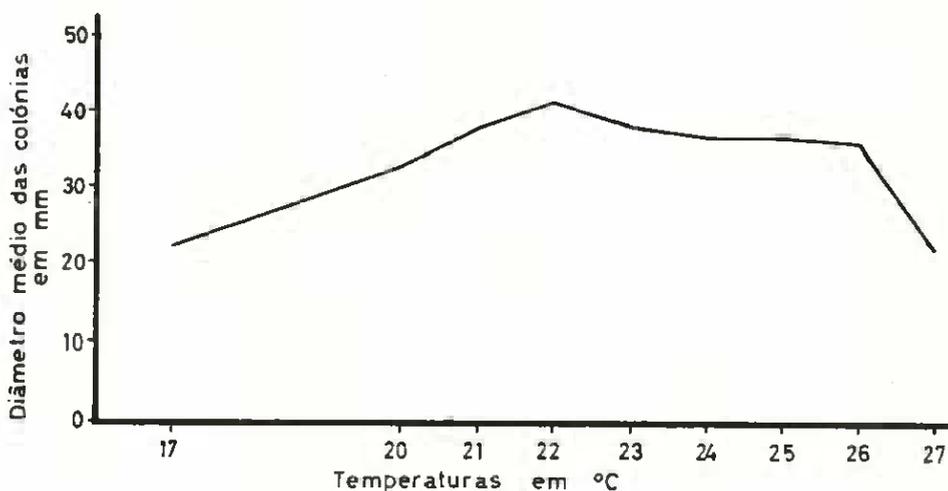


GRAFICO IIIa

(Ao fim de 20 dias)



Consultando os gráficos III e IIIa, verifica-se que a temperatura óptima de crescimento está próxima de 22° C. Observa-se ainda que entre 23° C. e 26° C. o crescimento do fungo é muito semelhante, não obstante decrescer muito lentamente. No entanto, a 27° C. já sofre uma quebra bastante acentuada, atingindo apenas um valor praticamente idêntico ao alcançado à temperatura de 17° C., embora esta última se tenha mostrado de início mais desfavorável.

Culturas submetidas a 30°, 32°, 34°, 36°, 38° e 40° C., durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias e depois transferidas para o meio ambiente, vieram revelar que, para o período de 1 dia, todas as temperaturas ensaiadas permitiram o posterior desenvolvimento do fungo. Para os 2 dias, apenas a temperatura de 40° C. foi letal e o mesmo já aconteceu para o período de 3 dias, em relação à temperatura de 38° C. Relativamente ao período de 4 dias, mantinha-se a letalidade observada anteriormente e, no que respeita ao de 5 dias, verificou-se que a temperatura de 36° C. foi letal, assim como a de 34° C. durante 6 dias. Finalmente, as temperaturas de 30° e 32° C. actuando durante 7 dias não foram suficientes para causar a morte do parasita.

De salientar, em face do exposto, a apreciável resistência que o fungo revelou, de uma maneira geral, às temperaturas relativamente altas que se ensaiaram.

Decidimos não experimentar temperaturas inferiores a 17° C..

em virtude de COLE e COUCH (1958) terem verificado que o *Aureobasidium caulivorum* era capaz de sobreviver 20 meses a -10°C . Este facto afasta, portanto, qualquer hipótese de o parasita não resistir aos rigores do inverno no nosso país.

3. Influência do pH no crescimento e esporulação do *A. caulivorum*

Crescimento

Para estudar a influência do pH no crescimento do fungo, cultivámo-lo em placas de Petri contendo meio gelosado de batata glucosada a 2%, com os seguintes valores de pH: 3; 4; 5; 6; 7,5; 8; 8,5 e 9.

Os ensaios realizaram-se à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. que, conforme referimos, foi a mais favorável ao crescimento e, para cada valor do pH, ensaiámos 6 placas. Este estudo decorreu durante 20 dias e o apuramento dos resultados fez-se segundo os processos já mencionados anteriormente e constam do Quadro 4.

QUADRO 4

Crescimentos médios (mm) do *A. caulivorum*, em gelose de batata glucosada a 2% a diferentes valores de pH, ao longo de um período de 20 dias

Dias \ pH	Dias									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
3	2,8	2,9	3,5	4,7	8,7	11,6	15,5	17,0	18,0	20,1
4	3,0	3,0	3,3	4,1	6,1	8,8	12,2	13,3	13,6	15,2
5	2,5	2,6	3,0	4,0	5,1	6,4	7,9	8,6	9,0	9,7
6	2,7	2,8	3,1	3,6	4,6	5,4	7,1	7,9	8,1	8,8
7	2,5	2,5	2,7	3,3	3,7	4,3	5,0	5,2	5,4	5,4
7,5	2,4	2,5	2,5	2,5	2,6	3,5	4,2	4,8	5,1	5,1
8	2,3	2,3	2,3	2,5	2,5	2,8	3,5	4,0	4,1	4,1
8,5	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,8	3,1	3,1	3,1
9	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,5	2,5	2,5

A partir destes elementos elaborámos os Gráficos IV* e IVa, onde se pode verificar que o pH 3 foi aquele que favoreceu mais o cres-

* Não apresentámos neste gráfico os crescimentos para os valores de pH 7,5; 8 e 8,5 por serem de difícil representação gráfica, conforme se pode avaliar do Quadro 4.

cimento. Este foi sempre decrescendo gradualmente à medida da elevação do pH, mas mais apreciavelmente até a pH 7; para valores ainda mais altos, os crescimentos foram mínimos e praticamente inalteráveis a partir do 14.º dia.

GRAFICO IV

Crescimento do A. caulivorum em gelose de batata glucosada a 2%, a diferentes valores de pH e à temperatura de $22^{\circ} \pm 0,5$ C.

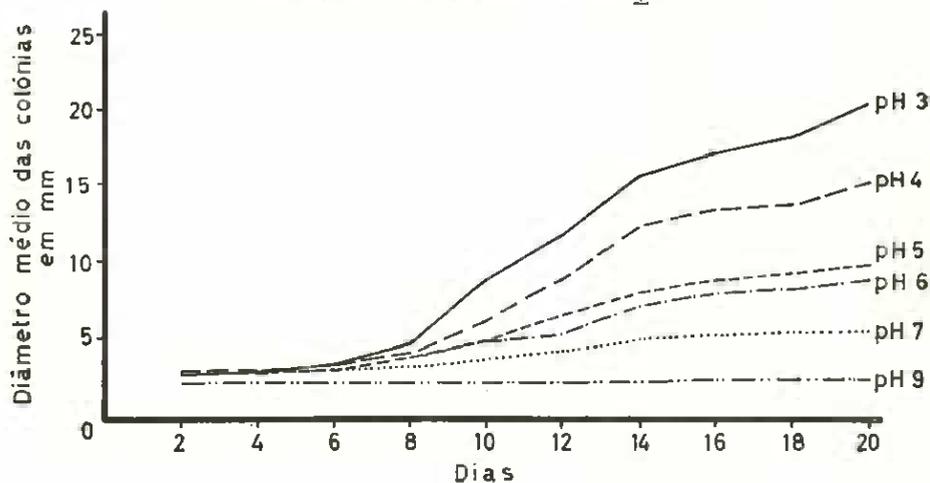
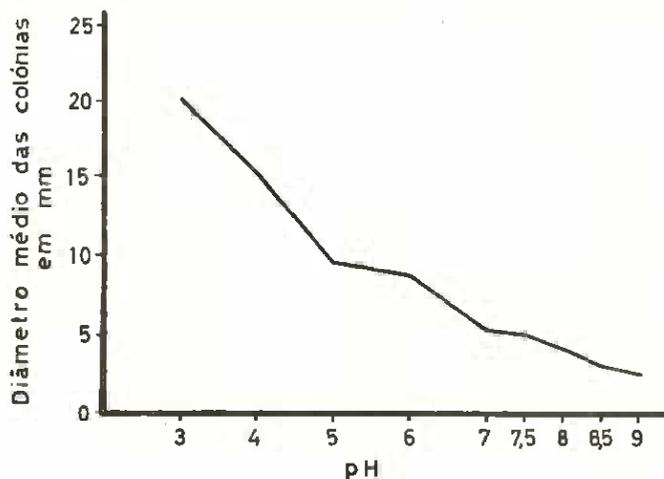


GRAFICO IVa

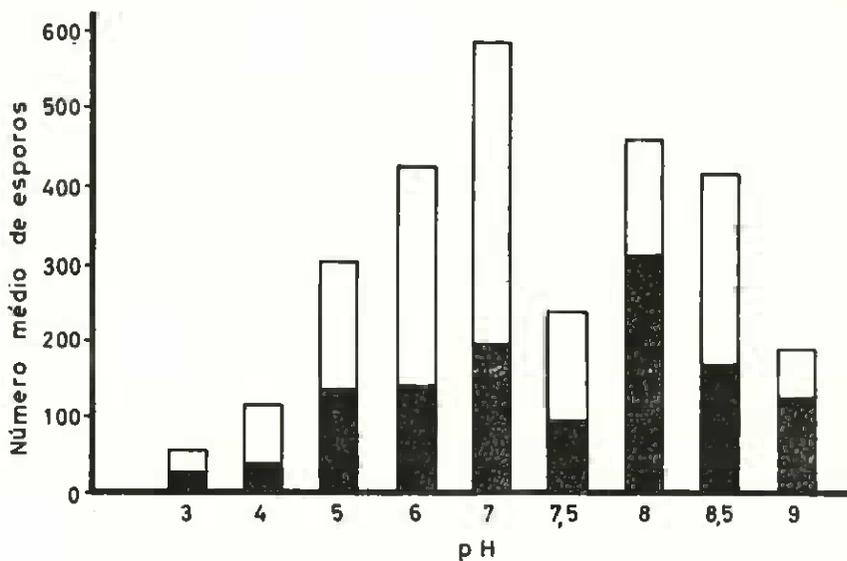
Crescimento máximo alcançado pelo fungo ao fim de 20 dias



A partir dos valores da média que figuram neste quadro, elaborámos o Gráfico V que indica ainda, de uma maneira geral, que o fungo esporula melhor na zona situada a meio do raio da colónia, que na sua periferia.

GRAFICO V

Esporulação média do A. caulivorum em agar de batata glucosada a 2% a diferentes valores de pH, à temperatura de $22^{\circ} \pm 0,5$ C. e ao fim de 35 dias



□ Amostragem colhida a meio do raio da colónia

■ Amostragem colhida na periferia da colónia

De todos os valores ensaiados, foram o de pH 7 e o de pH 8 que permitiram maior esporulação, com ligeira supremacia para o primeiro valor; contudo, pode-se considerar que o fungo esporula satisfatoriamente entre pH 5 e pH 8,5 e ligeiramente menos a pH 9, sendo a pH 3 que esporulação foi mais fraca.

4. Estudo da germinação dos esporos do *A. caulivorum*

a) *Em água destilada esterilizada, em câmara de Van Tieghem*

Neste ensaio utilizámos culturas em batata glucosada a 2%, com 7 dias de idade, mantidas à temperatura de $20^{\circ} \text{C.} \pm 0,5^{\circ} \text{C.}$

A água destilada esterilizada empregada na gota pendente possuía o pH 6,4 e uma vez esta inoculada por leve contacto com uma agulha portadora de esporos, colocou-se a câmara de Van Tieghem na platina de um microscópio que estava apetrechado com uma câmara fotográfica. O estudo decorreu durante 2 meses à temperatura ambiente, a qual oscilou entre 12 e 17° C. No início do ensaio os esporos apresentavam o aspecto da fig. 15 e mediam $25,6 - 5,12 \mu \times 5,32 - 1,33 \mu$.

De 24 em 24 horas observávamos a preparação e, sempre que julgámos conveniente, fotografámos alguns aspectos mais elucidativos.

Ao fim de 24 horas, alguns esporos emitiram o que nos pareceu ser um curto utrículo germinativo, enquanto outros apresentavam por gemulação um e dois esporos polares, ao passo que a maioria permanecia inalterável.

Passadas 48 horas, novos esporos haviam originado um utrículo polar ou lateral, com uma forma e tamanho semelhante ao esporo original e ligado a este apenas por um estrangulamento (fig. 16). Entretanto, alguns esporos apresentavam 3 pequenas gémulas num dos polos e uma quarta no polo oposto, enquanto outros possuíam uma gémula em cada polo e, menos frequentemente, quatro apenas num dos polos.

Ao fim de 72 horas, continuavam-se a observar os aspectos já referidos, apenas de salientar o caso da fig. 17, em que a partir de uma gémula polar se haviam formado no seu polo 4 novas gémulas mais pequenas, duas a duas em cadeia. Mais frequentemente, surgia uma gémula polar que por sua vez ostentava uma pequena gémula também polar.

Após uma semana, os esporos que até então não haviam entrado em gemulação, apresentavam maiores dimensões que todos os restantes, e escureciam consideravelmente; enquanto a maioria permanecia sem septos, alguns começaram por sofrer um ligeiro estrangulamento a meio e, finalmente, surgiram com um septo e, mais raramente, com dois septos (fig. 18).

Ao fim de 14 dias, um dos aspectos gerais observados era o da fig. 18, tendo-se também começado a verificar que os esporos uni-septados ou desenvolviam extraordinariamente um dos lóculos, que viria a originar de novo a gemulação no seu polo (fig. 19) e ficando o outro atrofiado, ou então os dois lóculos gemulavam nos seus polos e, neste caso, a partir de uma das gémulas desenvolvia-se uma pequena hifa germinativa que se segmentava e originava nova gemulação

onde, tal como na fig. 19, os esporos surgem agora com a forma tipicamente curva dos conídios do fungo, como estávamos habituados a observar sobre o hospedeiro.

Quanto aos esporos não septados, a partir do 20.º dia começaram a tomar uma coloração verde-amarelada escura, adquiriam a forma de um limão ou elíptica (fig. 19), formando-se directamente por gemulação polar número variável daqueles esporos curvos, chegando-se a observar nove.

Ao fim de 27 dias, pudemos observar formações deveras curiosas. Assim, a partir dos aspectos referidos para os 14 dias, acabou por se formar na extremidade de uma hifa um órgão lembrando um basídio, onde se inseriam os esporos curvos típicos do *A. caulivorum* sobre o hospedeiro. Quase sempre esse órgão possuía um pequeno lóculo superior onde esses esporos se inseriam (fig. 20), mas casos havia em que a inserção se fazia directamente, não se verificando, portanto, a existência de tal lóculo.

Ao fim de um mês, permaneciam os vários aspectos já descritos desde o início.

O ensaio deu-se por terminado ao fim de dois meses, embora a gota pendente continuasse completamente funcional. Não surgiram novos aspectos dignos de referência e, de uma maneira geral, predominavam então fortemente na preparação os esporos curvos acabados de referir e, em menor número, os casos de gemulação tão característicos dos primeiros dias após a inoculação.

b) *Germinação em água destilada*

Da mesma maneira que no ensaio anterior, começámos por estudar a germinação dos esporos de *A. caulivorum* a partir de culturas com 7 dias de idade em gelose de batata glucosada a 2 % mantidas a 20° C. \pm 0,5° C.

Uma vez obtida a suspensão-mãe de esporos em água destilada de pH 5,3, preparávamos uma suspensão de maneira a que retirando dela uma gota e lançando-a sobre 1 ml de água destilada, se obtinha uma tal diluição onde se pudesse contar cerca de 35 a 50 esporos por campo óptico, à ampliação 100x do microscópio (TOMAZ, 1958).

Retirávamos então, com uma pipeta, duas gotas desta suspensão que eram lançadas em cada um de três anéis de parafina, previamente

executados sobre uma lâmina de vidro, tal como indicam CHANCOGNE e VIEL (1956).

As lâminas eram depois colocadas dentro das placas de Petri e assentes sobre duas varetas de vidro, tendo aquelas o fundo coberto por papel de filtro embebido em água destilada. A fim de evitar ainda melhor a evaporação das gotas postas nos anéis de parafina, as placas, que podem conter duas lâminas de vidro cada, eram por sua vez mantidas em câmara húmida. Para o efeito, introduziam-se num tabuleiro de zinco com o fundo coberto por um tapete de espuma de nylon embebido em água e tapado superiormente com uma chapa de vidro. Este conjunto era depois colocado na estufa à temperatura de $20^{\circ} \text{C.} \pm 0,5^{\circ} \text{C.}$

Ao fim de 24 horas de incubação, tempo que, segundo a American Phytopathological Society (1943), se considera suficiente para uma boa germinação dos esporos dos fungos, procurámos fazer a sua contagem à ampliação 100x do microscópio; verificámos, porém, com bastante surpresa, que a percentagem de esporos germinados era insignificante. Alargámos o período de observação por mais 24 horas, sem alcançarmos qualquer melhoria. Repetimos o ensaio, mas de novo a germinação fracassara.

c) *Germinação em água destilada adicionada de estimulantes*

Em face das circunstâncias atrás apontadas, julgámos que os esporos necessitavam certamente de estimulantes para germinar, pelo que de acordo com MILLER (1949), resolvemos adicionar à suspensão de esporos referida, na alínea anterior, uma gota de um soluto nutritivo composto de sacarose a 0,1 % e citrato de sódio a 0,0001 %. Porém, uma vez mais, a germinação tinha falhado.

Como verificámos que o fungo crescia melhor, entre outros meios, em gelose de batata glucosada a 2 %, resolvemos então estudar a germinação dos esporos numa solução de glucose a 2 %, mas não tivemos melhor sorte. Recorremos então a um estimulante que, logicamente, parecia oferecer maiores probabilidades de êxito e que era constituído por um filtrado (por passagem através de um pano) de um macerado de caules e folhas de bersim. Experimentámo-lo concentrado e numa diluição em água destilada a 10 %.

Passadas 24 horas, verificámos finalmente que bastantes esporos da suspensão no filtrado concentrado haviam já germinado e origi-

nado hifas muito desenvolvidas. Porém, o campo óptico apresentava-se de tal maneira opaco que se tornava impossível realizar qualquer contagem. Em contra-partida, de novo a germinação fracassara nas suspensões em que o filtrado se havia utilizado na diluição a 10 %.

Com o objectivo de clarificar o filtrado concentrado, resolvemos centrifugá-lo durante 10 minutos a 1500 r. p. m. Uma vez decantado, o líquido foi então utilizado, retirando-se de novo uma gota que foi lançada sobre 1 ml de água destilada + 1 gota da suspensão de esporos, tal como anteriormente. Verificou-se então que numerosos esporos haviam germinado e apresentavam, novamente, hifas bastante desenvolvidas e o campo óptico permitia já uma observação deveras satisfatória.

O facto de continuarmos a observar que, um certo número de esporos ainda não germinava, levou-nos a admitir que tal fosse devido à falta de maturidade dos mesmos, uma vez que os germinados apresentavam hifas excepcionalmente desenvolvidas, se atendermos ao pouco tempo de incubação e ao comportamento dos esporos das suspensões testemunhas. Na verdade, as culturas de *A. caulivorum* com 7 dias de idade que vínhamos ensaiando, produziavam esporos de diferentes tamanhos (fig. 15) e não era, portanto, difícil admitir que os mais pequenos não tivessem adquirido a necessária maturidade. Desta maneira, lembrámo-nos de obter por centrifugação da suspensão mãe de esporos, uma massa de conídios onde predominassem os maiores e que, provavelmente, seriam os mais maduros.

Começámos por centrifugar a suspensão de esporos a 1500, 2000 e 2500 r. p. m. durante 2 e 4 minutos, tendo verificado que a centrifugação a 1500 r. p. m. durante 4 minutos era a que permitia obter esporos de tamanho mais uniforme.

Resolvemos ainda ensaiar a centrifugação a este último número de rotações durante 4 e 6 minutos e, a partir dos esporos assim obtidos, preparámos as suspensões conforme o procedimento já descrito em b). Simultaneamente, procurámos averiguar até que ponto a germinação dos esporos poderia ser influenciada pela centrifugação e adição de uma gota do estimulante, constituído pelo filtrado de um macerado de bersim centrifugado durante 10 minutos a 1500 r. p. m. Desta maneira, as suspensões de esporos correspondentes aos diferentes tempos de centrifugação foram ensaiados com e sem a gota daquele estimulante. Paralelamente, preparavam-se suspensões testemunhas de esporos não centrifugados com e sem gota de estimulante.

Ensaíamos assim 6 modalidades numa série de 3 repetições, sendo o material colocado na câmara húmida já descrita e à temperatura de 20° C. ± 0,5° C.

Como tivéssemos verificado nos ensaios anteriores que as hifas dos esporos germinados ao fim das 24 horas de incubação eram muito extensas, decidimos proceder à observação da germinação, ao cabo de 20 horas. No Quadro 6 apresentamos os resultados correspondentes às observações sobre 100 esporos, por repetição e para cada modalidade.

QUADRO 6
 Percentagens de esporos germinados

Modalidades			Repetições			Média
			1. ^a	2. ^a	3. ^a	
Esporos centrifugados a 1500 r.p.m.	4 min.	s/ estimulante	3	2	6	3,6
		c/ estimulante	64	72	76	70,7
	6 min.	s/ estimulante	1	2	3	2,0
		c/ estimulante	68	73	79	73,3
Esporos não centrifugados	sem estimulante		1	2	2	1,7
	com estimulante		72	64	74	70,0

O exame do quadro permite concluir que a centrifugação dos esporos a 1500 r. p. m. durante 4 e 6 minutos não teve praticamente influência na germinação dos esporos.

De salientar, porém, a grande acção estimulante da gota do extracto de bersim sobre a germinação em todas as modalidades ensaiadas. Assim, a percentagem média de esporos germinados nunca foi inferior a 70 %, enquanto que sem o referido extracto, a máxima foi de 3,6 %.

Além disso, em todas as modalidades sem estimulante os esporos germinados emitiam uma curta hifa cujo comprimento não ia além do seu menor diâmetro, enquanto que com estimulante, os esporos

germinados apresentavam hifas várias vezes maiores que o seu comprimento. Os esporos que não germinavam eram invariavelmente de menores dimensões, o que nos levou a admitir que ainda não possuíam a desejada maturidade.

d) *Germinação em meios gelosados em placas de Petri*

Neste estudo seguimos o Método da Germinação em Placas de Agar referido em Material e Métodos, mas sem incorporação de fungicidas. Resolvemos experimentar um meio que além de agar a 1 % continha 0,2 % de glucose e que TOMAZ (1958) havia verificado que favorecia a germinação dos esporos de *Alternaria oleracea*, e outro constituído por extracto de bersim a 1 % e agar a 1 %.

Fizemos duas contagens em 2 campos opostos de cada uma das duas placas utilizadas para cada meio, obtendo assim uma série de 4 repetições para cada modalidade. No Quadro 7 apresentamos os resultados expressos em percentagem de esporos germinados por cada 100 contados e para cada repetição.

QUADRO 7

Percentagens de esporos de *A. caulivorum* germinados em 2 meios gelosados

Modalidades	Repetições				Média
	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	
Agar a 1 % com glucose a 0,2 % ...	0	1	1	1	0,75
Agar a 1 % com extracto de bersim a 1 %	87	81	85	83	84,0

Tal como no ensaio anterior, de novo se verificou a extraordinária influência do extracto de bersim sobre a germinação dos esporos, pois enquanto no meio de agar a 1 % com glucose a 0,2 % se havia verificado a insignificante percentagem de germinação média de 0,75 %, no meio gelosado com agar a 1 % e extracto de bersim a 1 %, aquela percentagem foi de 84 %. Da mesma maneira, no fim de 20 horas de incubação, os esporos germinados apresentavam hifas bastante desenvolvidas.

5. Estudo da germinação e esporulação do *A. caulivorum* sobre alguns meios gelosados, em câmara de Van Tieghem

Foram ensaiados os meios de Dox, malte, cenoura, bersim, batata e batata glucosada a 2 %.

O inóculo, constituído por uma quantidade mínima de esporos, foi retirado de culturas com 7 dias de idade incubadas à temperatura de $22^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ C.

Para cada meio utilizaram-se 3 câmaras de Van Tieghem em gota pendente, as quais uma vez inoculadas, foram colocadas na estufa àquela temperatura.

Ao fim de 3 horas, somente em Dox e malte se começou a verificar o início da germinação.

Após 9 horas de incubação, a grande maioria dos esporos nas geloses de cenoura, Dox e malte havia germinado; em batata glucosada a germinação era total e, em bersim, apenas alguns esporos tinham germinado. Por sua vez, na gelose de batata, raros eram os esporos que se encontravam germinados.

Depois de 12 horas e, de uma maneira geral, em todos os meios se notava maior crescimento nas hifas germinativas dos esporos que, em grande maioria, saíam dos seus polos. Vejamos agora quais os aspectos mais salientes em cada meio.

Gelose de bersim — Continua a manifestar-se a germinação dos esporos com lentidão, aparecendo ainda bastantes por germinar.

G. de cenoura — Raros eram os esporos que ainda não tinham germinado e naqueles que o haviam feito, as hifas eram bastante compridas e deram origem a um micélio profuso, radial.

G. de batata glucosada — Aspecto muito semelhante ao do meio anterior no que respeita ao desenvolvimento micelial. Notava-se, no entanto, que as hifas eram septadas e alguns esporos apresentavam além de uma hifa germinativa, duas gémulas no polo oposto a esta. Observámos também a presença de um esporo com dois septos, em que num dos polos se havia dado a germinação, enquanto na outra célula polar e na mediana se notava em ambas a presença de duas gémulas.

G. de Dox — Eram raros os esporos não germinados. Os germinados, alguns com um septo, apresentavam hifas septadas. Por sua

vez, outros não germinaram e haviam originado 1 a 4 gémulas distribuídas pelos polos.

G. de batata — Poucos mais esporos haviam germinado, sendo as hifas pouco desenvolvidas; raros esporos apareciam com um septo.

G. de malte — Apenas alguns esporos por germinar e raros apresentavam um septo; maior desenvolvimento das hifas, as quais ostentavam septos.

Ao fim de 21 horas:

G. de bersim — A grande maioria dos esporos continuava sem germinar; nos germinados, as hifas eram septadas.

G. de cenoura — Raríssimos esporos por germinar; nalguns germinados surge um septo mais ou menos equatorial. As hifas germinativas são septadas e surgem pela primeira vez alguns conidióforos largos semelhantes a basídios onde se formavam conídios curvos em número variável. Por sua vez, as hifas, que são pouco sinuosas, apresentavam radulasporos (fig. 21).

G. de batata glucosada — Aspectos gerais muito semelhantes aos do meio anterior, nomeadamente na formação de conidióforos largos e na existência de radulasporos. No entanto, estes aspectos surgiam com muito menor frequência.

G. de Dox — Continuava a gemulação nos esporos não germinados e surgiam também os conidióforos largos com número variável de conídios, assim como a formação de radulasporos.

G. de batata — Aspectos semelhantes aos do meio anterior.

G. de malte — De uma maneira geral, o aspecto é semelhante aos descritos para os dois meios anteriores.

Após 24 horas de incubação, apenas há que salientar para o meio de Dox, a presença de uma apreciável massa de esporos na periferia da colônia, possivelmente radulasporos arrastados pela água de condensação, alguns dos quais, entretanto, já haviam gemulado.

Ao fim de 48 horas:

G. de bersim — Boa formação de radulasporos e frequentes conidióforos largos suportando variável número de conídios. Além disso, observava-se gemulação dos esporos não germinados.

G. de cenoura — Abundante formação de radulasporos e, bem assim, dos conidióforos largos (fig. 21), os quais suportavam apreciável número de conídios e dispostos por vezes tão densamente que não era possível efectuar qualquer contagem.

Surgiu agora pela primeira vez, um novo aspecto: as hifas que partem do centro do inóculo encontram-se fortemente septadas, tomando algumas das suas células uma coloração verde-escura e alternando por vezes com outras ainda hialinas. Paralelamente, a colónia vai escurecendo de dentro para fora (fig. 22).

G. de batata glucosada — Abundante formação de radulasporos; alguns esporos que se destacavam pelo seu maior tamanho, apresentavam gemulação e, por vezes, septo. Os esporos parecem tomar uma coloração esverdeada e, num número apreciável, estão reunidos na periferia da colónia.

G. de Dox — Na orla da colónia continua a verificar-se a aglomeração dos esporos, onde alguns se encontram gemulados. A formação de radulasporos é abundantíssima e extremamente densa e, por vezes, eles gemulam em cadeia, isto é, apresentam um aspecto moniliforme, tendo-se observado casos de 4 conídios nesta disposição.

G. de batata — Grande massa de esporos na periferia da colónia, onde se observa gemulação, tal como em gelose de Dox. A formação de radulasporos é ainda mais intensa que neste meio, notando-se também o aspecto moniliforme, anteriormente referido.

G. de malte — Numa das câmaras de Van Tieghem e em virtude do meio estar prestes a esgotar-se, assiste-se a uma rápida e extensiva formação de hifas verde-escuras, grossas e muito septadas, ficando a colónia inteiramente corada.

Nas outras preparações, observam-se aspectos semelhantes aos registados em Dox e batata, mas não tão pronunciados e, nomeadamente, casos de gemulação e septação (fig. 23).

Após 60 horas:

G. de bersim — Intensificam-se os aspectos referidos nas 48 horas, aparecendo densos aglomerados de conídios que se formam sobre os conidióforos largos. Além disso, notam-se casos de esporulação moniliforme, tal como já havíamos registado para outros meios e ligeiro esverdeamento do conjunto.

G. de cenoura — De uma maneira geral, os aspectos são os mesmos que já referimos nas 48 horas, prosseguindo a formação das hifas verde-escuras muito septadas.

G. de batata glucosada — Formação ainda incipiente das hifas verde-escuras; prosseguem os casos registados nas 48 horas.

G. de Dox — Continuação dos aspectos referidos anteriormente.

G. de batata — A formação dos radulasporos é deveras extraordinária, ainda mais que em Dox. Continua a verificar-se a gemulação dos esporos hialinos que se encontram em massa na periferia.

G. de malte — Em relação à observação anterior, regista-se que prossegue a formação das hifas grossas, verde-escuras, como consequência do esgotamento dos elementos nutritivos (fig. 24).

Ao fim de 72 horas, os aspectos em todos os meios ensaiados eram sensivelmente os mesmos que os registados na observação anterior.

Após 4 dias: apenas em gelose de Dox se notava, mas ainda incipiente, a formação das hifas verde-escuras, ao mesmo tempo que, no conjunto, os esporos tomam uma coloração levemente esverdeada. Nos restantes meios, nada a acrescentar de notável.

Ao fim de 5 dias:

G. de bersim — Continuavam os aspectos já referidos anteriormente, não se vendo ainda a formação das hifas verde-escuras e grossas, tal como assinalámos para os meios de malte, cenoura, batata

glucosada e Dox. Na periferia da colônia notava-se já apreciável massa de esporos soltos, onde alguns se encontravam a gemular.

G. de cenoura — Além dos casos já anotados anteriormente, surge o aspecto novo, do aparecimento de hifas, finas, hialinas e septadas, e onde se formam esporos esverdeados, que não são mais do que clamidósporos, alguns ainda ligados por um septo (fig. 25).

G. de Dox — Prosseguem os aspectos observados anteriormente.

G. de batata glucosada — Enquanto num caso e por esgotamento do meio se observa uma intensa septação das hifas que engrossam extraordinariamente e tomam uma coloração castanho-esverdeada, tal como havíamos referido para a gelose de malte após 48 horas de incubação, nas restantes preparações este processo desenvolve-se muito lentamente e notam-se as massas de esporos já esverdeados, alguns gemulados, na periferia da colônia. Além disso, os radulasporos continuam bastante abundantes.

Nas geloses de batata e malte, prosseguem os aspectos anotados anteriormente.

Após 6 dias, apenas há a apontar para os meios de Dox e batata glucosada, que alguns esporos castanho-esverdeados, aliás raros e maiores que os restantes, geralmente sem septo ou apenas com um, se destacam na massa de esporos periféricos; observámos até um esporo com dois septos.

Em relação à gelose de malte, registamos agora o aparecimento da formação típica dos clamidósporos, tal como havíamos referido para o meio de cenoura após 5 dias.

Ao fim de 7 dias, a massa de esporos livres e periféricos, no meio de Dox, tomou uma coloração esverdeada intensa; desta maneira e até ao fim deste período, somente os esporos em gelose de bersim e de batata se mantêm hialinos.

Em gelose de batata glucosada surgem agora mais esporos grandes, castanho-esverdeados, tendo um deles, com um septo, germinado em ambos os polos, enquanto outro, com dois septos, germinou apenas num dos polos. Na gelose de malte vimos pela primeira vez, destacando-se na massa de esporos periféricos, um esporo escuro semelhante aos referidos já para os meios de batata glucosada e Dox.

Após 9 dias, há apenas a mencionar o aparecimento no meio de cenoura, de esporos verde-escuros sem ou com 1-2 septos, semelhantes aos descritos para os meios de Dox, batata glucosada e malte.

Ao fim de 10 dias, em todos os meios, os aspectos eram, de uma maneira geral, semelhantes aos anteriores, apenas sendo de salientar um caso novo observado em gelose de cenoura, a partir dos artículos das hifas verde-escuras, onde alguns desses começavam a aumentar de volume, ao mesmo tempo que perdiam a coloração verde-escura e se tornavam, portanto, mais claros. Assim, um desses artículos avolumado, tomou um aspecto semelhante a um basídio, onde se formaram 4 esporos curvos, típicos do *A. caulivorum* sobre plantas de bersim. Na mesma hifa, notou-se um aspecto semelhante mas apenas com dois conídios, enquanto noutras aparece um número maior de esporos (fig. 24).

As observações feitas ao fim de 11, 12, 13 e 15 dias, não permitiram acrescentar novos elementos. Desta maneira, resolvemos espaçar mais os registos seguintes, os quais tiveram lugar ao fim de 20, 25 e 30 dias. Ainda porque os aspectos da cultura ao fim de um mês não apresentavam alterações sensíveis e também porque alguns meios utilizados estavam próximo do esgotamento, decidimos dar por findo este estudo no término daquele período, com mais as seguintes observações:

G. de bersim — Mantinha-se a formação densa de radulasporos ao mesmo tempo que, fora da colónia, existiam apreciáveis massas de esporos hialinos, alguns dos quais se encontravam em activa gemulação.

Certamente porque o fungo não utiliza rapidamente este meio de cultura, predomina a fase reprodutiva sobre a vegetativa. Deste modo, ainda não se observa a formação das hifas grossas, verde-escuras e fortemente septadas que crescem a partir do centro da colónia, tal como temos vindo a referir para os meios de cenoura, batata glucosada e malte. Também não se verifica a formação de clamidósporos a partir das hifas hialinas, novas e finas, assim como ainda não surgiram os esporos castanho-esverdeados com ou sem septo, que já assinalámos em batata glucosada, Dox, malte e cenoura.

G. de cenoura — Além dos aspectos já referidos, nota-se na periferia da colónia, uma apreciável massa de esporos com um tom esver

deado bastante pronunciado, vendo-se alguns a gemular. De notar que esta massa é muito menos abundante que em bersim e surgem com mais frequência os esporos castanho-esverdeados, com 1-2 septos, ou mesmo sem septo (fig. 26).

Prossegue o desenvolvimento das hifas grossas verde-escuras muito septadas, como consequência do gradual empobrecimento do meio e acentua-se a formação de clamidósporos a partir das hifas novas e hialinas.

G. de Dox — Persistem os densos aglomerados de esporos, e na periferia da colônia é enorme a massa dos esporos livres, onde se nota intensa gemulação e raros esporos escuros sem septos ou com 1 a 2. Embora lentamente, progride a formação das hifas grossas e escuras e começam a aparecer as hifas novas a gerar clamidósporos.

G. de batata glucosada — Nota-se o predomínio de radulasporos sobre os grandes aglomerados de esporos, tal como referimos para o meio de cenoura. Na periferia da colônia é apreciável a massa de esporos livres onde há gemulação, mas aqueles são menos abundantes que em gelose de cenoura. Com maior frequência surgem os esporos castanho-esverdeados sem ou com 1-2 septos, alguns dos quais originam uma gémula polar e tornam-se gradualmente mais clâros, chegando a hialinos. Outros, porém, germinam em ambos ou apenas num dos polos, e se o esporo tem um septo e a germinação se dá apenas num dos polos, a célula a que este pertence torna-se hialina, enquanto a outra permanece castanho-esverdeada. Se as hifas germinativas partem de ambos os polos, então as duas células do esporo ficam igualmente hialinas.

Prossegue o desenvolvimento das hifas verde-escuras e grossas, muito septadas, não se notando ainda a formação de clamidósporos.

G. de batata — Praticamente, mantêm-se os aspectos das 60 horas, isto é, a esporulação é ainda mais intensa que em Dox, notando-se que os aglomerados de esporos são ainda mais volumosos que os gerados naquele meio. Além disso, a grande massa de esporos livres que se encontram na periferia da colônia, permanece hialina e continua a gemular intensamente.

Não há qualquer indício da formação de esporos castanho-esverdeados sem septos ou com 1 a 2, nem tão pouco de hifas grossas e escuras, indicadoras de que o meio se estaria a esgotar; também não se regista a presença de clamidósporos.

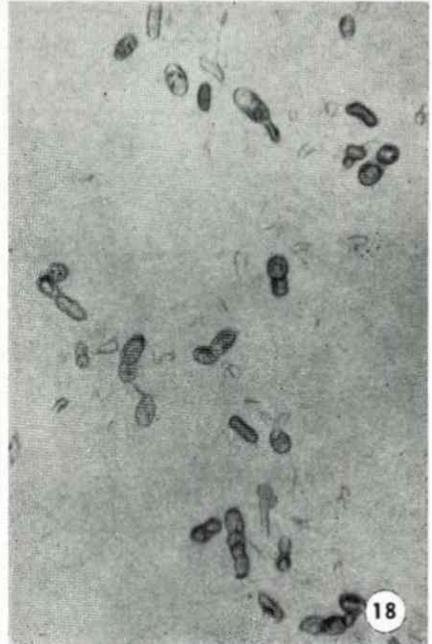
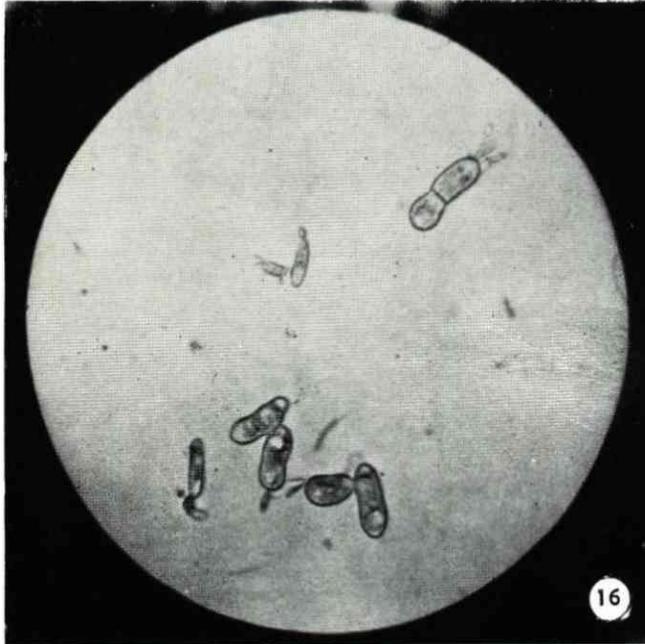
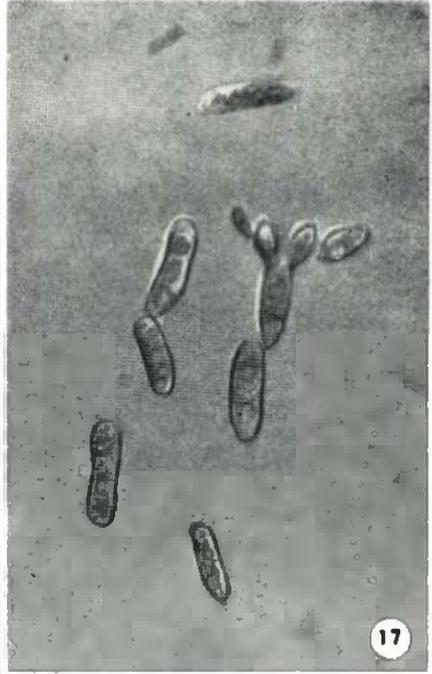
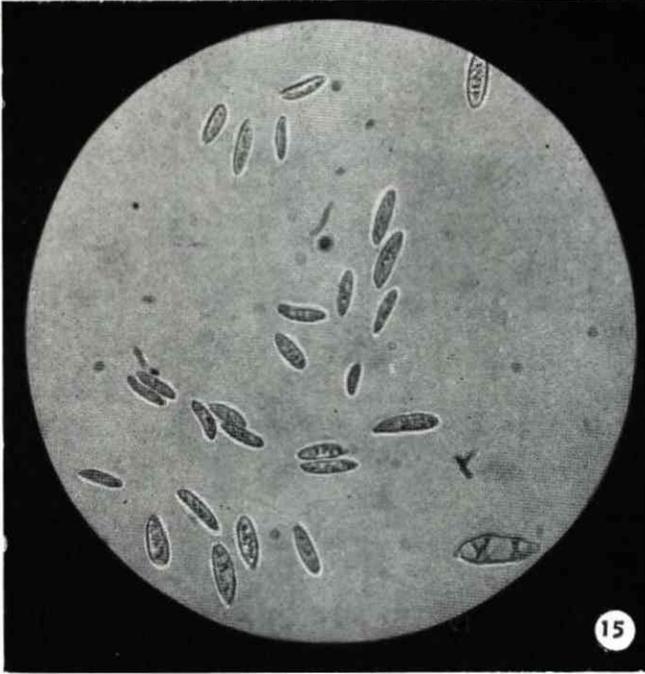
ESTAMPA III

- Figura 15 — *Esporos de A. caulivorum com sete dias de idade, cultivados com batata glucosada a 2%, a $20^{\circ} \pm 0,5$ C. (Ampliada cerca de 700 \times).*
- Figura 16 — *Aspectos de gemulação do A. caulivorum observados em água destilada esterilizada, numa câmara de Van Tieghem, ao fim de 48 h. (Ampliada cerca de 700 \times).*
- Figura 17 — *Idem, ao fim de 72 h. (Ampliada cerca de 1400 \times).*
- Figura 18 — *Aspecto geral observado ao fim de uma semana, em água destilada esterilizada. Salientam-se os esporos escuros do A. caulivorum continuos ou com 1-2 septos, que não tinham ainda gemulado, em contraste com os hialinos mais pequenos. (Ampliada cerca de 340 \times).*

ESTAMPA IV

- Figura 19 — *A esquerda, um esporo de A. caulivorum primitivamente escuro e uni-septado, em que uma das células ficou atrofiada (a inferior) e a outra originou por gemulação os típicos conídios curvos. Aspecto observado ao fim de 14 dias. (Ampliada cerca de 750 \times).*
- Figura 20 — *Formações lembrando basídios e originadas nas extremidades de hifas provenientes da germinação dos conídios curvos. Sobre um pequeno lóculo dos pseudo-basídios formaram-se novos esporos curvos. (Ampliada cerca de 720 \times).*
- Figura 21 — *Aspecto observado em gelose de cenoura numa câmara de Van Tieghem, ao fim de 21 h, notando-se as hifas com radulasporos e um conidióforo terminal bastante largo, com vários conídios curvos. (Ampliada cerca de 1600 \times).*
- Figura 22 — *Hifas inicialmente hialinas, que se tornaram gradualmente verde-escuras, a partir do centro do inóculo para a periferia da colónia, em gelose de cenoura ao fim de 48 h. (Ampliada cerca de 750 \times).*

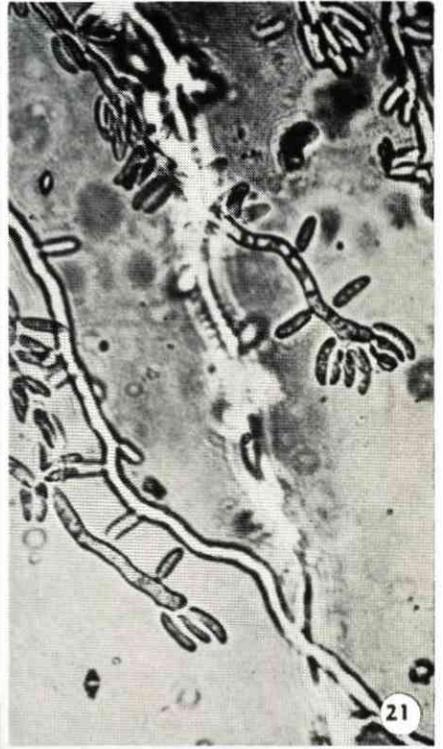
ESTAMPA III



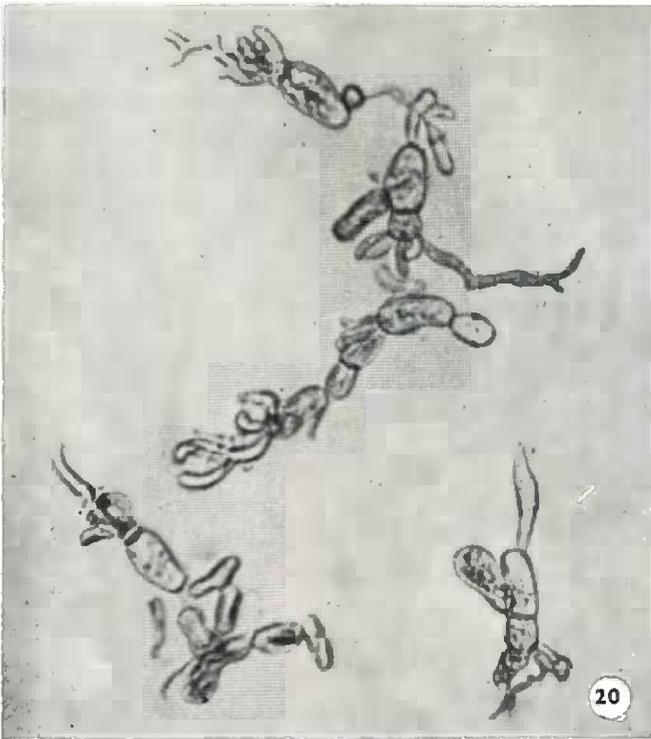
ESTAMPA IV



19



21



20



22

G. de malte — Neste meio, o fungo apresenta aspectos muito semelhantes aos observados em gelose de cenoura. A massa de esporos livres existente na periferia da colónia, onde há gemulação, permanece em grande parte hialina e aparecem agora mais alguns esporos castanho-esverdeados sem ou com 1-2 septos.

Prossegue a formação das hifas verde-escuras e é mais frequente o aparecimento de hifas a gerar clamidósporos.

6. Determinação da eficácia relativa de alguns fungicidas sobre esporos de *A. caulivorum*

Em face do apreciável número de fungicidas existentes no mercado, começámos por seleccionar alguns que maior eficácia têm revelado no nosso país, perante outras doenças criptogâmicas. Para mais, a consulta bibliográfica tinha-nos revelado que lá fora e até à data, ainda não se havia procedido a tratamentos sobre a cultura visando a sua protecção contra esta doença. Por outro lado, dada a grande dificuldade em conduzir ensaios de campo com um número já considerável de fungicidas, resolvemos recorrer a ensaios laboratoriais, mediante os quais pudéssemos avaliar a eficácia relativa dos mesmos, embora soubéssemos de antemão que, normalmente, os fungicidas comportam-se melhor no laboratório do que no campo. Convinha, portanto, realizar um ensaio prévio que nos desse uma suficiente informação quanto ao grau de eficácia relativa, já que, fundamentalmente, nos propúnhamos experimentar no campo dois fungicidas (um mineral e outro orgânico) que, além de melhor comportamento em laboratório, possuíssem outras características compatíveis com a utilização da forragem, pois que, de maneira alguma poderíamos desprezar os prováveis efeitos toxicológicos no gado.

Pelas razões apontadas, resolvemos estudar o comportamento laboratorial dos seguintes fungicidas:

Minerais:

Sulfato de cobre (como padrão).

Oxicloreto de cobre com 50 % de cobre metal.

Óxido cuproso com 50 % de cobre metal.

Orgânicos:

«Captane» (83 % de Triclorometil-tio-tetra-hidroftalimida).

Zinebe (65 % de Etileno-bis-ditiocarbamato de zinco).

Zirame (90 % de Dimetilditiocarbamato de zinco).
 Tiocianato de Dinitrofenilo (com 45 % de M. A.).

Dado que pretendíamos fazer uma apreciação sumária do poder fungicida destes produtos, decidimos seguir o método que CHANCONGNE e VIEL (1956) preconizam. Este consiste essencialmente em procurar saber a posição onde se coloca, para cada produto e em relação ao padrão ou padrões, o seu poder de inibição de germinação dos esporos de um fungo.

Ensaíamos para cada fungicida, seis concentrações numa série de seis repetições. Essas concentrações, iguais para todos os produtos e referidos à matéria activa, foram previamente estabelecidas de forma a poder-se localizar aproximadamente a LD 50 que lhe correspondesse. Elas foram as seguintes:

$$5 \times 10^{-4}, 1 \times 10^{-4}, 5 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-6}, \text{ e } 1 \times 10^{-6}.$$

Na contagem da germinação dos esporos, considerámos como germinados, tal como CHANCONGNE e VIEL (1956), o esporo que apresentasse uma hifa cujo comprimento fosse igual a, pelo menos, $\frac{1}{3}$ do seu diâmetro menor.

As percentagens dos esporos não germinados, obtidas nas contagens para cada concentração, foram corrigidas de acordo com a percentagem de esporos viáveis da testemunha, a fim de eliminar uma variável, que é a mortalidade natural dos esporos. Para isso, utilizámos, como o fizeram também PAYEN e BREBION (1952), a fórmula de ABBOT:

Inibição corrigida é igual a:

$$100 - \frac{C - A}{T - A} \times 100$$

onde:

A = Número de esporos germinados antes da incubação, na testemunha;

T = O número de esporos germinados depois da incubação, na testemunha;

C = O número de esporos germinados depois da incubação, em cada concentração.

Em virtude de os esporos do *A. caulivorum* terem revelado, conforme atrás referimos, uma má germinação em suspensão aquosa, embora muito melhor com a adição do extracto de bersim, decidimos adoptar a técnica de germinação em placas com agar utilizada por GATTANI (1954), com algumas alterações de TOMAZ (1958). Por outro lado, esta técnica apresenta mais vantagens sobre aquela e o único inconveniente que se lhe aponta — a reacção do agar com os fungicidas minerais — estava salvaguardado, uma vez que tencionávamos ensaiar no campo um fungicida orgânico e outro mineral, independentemente da eficácia relativa revelada no estudo laboratorial, mas de acordo com o comportamento dentro de cada grupo e segundo determinantes de natureza prática e toxicológica.

Como tivéssemos já averiguado que o meio gelosado mais favorável para a germinação era o constituído por agar a 1 %, foi este o meio de cultura utilizado na técnica seguida.

Os resultados apurados para cada produto constam do Quadro 8.

QUADRO 8

Resultados da inibição da germinação dos esporos do *A. caulivorum* com 7 fungicidas, em 6 repetições

Concentrações	«CAPTANE» (83 % de M. A.)		TIOCIANATO DE DINITROFENILO (45 % de M. A.)		ZINEBE (65 % de M. A.)		ZIRAME (90 % de M. A.)	
	Inibição média %		Inibição média %		Inibição média %		Inibição média %	
	Encon- trada	Corrigida	Encon- trada	Corrigida	Encon- trada	Corrigida	Encon- trada	Corri- gida
5×10^{-4}	100	100	100	100	100	100	100	100
1×10^{-4}	100	100	100	100	90,5	88,4	100	100
5×10^{-5}	100	100	100	100	51,0	40,6	99,5	99,3
1×10^{-5}	100	100	99,6	99,4	38,5	25,4	90,5	88,1
5×10^{-6}	80,3	75,4	97,1	96,1	28,5	13,3	85,1	81,4
1×10^{-6}	38,3	23,2	53,5	38,7	23,8	7,6	53,0	41,3
Testemunha	19,6	—	24,1	—	17,5	—	19,8	—
Concentrações	SULFATO DE COBRE		OXICLORETO DE COBRE (50 % de M. A.)		ÓXIDO CUPROSO (50 % de M. A.)			
	Encon- trada	Corrigida	Encon- trada	Corrigida	Encon- trada	Corrigida		
5×10^{-4}	95,0	93,9	94,6	93,8	58,3	49,4		
1×10^{-4}	51,5	40,9	42,6	34,5	54,3	44,6		
5×10^{-5}	43,5	31,2	28,5	18,4	43,8	31,8		
1×10^{-5}	35,0	20,9	23,0	12,2	38,6	25,5		
5×10^{-6}	31,2	16,3	19,0	7,6	37,2	23,8		
1×10^{-6}	24,5	8,1	17,2	5,5	31,3	16,7		
Testemunha	17,8	—	12,3	—	17,5	—		

ESTAMPA V

Figura 23 — *Casos de septação e gemulação observados em gelose de malte, ao fim de 48 h. (Ampliada cerca de 400 ×).*

Figura 24 — *Hifas completamente escurecidas, como consequência do esgotamento do meio de malte, após 60 h. Notam-se ainda dois órgãos em forma de basídio, cada um resultante do intumescimento duma célula da hifa, os quais ostentam vários conídios curvos. (Ampliada cerca de 750 ×).*

Figura 25 — *Formação de clamidósporos esverdeados, alguns ainda ligados por um septo, em gelose de cenoura, ao fim de 5 dias. (Ampliada cerca de 750 ×).*

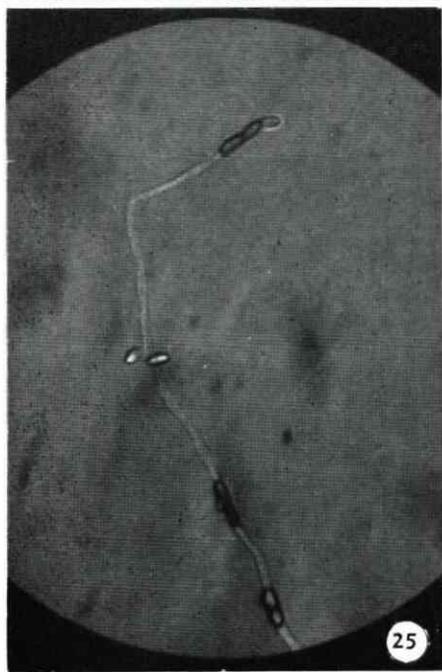
Figura 26 — *Esporos castanho-esverdeados do A. caulivorum, entre numerosos hialinos, em gelose de cenoura, ao fim de um mês. Alguns daqueles apresentavam 1-2 septos. (Ampliada cerca de 750 ×).*

ESTAMPA VI

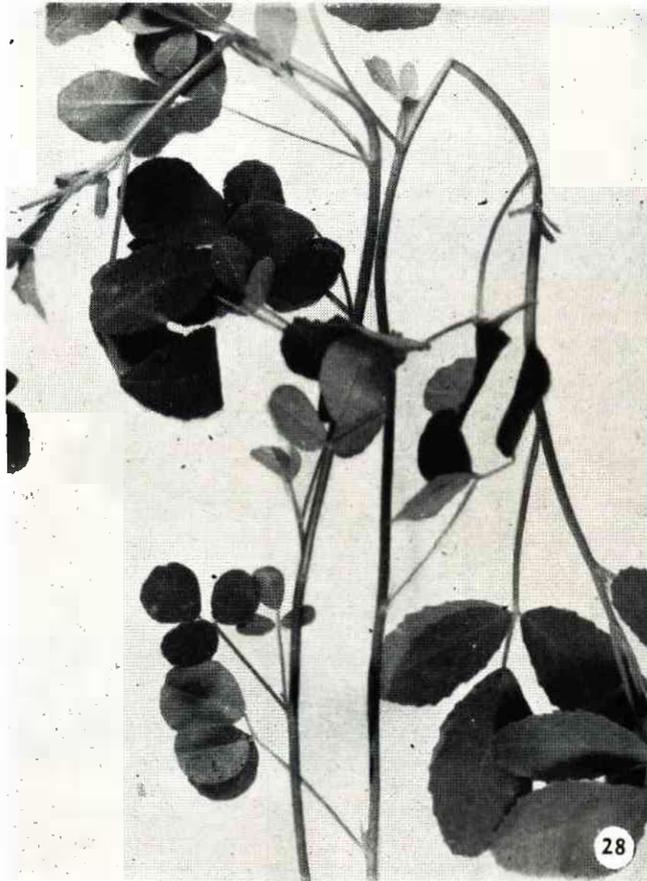
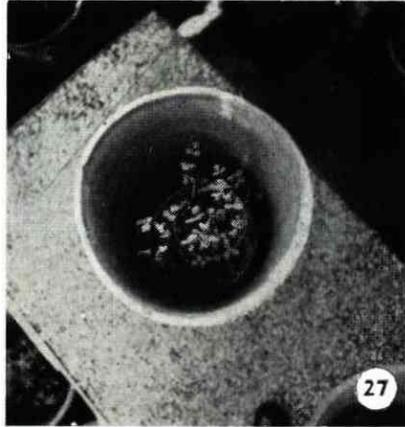
Figura 27 — *Vaso coberto com chapa de vidro; note-se o fundo inundado e o vaso mais pequeno inoculado.*

Figura 28 — *Plantas de Melilotus alba com necroses provocadas pelo A. caulivorum, 3 semanas após a sua inoculação artificial.*

ESTAMPA V



ESTAMPA VI



De acordo com CHANCOGNE e VIEL (1956), daremos a localização aproximada da respectiva LD 50. Assim, em relação aos fungicidas minerais (cúpricos), para o sulfato de cobre e o oxiclreto de cobre, a posição da respectiva LD 50 será:

$$1 \times 10^{-4} < \text{LD 50} < 5 \times 10^{-4}$$

e em relação ao óxido cuproso:

$$5 \times 10^{-4} < \text{LD 50}$$

isto é, o comportamento deste fungicida foi inferior aos dois primeiros.

No que respeita aos fungicidas orgânicos, verifica-se para o «Captane», Zirame e Tiocianato de Dinitrofenilo uma acção muito semelhante, visto a respectiva LD 50 se localizar como se segue:

$$5 \times 10^{-6} > \text{LD 50} > 1 \times 10^{-6}$$

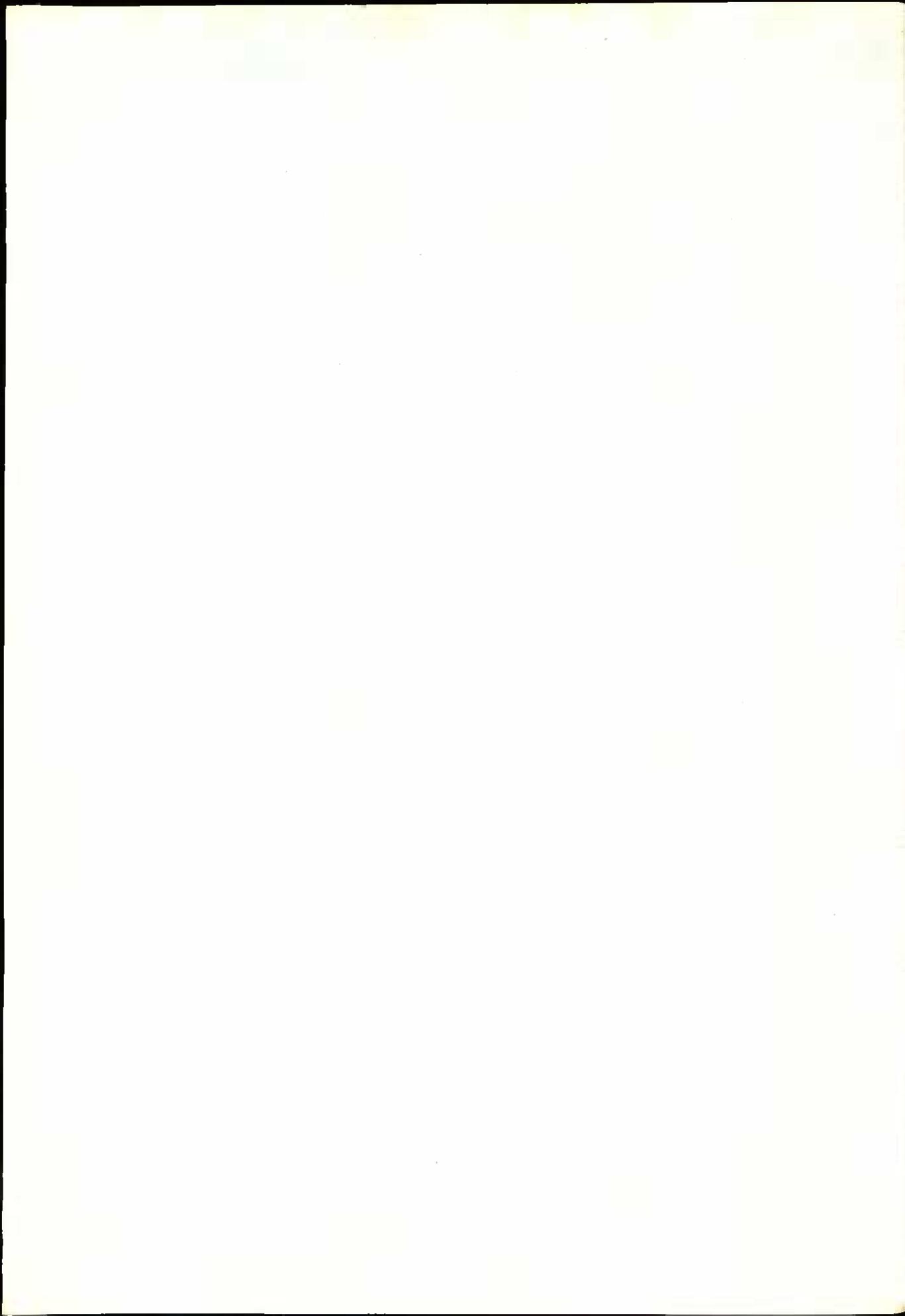
Em contrapartida, o zinebe mostrou nítida inferioridade, uma vez que a posição da sua LD 50 é:

$$1 \times 10^{-4} > \text{LD 50} > 5 \times 10^{-5}$$

Em resumo, havíamos apurado que no grupo dos fungicidas minerais, tanto o sulfato de cobre, como o oxiclreto de cobre com 50 % de substância activa poderiam ser ensaiados no campo e o óxido cuproso não revelara suficiente eficácia para que pudesse ser admitido num ensaio dessa natureza.

Quanto aos fungicidas orgânicos, de entre os quatro ensaiados, o «captane», o zirame e o tiocianato de dinitrofenilo manifestaram uma eficácia muito semelhante, pelo que qualquer deles poderia ser utilizado numa experiência de campo, enquanto que o zinebe já não merecia ser considerado, perante o fraco comportamento revelado.

Veremos no capítulo V as razões que nos levaram a eleger dentro de cada um dos grupos, os fungicidas utilizados nos ensaios de campo.



INOCULAÇÕES EXPERIMENTAIS EM PLANTAS ENVASADAS

A) ENSAIOS PRELIMINARES

Começamos por inocular plantas de bersim envasadas, com 30 dias de semeadas, por meio de uma suspensão de esporos do fungo em água destilada, obtida a partir de culturas em tubos com gelose de batata glucosada a 2 %, à temperatura de $23^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ C. Num dos ensaios as culturas tinham 35 dias e noutro, 48 dias de idade.

Em ambos os casos as plantas foram inoculadas por meio de um pulverizador manual de vidro e, logo depois, colocadas num estufim, existente na estufa de campo do Instituto Superior de Agronomia, com o fundo coberto de areia e completamente alagado, mantendo-se fechadas as vidraças daquele. Os dois ensaios foram iniciados, respectivamente, em fins de Abril e princípios de Maio de 1959 e decorreram à temperatura ambiente. Possivelmente porque as condições existentes no estufim eram desfavoráveis, as inoculações resultaram negativas.

Resolvemos, por isso, repetir em 21 de Julho do mesmo ano os ensaios, utilizando desta vez culturas de *A. caulivorum* com 35 dias de idade e, após a inoculação, os vasos foram colocados individualmente dentro de outro de maiores dimensões com o fundo obturado, coberto de areia e alagado, tapando-se em seguida este vaso com uma chapa de vidro (fig. 27). Em tudo o mais se mantiveram as condições dos ensaios anteriores. Porém, ao fim de 3 e 4 dias após a inoculação, resolvemos retirar as chapas de vidro em alguns dos vasos.

Passada uma semana, observámos pela primeira vez resultados positivos, tendo verificado que nos vasos em que se havia retirado a tampa ao fim do terceiro dia, as lesões nos caules do bersim eram mais numerosas que naqueles onde o vidro se retirara após 4 dias a inoculação. Em contrapartida, as plantas mantidas cobertas com o vidro, não apresentavam quaisquer sintomas e mostravam-se bastante estioladas.

O parasita foi depois re-isolado pelo método do esporo único.

Como tínhamos notado anteriormente que o período em que os vasos se mantinham cobertos com a chapa de vidro, poderia ter uma provável influência sobre o grau de intensidade do ataque, resolvemos proceder a alguns ensaios com esse objectivo e, paralelamente, registar as condições de temperatura e humidade decorrentes durante os mesmos, para o que collocámos um termo-higrógrafo dentro de um dos vasos destinados a servir de câmara húmida. Desta maneira, em 1 de Setembro de 1959, procedemos à inoculação de plantas de bersim envasadas, com 30 dias de semente, por meio de uma suspensão de esporos proveniente de culturas de *A. caulivorum* com a mesma idade, em gelose de batata glucosada a 2% e à temperatura de $23^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, contidas em balões de Erlenmeyer de 250 ml de capacidade. A fim de obtermos uma massa considerável de esporos, visto que o fungo possui um crescimento muito lento, os balões foram inoculados, aproveitando para esse efeito toda a superfície do agar. Assim se conseguiu que ao fim de uma semana a superfície da gelose ficasse completamente coberta pelo crescimento do fungo. A suspensão dos esporos foi obtida lançando-se 100 ml de água destilada e agitando seguidamente o balão.

Na inoculação das plantas, utilizámos um pequeno pulverizador manual de 2 l estanhado internamente.

Neste ensaio inocularam-se 20 plantas distribuídas por quatro vasos com 5 plantas cada e que, tal como no ensaio anterior, foram colocados noutros de maiores dimensões a servir de câmara húmida e tapados com uma chapa de vidro. Paralelamente, utilizaram-se vasos testemunhas com igual número e distribuição de plantas. Para garantir melhores condições de temperatura e humidade, a inoculação teve lugar às 17 horas e o chão da estufa foi alagado, condição que se manteve durante todo o tempo que decorreu o ensaio.

Ao fim de 24 horas, retirou-se a chapa de vidro do vaso v_1 e após 48, 72 e 96 horas, respectivamente dos vasos v_2 , v_3 e v_4 . Ao mesmo

tempo, destaparam-se os correspondentes vasos testemunhas (t_1 , t_2 , t_3 e t_4) e o vaso contendo o termo-higrógrafo foi descoberto ao fim de 120 horas. No Quadro 9 figuram os valores da temperatura e humidade relativa que decorreram desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas (120 horas) ao longo dos períodos estudados, de acordo com os registos do aparelho.

QUADRO 9

Valores da temperatura e humidade relativa ocorridos ao longo de certos períodos, desde a inoculação até aos primeiros sintomas

Períodos de tempo (horas)	Temperaturas (°C)			Humidade relativa (%)		
	Máxima	Mínima	Média	Máxima	Mínima	Média
24	24,0	17,0	19,7	92	75	87,5
48	24,0	17,0	19,6	92	72	85,8
72	24,0	16,5	19,5	92	70	85,5
96	24,0	14,8	19,3	92	70	85,7
120	24,8	14,2	19,1	92	70	85,3
	Média		19,6	Média		85,9

O apuramento dos resultados fez-se ao fim de 15 dias após a inoculação e constam do Quadro 10.

A análise deste quadro permite admitir que a susceptibilidade das plantas de bersim à doença foi maior quando colocadas nas câmaras húmidas durante 48 e 72 horas, dado que os primeiros sintomas apareceram mais cedo (5.º dia após a inoculação). Contudo, houve menor percentagem de plantas atacadas e, conseqüentemente, menos intensamente neste último caso, facto de difícil explicação, se não se admitir uma deficiência da inoculação. Por esse motivo, resolvemos repetir o ensaio, o que teve lugar em 12 de Setembro pelas 13 horas, isto é, cerca de onze dias após a inoculação dos vasos da experiência anterior.

Utilizámos da mesma maneira 20 plantas de bersim envasadas (5 em cada vaso), com 30 dias de sementeiras, as quais foram inoculadas com uma suspensão de esporos obtida desta vez a partir de culturas de *A. caulivorum* com 7 dias de idade, por verificarmos que assim obtínhamos uma massa de esporos muito mais abundante.

QUADRO 10

Resultados das inoculações em bersim ao fim de 15 dias

Vasos destapados ao fim de certos períodos de tempo	Plantas atacadas %	Classes de ataque				Aparecimento dos primeiros sintomas
		1	2	3	4	
24 h $\left\{ \begin{array}{l} v_1 \\ t_1 \end{array} \right.$	60 0		×			7.º dia
48 h $\left\{ \begin{array}{l} v_2 \\ t_2 \end{array} \right.$	100 0			×		5.º »
72 h $\left\{ \begin{array}{l} v_3 \\ t_3 \end{array} \right.$	40 0		×			5.º »
96 h $\left\{ \begin{array}{l} v_4 \\ t_4 \end{array} \right.$	100 0			×		6.º »

v₁, v₂, v₃ e v₄ — Vasos inoculados.t₁, t₂, t₃ e t₄ — Vasos testemunhas.

Classes de ataque:

0 — Plantas sãs.

1 — Necroses no caule e pecíolos até 0,5 cm de comprimento.

2 — Predomínio de necroses (1) e outras até 1 cm e, mais raramente, até 2 cm.

3 — Numerosas necroses (1) e frequentes casos com lesões superiores a 0,5 cm

4 — Abundantes necroses de todos os tipos e algumas circundantes.

Em tudo o mais, mantivemos as condições e as modalidades do ensaio anterior, tendo-se destapado o termo-higrógrafo ao fim de 96 horas após a inoculação, tempo que coincidiu com a última chapa de vidro retirada dos vasos v₄ e t₄.

No Quadro 11 estabelecido a partir dos registos do termo-higró-

QUADRO 11

Valores da temperatura e humidade relativa ocorridos ao longo de certos períodos, desde a inoculação até aos primeiros sintomas

Períodos de tempo (horas)	Temperaturas (°C)			Humidade relativa (%)		
	Máxima	Mínima	Média	Máxima	Mínima	Média
24	22	15,4	17,8	92	79	89,3
48	22	15,4	18,2	92	77	88,4
72	22	15,4	19,8	92	77	88,3
96	22	15,4	19,5	92	77	87,7
120	22	15,4	18,9	92	76	87,0
Média			18,0	Média		88,1

grafo, figuram os valores da temperatura e humidade relativa que ocorreram até ao aparecimento dos primeiros sintomas e que teve lugar, como no ensaio anterior, no 5.º dia após a inoculação.

O apuramento dos resultados foi feito desta vez, ao fim de 10 dias, porque as plantas se encontravam de tal maneira atacadas que algumas folhas se apresentavam já murchas.

No Quadro 12 reunimos os elementos apurados.

QUADRO 12

Resultados das inoculações em bersim ao fim de 10 dias

Vasos destapados ao fim de certos períodos de tempo	Plantas atacadas %	Classes de ataque				Aparecimento dos primeiros sintomas
		1	2	3	4	
24 h $\left\{ \begin{array}{l} v_1 \\ t_1 \end{array} \right.$	100 0		×			5.º dia
48 h $\left\{ \begin{array}{l} v_2 \\ t_2 \end{array} \right.$	100 0			×		» »
72 h $\left\{ \begin{array}{l} v_3 \\ t_3 \end{array} \right.$	100 0			×		» »
96 h $\left\{ \begin{array}{l} v_4 \\ t_4 \end{array} \right.$	100 0			×		» »

Quer dizer, os resultados foram sensivelmente os mesmos para os vasos destapados ao fim das 48, 72 e 96 horas, uma vez que todas as plantas apresentavam um grau de ataque muito semelhante. Contudo, as plantas descobertas ao fim do último período continuavam a apresentar um estiolamento pronunciado. Tal como no ensaio anterior, de novo se verificou menor intensidade de ataque nas plantas destapadas ao fim de 24 horas.

Numa terceira série de ensaios, foram inoculadas 24 plantas de bersim e igual número de trevo da Pérsia (*Trifolium resupinatum* ssp. *suaveolens*), repartidas por 8 vasos (6 plantas em cada), todas com 30 dias de sementeadas.

A inoculação foi realizada em 2 de Novembro de 1959, pelas 17 horas, com culturas de 7 dias de idade, segundo as mesmas técnicas dos dois ensaios anteriores e mantendo-se as plantas em câmara húmida por períodos de 48 e 72 horas.

No Quadro 13 registámos as condições verificadas durante o ensaio, desde a inoculação até ao aparecimento dos primeiros sintomas observados no 8.º dia, em bersim. A câmara húmida contendo o termo-higrógrafo foi destapada ao fim de 72 horas.

QUADRO 13

Valores da temperatura e humidade relativa ocorridos ao longo de certos períodos, desde a inoculação até aos primeiros sintomas em bersim

Períodos de tempo (horas)	Temperaturas (°C)			Humidade relativa (%)		
	Máxima	Mínima	Média	Máxima	Mínima	Média
24	21	12,9	15,5	90,5	83	87,8
48	21	10,8	14,3	90,5	76	86,8
72	21	10,8	14,1	90,5	76	87,1
96	21	10,8	14,3	90,5	76	86,9
120	21	10,8	14,2	90,5	76	86,8
144	21	10,8	14,1	90,5	76	86,4
168	21	10,8	14,0	90,5	76	86,0
192	21	10,8	13,9	90,5	76	85,7
Média			14,3	Média		86,7

O apuramento dos resultados teve lugar só 18 dias após a inoculação, em virtude de o trevo da Pérsia ter manifestado fraca susceptibilidade, constando esses elementos do Quadro 14.

QUADRO 14

Resultados das inoculações em bersim e trevo da Pérsia, ao fim de 18 dias

Vasos destapados ao fim de certos períodos de tempo	Plantas atacadas %	Classes de ataque				Aparecimento dos primeiros sintomas
		1	2	3	4	
48 h {	B ₁ e B ₂	100		×		8.º dia
	P ₁ e P ₂	66,7	×			9.º »
	T _b e T _p	0				
72 h {	B ₂ e B ₄	100			×	8.º »
	P ₂ e P ₄	66,7	×			10.º »
	T _b e T _p	0				

B₁, B₂, B₃ e B₄ — Bersim inoculado (6 plantas em cada vaso).

P₁, P₂, P₃ e P₄ — Trevo da Pérsia inoculado (6 plantas em cada vaso).

T_b e T_p — Plantas testemunhas, respectivamente, de bersim e trevo da Pérsia (6 em cada vaso).

A análise deste quadro permite apenas salientar que as plantas de trevo da Pérsia apresentaram muito menor susceptibilidade à loença do que as de bersim, nas mesmas condições.

No que respeita às diferenças nas intensidades de ataque, parece-nos lícito afirmar, em face também dos ensaios anteriores, que é indiferente o tempo de permanência das plantas em câmara húmida por períodos de 48 ou 72 horas.

Em conclusão dos ensaios preliminares, podemos portanto admitir que:

- a) A manutenção das plantas inoculadas em câmara húmida por períodos de 48, 72 ou 96 horas favorece mais a incubação da doença, assim como a intensidade de ataque, do que o período de 24 horas.
- b) O período de 96 horas apresenta a desvantagem de provocar acentuado estiolamento das plantas.
- c) O trevo da Pérsia apresenta muito menor susceptibilidade à doença que o bersim.
- d) Comparando as temperaturas e as humidades relativas médias decorrentes até ao aparecimento dos primeiros sintomas nas plantas inoculadas nas três experiências realizadas, e que constam dos Quadros 9, 11 e 13, verifica-se que a humidade relativa foi em todas muito semelhante. Desta maneira, o facto de o período de incubação da doença ter sido 3 dias mais longo no último ensaio que nos dois anteriores, poderá ser explicado pela ocorrência de temperaturas mais baixas. Com efeito, enquanto nos dois primeiros a temperatura média foi, respectivamente, de 19,6° C. e 18° C., no último ensaio foi de 14,3° C.

B) AVALIAÇÃO DO GRAU DE SUSCEPTIBILIDADE DE DIVERSAS FORRAGENS AO *A. CAULIVORUM*

Afinada a técnica de inoculação artificial do *A. caulivorum* durante a realização dos ensaios preliminares, decidimos avaliar o grau de susceptibilidade de algumas das principais plantas forrageiras com

interesse económico, tendo estudado 30 cultivares distribuídas pelas seguintes espécies de leguminosas*:

<i>Medicago sativa</i> L.	93351 4n (16)
8451	93352 4n (15)
56963	93352 4n (21)
<i>Melilotus alba</i> Medik.	<i>Trifolium incarnatum</i> L.
5874	8314
8152	<i>Trifolium pratense</i> L.
8229	5927
<i>Melilotus indica</i> (L.) All.	43336
5877	E. A. N. 4n
<i>Melilotus officinalis</i> Lamb.	<i>Trifolium repens</i> L.
5881	12109
<i>Melilotus segetalis</i> (Brot.) Serv.	<i>Trifolium resupinatum</i> L. ssp.
I. S. A.	<i>suaveolens</i> (Willd.) Dinsm.
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	12253
I. S. A.	12254
8083	77137
8404	77140 4n (4)
12258	77140 4n (6)
56980	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.
56992	8334
57025	12266

Realizámos ao todo, 4 ensaios, sendo dois executados em 1960, o terceiro em 1961 e o último em 1963.

* Agradecemos ao Ex.^{mo} Prof. Eng. Agr.^o João de Carvalho e Vasconcellos a selecção das espécies e aos Ex.^{mos} Engs. Agr.^{os} J. R. Marques de Almeida e J. Leão Ferreira de Almeida, ambos da Estação Agronómica Nacional, a escolha das cultivares e a cedência das respectivas sementes que, na sua quase totalidade, constam do *Index Seminum* daquela Estação.

I. No primeiro ensaio, cada cultivar foi semeada em 3 vasos de 15 cm de diâmetro, de maneira a ficarmos com 5 plantas em cada; dois foram destinados à inoculação e o terceiro para testemunha. Em 9 de Julho de 1960, quando as plantas tinham 30 dias de semente, foram inoculadas pelas 14 horas por atomização de uma suspensão de esporos em água destilada, utilizando desta vez uma torre de pulverização, em face do elevado número de vasos (90) e das plantas envolvidas na experiência (450).

Como inóculo utilizaram-se 6 culturas de *A. caulivorum* com 7 dias de idade, em gelose de batata glucosada a 2 % contida em balões de Erlenmeyer de 250 ml, mantidas à temperatura de $23^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$. A suspensão de esporos foi obtida pela adição de 200 ml de água destilada a cada balão, seguida de forte agitação. Para evitar que algum micélio ou partículas de gelose obstruíssem o bico atomizador, filtrava-se a suspensão de esporos através de algodão hidrófilo para outro balão que ficava a conter também a suspensão das restantes culturas.

Depois de atomizadas as plantas durante 30 segundos na torre sem a cúpula, os vasos eram em seguida colocados individualmente dentro de outro maior, com 40 cm de diâmetro, funcionando de câmara húmida. Para isso, cada vaso com o seu prato de barro assentava sobre a areia alagada do vaso de maiores dimensões, já descrito nos ensaios preliminares e, em seguida, era coberto com o vidro. As tampas de vidro foram retiradas ao fim de 48 horas e durante todo o tempo que durou o ensaio na estufa de campo do Instituto Superior de Agronomia, alagava-se o fundo dos vasos maiores e até mesmo o chão da estufa, de maneira a garantirmos uma elevada humidade.

Os vasos testemunhas foram previamente atomizados com água destilada e colocados no mesmo ambiente. Um termo-higrógrafo foi mantido nas mesmas condições das plantas em estudo.

Até ao termo do ensaio, todas as plantas foram inspeccionadas diariamente.

No Quadro 15, figuram os valores da temperatura e humidade relativa decorrentes até ao 6.º dia após a inoculação, período que englobou o aparecimento dos primeiros sintomas em todas as cultivares de bersim ensaiadas.

QUADRO 15

Valores da temperatura e humidade relativa ocorridos ao longo de certos períodos, desde a inoculação até aos primeiros sintomas em todas as cultivares de bersim

Períodos de tempo (horas)	Temperaturas °C			Humidade relativa %		
	Máxima	Mínima	Média	Máxima	Mínima	Média
24	26,0	14,7	20,2	94	66,5	80,1
48	27,0	14,7	20,6	94	66,5	81,5
72	27,0	14,7	19,7	94	64,0	82,0
96	27,0	14,7	19,9	94	59,0	78,1
120	27,3	14,0	20,0	94	58,0	77,4
144	27,5	14,0	20,3	94	58,0	78,0
Média			20,1	Média		79,5

O apuramento dos resultados fez-se ao fim de 2 semanas e os elementos colhidos constam do Quadro 16a. Porém, como havíamos semeado os vasos aplicando uma fraca densidade de sementes, dado que contávamos obter facilmente 5 plantas em cada, fomos surpreendidos perante a fraca germinação das mesmas em algumas cultivares, nomeadamente em algumas linhas de *T. alexandrinum* e *T. resupinatum* ssp. *suaveolens* autotetraploides, *T. pratense*, *T. repens*, *Melilotus indica* e *M. officinalis*, conforme se pode verificar no referido quadro. Por outro lado, as plantas de *T. incarnatum* não suportaram a elevada humidade existente e apodreceram, ao passo que o *Melilotus segetalis* e as cultivares de *Trigonella foenum-graecum* foram de tal maneira atacadas por *Oidium erysiphoides* Fr. que tornaram inoperantes as tentativas de identificação do *A. caulivorum* realizadas sobre necroses suspeitas. Deste modo, e para este ensaio, o apuramento dos resultados só foi feito em 8 espécies e o número de plantas por vaso não chegou a 5 em alguns casos, mas para que pudessemos obter o maior somatório possível de informações, não nos importámos que este número fosse noutros vasos excedido.

Para a avaliação do grau de susceptibilidade das plantas ensaiadas adoptávamos primeiramente o critério expresso no Quadro 16.

Porém, logo a seguir, entrávamos em linha de conta com as classes de ataque observadas (veja-se este cap., alínea A) e o maior ou menor período de incubação da doença. Assim, por exemplo, se a percentagem das plantas atacadas estivesse compreendida entre 80

QUADRO 16

Graus de susceptibilidade	Símbolos	Plantas atacadas (%)
Muito resistente	MR	0- 10
Resistente	R	10- 20
Susceptível	S	20- 80
Muito susceptível	MS	80-100

e 100, poderíamos considerá-las como susceptíveis em vez de muito susceptíveis, desde que, em face do comportamento das cultivares de bersim, a classe de ataque predominante traduzisse um carácter benigno e o aparecimento dos primeiros sintomas fosse tardio.

Tanto neste ensaio como nos seguintes, o *A. caulivorum* foi re-isolado pelo método do esporo único a partir das frutificações existentes nas necroses ou então, sempre que os sintomas se reduziam a ligeiros «traços» (figs. 28 a 32), a partir do tecido atacado.

QUADRO 16a

Grau de susceptibilidade de diversas forragens ao *A. caulivorum* em função das classes de ataque, percentagem de plantas infectadas e aparecimento dos primeiros sintomas

Inoculação em 9-7-60

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Medicago sativa</i> L.	8451	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	—	5			
		T	5	—	—	—	—				
		Totais das plantas atacadas	—	—	—	—	—				
	56963	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	—	5			
		T	5	—	—	—	—				
		Totais das plantas atacadas	—	—	—	—	—				

QUADRO 16a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Melilotus alba</i> Medik.	5874	v ₁	0	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	0	—	—	—	—	5			
	T	5	—	—	—	—					
	Totais das plantas atacadas			—	—	—	—				
	8152	v ₁	7	—	—	—	—	7	0	—	MR
		v ₂	4	—	—	—	—	4			
T	4	—	—	—	—	—					
Totais das plantas atacadas			—	—	—	—					
8229	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR	
	v ₂	7	—	—	—	—	7				
T	4	—	—	—	—	—					
Totais das plantas atacadas			—	—	—	—					
<i>Melilotus officinalis</i> Lamb.	5881	v ₁	3	1	—	—	—	4	14,3	14.º dia	R
		v ₂	3	—	—	—	—	3			
T	2	—	—	—	—	—					
Totais das plantas atacadas			1	—	—	—					
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	I.S.A.	v ₁	0	3	3	2	0	8	100	5.º dia	MS
		v ₂	0	3	1	2	0	6			
		T	6	—	—	—	—				
Totais das plantas atacadas			6	4	4	—					

QUADRO 16a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas atacadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	8083	v ₁	0	3	1	1	—	5	100	5.º dia	MS
		v ₂	0	3	2	2	—	7			
		T	7	—	—	—	—	—			
	Totais das plantas atacadas			6	3	3	—				
	8404	v ₁	1	5	—	—	—	6	83,3	6.º dia	MS
		v ₂	0	—	—	—	—	—			
		T	5	—	—	—	—	—			
	Totais das plantas atacadas			5	—	—	—				
	12258	v ₁	0	7	—	1	—	8	88,2	5.º dia	MS
		v ₂	2	2	3	2	—	9			
		T	5	—	—	—	—	—			
	Totais das plantas atacadas			9	3	3	—				
56980	v ₁	1	1	3	—	—	5	92,3	5.º dia	MS	
	v ₂	0	3	3	2	—	8				
	T	5	—	—	—	—	—				
Totais das plantas atacadas			4	6	2	—					
56992	v ₁	0	2	3	—	—	5	100	5.º dia	MS	
	v ₂	0	2	1	2	—	5				
	T	5	—	—	—	—	—				
Totais das plantas atacadas			4	4	2	—					

QUADRO 16a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ªs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	57025	v ₁	0	—	3	2	—	5	90	5.º dia	MS
		v ₂	1	2	2	—	—	5			
		T	5	—	—	—	—	—			
		Totais das plantas atacadas	2	5	2	—	—				
	93351 4n 16	v ₁	1	1	—	—	—	2	60	6.º dia	MS
		v ₂	1	1	—	1	—	3			
		T	2	—	—	—	—	—			
		Totais das plantas atacadas	2	—	1	—	—				
	93352 4n 15	v ₁	0	2	—	1	—	3	100	6.º dia	MS
		v ₂	0	1	1	—	—	2			
		T	2	—	—	—	—	—			
		Totais das plantas atacadas	3	1	1	—	—				
93352 4n 21	v ₁	1	4	—	—	—	5	90	5.º dia	MS	
	v ₂	0	4	1	—	—	5				
	T	5	—	—	—	—	—				
	Totais das plantas atacadas	8	1	—	—	—					
<i>Trifolium pratense</i> L.	5927	v ₁	3	—	—	—	—	3	0	—	MR
		v ₂	3	—	—	—	—	3			
		T	3	—	—	—	—	—			
		Totais das plantas atacadas	—	—	—	—	—				

QUADRO 16a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Apari-mento dos 1.ºs sín-tomas	Grau de sus-cepti-bili-dade
			0	1	2	3	4				
<i>T. pratense</i>	43336	v ₁	4	2	—	—	—	6	27,3	11.º dia	S
		v ₂	4	1	—	—	—	5			
	T	5	—	—	—	—					
	Totais das plantas atacadas		3	—	—	—					
<i>T. pratense</i>	E.A.N.	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	6	—	—	—	—	6			
	4n	T	5	—	—	—	—				
	Totais das plantas atacadas		—	—	—	—					
<i>Trifolium repens</i> L.	12109	v ₁	6	—	—	—	—	6	0	—	MR
		v ₂	3	—	—	—	—	3			
	T	3	—	—	—	—					
	Totais das plantas atacadas		—	—	—	—					
<i>Trifolium resupinatum</i> L. ssp. <i>suaveolens</i> (Willd.) Dinsn.	12253	v ₁	5	1	—	—	—	6	14,3	14.º dia	R
		v ₂	7	1	—	—	—	8			
	T	6	—	—	—	—					
	Totais das plantas atacadas		2	—	—	—					
<i>Trifolium resupinatum</i> L. ssp. <i>suaveolens</i> (Willd.) Dinsn.	12254	v ₁	6	—	—	—	—	6	0	—	MR
		v ₂	7	—	—	—	—	7			
	T	6	—	—	—	—					
	Totais das plantas atacadas		—	—	—	—					

QUADRO 16a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparrecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium resupinatum</i> L. ssp. <i>suaveolens</i> (Willd.) Dinsn.	77137	v ₁	3	—	—	—	—	3 4	14,3	12.º dia	R
		v ₂	3	1	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
	Totais das plantas atacadas		1	—	—	—	—				
	77140 4n 4	v ₁	4	3	—	—	—	7 5	33,4	14.º dia	S
		v ₂	4	1	—	—	—				
T		5	—	—	—	—					
Totais das plantas atacadas		4	—	—	—	—					
77140 4n 6	v ₁	6	—	—	—	—	6 6	8,3	14.º dia	MR	
	v ₂	5	1	—	—	—					
	T	5	—	—	—	—					
Totais das plantas atacadas		1	—	—	—	—					

v₁ e v₂ — Vasos inoculados.
T — Vasos testemunhas.

Classes de ataque:

- 0 — Plantas sãs.
- 1 — Necroses no caule e pecíolos dos folíolos até 0,5 cm de comprimento.
- 2 — Predomínio de necroses (1) e outras até 1 cm e, mais raramente, até 2 cm.
- 3 — Numerosas necroses (1) e frequentes casos com necroses superiores a 0,5 cm.
- 4 — Abundantes lesões de todos os tipos e algumas circundantes.

Graus de susceptibilidade:

- MS — Muito susceptível.
- S — Susceptível.
- R — Resistente.
- MR — Muito resistente.

2. O segundo ensaio incidiu já sobre as 11 espécies e 30 cultivares antes citadas e a inoculação do material teve lugar no dia 16 de Novembro de 1960, pelas 17 horas.

Foram seguidos os mesmos métodos anteriormente referidos, excepto quanto à concentração da suspensão de esporos, uma vez que resolvemos adicionar apenas 100 ml de água destilada a cada balão de cultura de *A. caulivorum*, em vez dos 200 ml utilizados anteriormente.

No Quadro 17 reunimos os valores da temperatura e da humidade relativa obtidos a partir dos registos do termo-higrógrafo, até ao 7.º dia após a inoculação, período máximo que abrangeu o aparecimento dos primeiros sintomas da doença em todas as cultivares de bersim ensaiadas.

QUADRO 17

Valores da temperatura e humidade relativa ocorridos ao longo de certos períodos, desde a inoculação até aos primeiros sintomas em todas as cultivares de bersim

Períodos de tempo (horas)	Temperaturas (°C)			Humidade relativa (%)		
	Máxima	Mínima	Média	Máxima	Mínima	Média
24	17,5	15,0	15,7	94	86	90,1
48	17,5	13,8	15,3	94	86	89,3
72	17,5	12,7	15,0	94	85	88,7
96	17,5	12,0	14,5	94	85	88,3
120	17,5	12,0	14,4	94	85	88,6
144	17,5	11,8	14,1	94	85	88,4
168	17,5	11,8	14,2	94	85	8,3
	Média		14,7	Média		88,8

Tal como no ensaio anterior, o apuramento dos resultados fez-se duas semanas após a inoculação e todos os elementos obtidos constam do Quadro 17a.

QUADRO 17a

Grau de susceptibilidade de diversas forragens ao *A. caulivorum*, em função das classes de ataque, percentagens de plantas infectadas e aparecimento dos primeiros sintomas

Inoculação em 16-11-60

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Medicago sativa</i> L.	8451	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	5				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		—	—	—	—				
	56963	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	5				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		—	—	—	—				
<i>Melilotus alba</i> Medlk.	5874	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	5				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		—	—	—	—				
	8152	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	5				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		—	—	—	—				

QUADRO 17a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Melilotus alba</i> Medik.	8229	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		—	—	—	—				
<i>Melilotus indica</i> (L.) All.	5877	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		—	—	—	—				
<i>Melilotus officinalis</i> Lamb.	5881	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		—	—	—	—				
<i>Melilotus segetalis</i> (Brot.) Serv.	I.S.A.	v ₁	3	2	—	—	—	5	20	8.º dia	S
		v ₂	5	—	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		2	—	—	—				
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	I.S.A.	v ₁	0	3	2	—	—	5	100	7.º dia	MS
		v ₂	0	4	1	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		7	3	—	—				

QUADRO 17a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparição dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	8083	v ₁	0	5	—	—	—	5	100	7.º dia	MS
		v ₂	0	3	2	—	—				
	T	5	—	—	—	—					
	Totais de plantas atacadas			8	2	—	—				
	8404	v ₁	0	4	1	—	—	5	100	7.º dia	MS
		v ₂	0	5	—	—	—				
	T	5	—	—	—	—					
	Totais de plantas atacadas			9	1	—	—				
	12258	v ₁	0	3	2	—	—	5	100	7.º dia	MS
		v ₂	0	4	1	—	—				
	T	5	—	—	—	—					
	Totais de plantas atacadas			7	3	—	—				
	56980	v ₁	0	4	1	—	—	5	90	7.º dia	MS
		v ₂	1	2	2	—	—				
	T	5	—	—	—	—					
	Totais de plantas atacadas			6	3	—	—				
56992	v ₁	0	4	1	—	—	5	100	6.º dia	MS	
	v ₂	0	4	1	—	—					
T	5	—	—	—	—						
Totais de plantas atacadas			8	2	—	—					

QUADRO 17a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Apari-mento dos 1.ºs sin-tomas	Grau de sus-cepti-bili-dade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	57025	v ₁	0	3	2	—	—	5	100	7.º dia	MS
		v ₂	0	4	1	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	7	3	—	—					
	93351 4n 16	v ₁	0	3	2	—	—	5	100	7.º dia	MS
		v ₂	0	3	2	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	6	4	—	—					
	93352 4n 15	v ₁	0	4	1	—	—	5	100	7.º dia	MS
		v ₂	0	5	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	9	1	—	—					
93352 4n 21	v ₁	0	2	3	—	—	5	100	7.º dia	MS	
	v ₂	0	3	2	—	—					
	T	5	—	—	—	—					
	Totais de plantas atacadas	5	5	—	—						
<i>Trifolium incarnatum</i> L.	8314	v ₁	4	1	—	—	—	5	10	10.º dia	R
		v ₂	5	—	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	1	—	—	—					

QUADRO 17a (continuação)

Espécies	Culti- vares	Vasos	Susceptibilidade em fun- ção das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plan- tas ino- culadas	Plan- tas ata- cadas %	Apa- reci- mento dos 1.ºº sin- tomas	Grau de sus- cepti- bili- dade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium pra- tense</i> L.	5927	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	—	—	—	—	—				
	43336	v ₁	3	2	—	—	—	5	30	12.º dia	S
		v ₂	4	1	—	—	—				
T		5	—	—	—	—					
Totais de plantas atacadas		3	—	—	—	—					
E.A.N. 4n	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR	
	v ₂	5	—	—	—	—					
	T	5	—	—	—	—					
	Totais de plantas atacadas	—	—	—	—	—					
<i>Trifolium repens</i> L.	12109	v ₁	5	—	—	—	—	5	0	—	MR
		v ₂	5	—	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	—	—	—	—	—				
<i>Trifolium resupi- natum</i> L. ssp. <i>suaveolens</i> (Wild.) Dinsm.	12253	v ₁	3	2	—	—	—	5	40	14.º dia	S
		v ₂	3	2	—	—	—				
		T	5	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	4	—	—	—	—				

QUADRO 17a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium resupinatum</i> L. ssp. <i>suaveolens</i> (Willd.) Dinsm.	12254	v ₁	3	1	1	—	—	5	40	8.º dia	S
		v ₂	3	2	—	—	—	5			
		T	5	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	3	1	—	—	—	—			
	77137	v ₁	3	2	—	—	—	5	30	13.º dia	S
		v ₂	4	1	—	—	—	5			
		T	5	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	3	—	—	—	—	—			
	77140 4n 4	v ₁	5	—	—	—	—	5	20	9.º dia	S
		v ₂	3	2	—	—	—	5			
		T	5	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	2	—	—	—	—	—			
77140 4n 6	v ₁	5	—	—	—	—	5	20	12.º dia	S	
	v ₂	3	2	—	—	—	5				
	T	5	—	—	—	—	—				
	Totais de plantas atacadas	2	—	—	—	—	—				
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	8334	v ₁	5	—	—	—	—	5	10	7.º dia	R
		v ₂	4	1	—	—	—	5			
		T	5	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	1	—	—	—	—	—			

QUADRO 17a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparição dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	12266	v ₁	4	1	—	—	—	5	10	7.º dia	R
		v ₂	5	—	—	—					
		T	5	—	—	—					
		Totais de plantas atacadas		1	—	—					

3. O terceiro ensaio foi executado praticamente nos moldes do anterior, com pequenas variantes. Assim, a inoculação teve lugar em 19 de Abril de 1961, pelas 13 horas, utilizando culturas isoladas recentemente e com 7 dias de idade. Por outro lado, e com raras excepções, resolvemos deixar em cada vaso, 10 plantas, isto é, o dobro das utilizadas no ensaio precedente. Aquele número só não se conseguiu atingir com algumas cultivares autotetraplóides ensaiadas, em virtude de, tal como refere FERREIRA DE ALMEIDA (1957) e FERREIRA DE ALMEIDA *et Alt.* (1960, 1962), as sementes respectivas apresentarem um fraco índice de fertilidade, por se encontrarem, ao tempo, ainda em período de selecção.

No Quadro 18, figuram os valores da temperatura e humidade

QUADRO 18

Valores da temperatura e humidade relativa ocorridos ao longo de certos períodos, desde a inoculação até aos primeiros sintomas em todas as cultivares de bersim

Períodos de tempo (horas)	Temperaturas (°C)			Humidade relativa (%)		
	Máxima	Mínima	Média	Máxima	Mínima	Média
24	19	12,8	15,6	92	84	89,3
48	19	12,8	15,2	92	84	88,9
72	19	12,8	15,1	92	83	88,2
96	19	12,3	14,9	92	83	87,9
120	19	12,3	14,9	92	80	87,3
144	19	12,3	15,2	92	80	87,3
	Média.....		15,2	Média.....		88,2

QUADRO 18a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Melilotus alba</i> Medik.	5874	v ₁	4	6	—	—	—	10	40	12.º dia	S
		v ₂	8	2	—	—	—	10			
	T	10	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Totais de plantas atacadas			8	—	—	—				
	8152	v ₁	3	7	—	—	—	10	35	9.º dia	S
		v ₂	10	—	—	—	—	10			
T	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Totais de plantas atacadas			7	—	—	—					
8229	v ₁	8	2	—	—	—	10	25	13.º dia	S	
	v ₂	7	3	—	—	—	10				
T	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Totais de plantas atacadas			5	—	—	—					
<i>Melilotus indica</i> (L.) All.	5877	v ₁	7	3	—	—	—	10	20	11.º dia	R
		v ₂	9	1	—	—	—	10			
T	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Totais de plantas atacadas			4	—	—	—					
<i>Melilotus officinalis</i> Lamb.	5881	v ₁	10	—	—	—	—	10	0	—	MR
		v ₂	10	—	—	—	—	10			
T	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Totais de plantas atacadas			—	—	—	—					

QUADRO 18a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparição dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade	
			0	1	2	3	4					
<i>Melilotus segetalis</i> (Brot.) Serv.	I.S.A.	v ₁	8	2	—	—	—	10	10	12.º dia	R	
		v ₂	10	—	—	—	—	10				
		T	10	—	—	—	—					
		Totais de plantas atacadas		2	—	—	—					
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	I.S.A.	v ₁	0	2	6	2	—	10	100	5.º dia	MS	
		v ₂	0	2	6	2	—	10				
			T	10	—	—	—	—				
			Totais de plantas atacadas		4	12	4					
	8083		v ₁	0	1	5	4	—	10	100	6.º dia	MS
			v ₂	0	1	1	6	2	10			
			T	10	—	—	—	—				
			Totais de plantas atacadas		2	6	10	2				
	8404		v ₁	0	—	6	3	1	10	100	5.º dia	MS
			v ₂	0	—	8	—	2	10			
			T	10	—	—	—	—				
			Totais de plantas atacadas		—	14	3	3				
12258		v ₁	0	—	9	—	1	10	100	5.º dia	MS	
		v ₂	0	—	6	4	—	10				
		T	10	—	—	—	—					
		Totais de plantas atacadas		—	15	4	1					

QUADRO 18a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>T. alexandrinum</i>	56930	v ₁	0	2	7	1	—	10	100	6.º dia	MS
		v ₂	0	2	8	—	—	10			
	T	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Totais de plantas atacadas			4	15	1	—				
	56992	v ₁	0	—	4	4	2	10	100	5.º dia	MS
		v ₂	0	1	7	1	1	10			
	T	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Totais de plantas atacadas			1	11	5	3				
	57025	v ₁	0	2	8	—	—	10	100	6.º dia	MS
		v ₂	0	0	0	9	1	10			
	T	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Totais de plantas atacadas			2	8	9	1				
93351 4n 16	v ₁	0	1	4	1	—	6	100	5.º dia	MS	
	v ₂	0	1	4	1	—	6				
T	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Totais de plantas atacadas			2	8	2	—					
93352 4n 15	v ₁	0	—	4	1	—	5	100	dia 5.º	MS	
	v ₂	0	1	4	—	—	5				
T	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Totais de plantas atacadas			1	8	1	—					

QUADRO 18a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.º sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>T. alexandrinum</i>	93352 4n 21	v ₁	0	—	8	2	—	10	100	5.º dia	MS
		v ₂	0	1	8	1	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		1	16	3	—				
<i>Trifolium incarnatum</i> L.	8314	v ₁	4	—	—	—	—	4	30	7.º dia	S
		v ₂	3	3	—	—	—	6			
		T	3	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		3	—	—	—				
	5927	v ₁	2	7	1	—	—	10	50	7.º dia	S
		v ₂	8	1	1	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		8	2	—	—				
<i>Trifolium pratense</i> L.	43336	v ₁	4	6	—	—	—	10	55	6.º dia	S
		v ₂	5	4	1	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		10	1	—	—				
	E.A.N. 4n	v ₁	7	3	—	—	—	10	25	6.º dia	S
		v ₂	8	2	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		5	—	—	—				

QUADRO 18a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.º sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium repens</i> L.	12109	v ₁	5	5	—	—	—	10	30	11.º dia	S
		v ₂	9	1	—	—	—				
		T	10	—	—	—					
		Totais de plantas atacadas		6	—	—					
<i>Trifolium resupinatum</i> L. ssp. <i>suaveolens</i> (Willd.) Dinsm.	12253	v ₁	4	5	1	—	—	10	80	10.º dia	S
		v ₂	0	2	6	1	1				
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		7	7	1	1				
	12254	v ₁	4	3	3	—	—	10	55	8.º dia	S
		v ₂	5	4	1	—	—				
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		7	4	—	—				
77137	v ₁	3	7	—	—	—	10	50	8.º dia	S	
	v ₂	7	3	—	—	—					
	T	10	—	—	—	—					
	Totais de plantas atacadas		10	—	—	—					
77140 4n 4	v ₁	0	4	—	—	—	4	80	8.º dia	S	
	v ₂	2	4	—	—	—					
	T	3	—	—	—	—	6				
	Totais de plantas atacadas		8	—	—	—					

QUADRO 18a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium resupinatum</i> L. ssp. <i>suaveolens</i> (Willd.) Dinsm.	77140 4n 6	v ₁	3	2	—	—	—	5	50	9.º dia	S
		v ₂	2	2	1	—	—	5			
		T	3	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	4	1	—	—	—	—			
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	8334	v ₁	1	7	2	—	—	10	70	9.º dia	S
		v ₂	5	4	1	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	11	3	—	—	—	—			
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	12266	v ₁	6	4	—	—	—	10	30	7.º dia	S
		v ₂	8	2	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	6	—	—	—	—	—			

4. Finalmente, o 4.º ensaio foi conduzido na Primavera de 1963. A inoculação teve lugar no dia 3 de Maio, pelas 20 horas, mantendo-se os métodos seguidos na experiência anterior.

Os valores da temperatura e da humidade relativa obtidos a partir do registo do termo-higrógrafo até ao 6.º dia após a inoculação, período que, como nos ensaios anteriores, abrangeu o aparecimento dos primeiros sintomas em todas as cultivares de bersim, figuram no Quadro 19.

QUADRO 19

Valores da temperatura e humidade relativa ocorridos ao longo de certos períodos, desde a inoculação até aos primeiros sintomas em todas as cultivares de bersim

Períodos de tempo (horas)	Temperaturas (°C)			Humidade relativa (%)		
	Máxima	Mínima	Média	Máxima	Mínima	Média
24	26,5	13,0	19,4	93	76,5	84,7
48	26,5	12,2	18,9	96	76,5	86,2
72	26,5	12,2	18,6	96	76,5	86,9
96	26,5	12,2	18,3	96	60,0	86,3
120	26,5	12,0	18,2	96	60,0	84,2
144	26,5	11,8	17,9	96	60,0	83,9
Média.....			18,6	Média.....		85,4

Pelas razões atrás referidas, resolvemos também desta vez fazer o apuramento dos resultados ao fim da terceira semana a contar do dia da inoculação, os quais constam do Quadro 19a.

QUADRO 19a

Grau de susceptibilidade de diversas forragens ao *A. caulivorum*, em função das classes de ataque, percentagens de plantas infectadas e aparecimento dos primeiros sintomas

Inoculação em 3-5-63

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Medicago sativa</i> L.	8451	v ₁	6	4	—	—	—	10	35	7.º dia	S
		v ₂	7	3	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	7		—	—	—				

QUADRO 19a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Medicago sativa</i> L.	56963	v ₁	8	2	—	—	—	10	20	12.º dia	R
		v ₂	8	2	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		4	—	—	—				
<i>Melilotus alba</i> Medik.	5874	v ₁	6	3	1	—	—	10	20	13.º dia	S
		v ₂	10	—	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—	—			
			Totais de plantas atacadas		3	1	—	—			
	8152	v ₁	7	3	—	—	—	10	30	12.º dia	S
		v ₂	7	3	—	—	—	10			
T		10	—	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		6	—	—	—				
8229	v ₁	6	4	—	—	—	10	40	11.º dia	S	
	v ₂	6	4	—	—	—	10				
	T	10	—	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		8	—	—	—				
<i>Melilotus indica</i> (L.) All.	5877	v ₁	6	4	—	—	—	10	20	11.º dia	R
		v ₂	10	—	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		4	—	—	—				

QUADRO 19a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade	
			0	1	2	3	4					
<i>Melilotus officinalis</i> Lamb.	5881	v ₁	6	4	—	—	—	10	20	13.º dia	R	
		v ₂	10	—	—	—	—	10				
		T	10	—	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	4									
<i>Melilotus segetalis</i> (Brot.) Serv.	I.S.A.	v ₁	9	1	—	—	—	10	10	12.º dia	R	
		v ₂	9	1	—	—	—	10				
		T	10	—	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	2									
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	I.S.A.	v ₁	0	—	8	1	1	10	100	5.º dia	MS	
		v ₂	0	—	5	2	3	10				
		T	10	—	—	—	—	—				
			Totais de plantas atacadas	— 13 3 4								
	8083		v ₁	0	—	6	4	—	10	100	5.º dia	MS
			v ₂	0	—	8	1	1	10			
T			10	—	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	— 14 5 1									
8404		v ₁	0	2	8	—	—	10	100	5.º dia	MS	
		v ₂	0	—	9	1	—	10				
		T	10	—	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas	2 17 1 —									

QUADRO 19a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ªs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	12258	v ₁	0	—	4	4	2	10	100	5.º dia	MS
		v ₂	0	—	5	2	3	10			
		T	10	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	—	—	9	6	5	—			
	56980	v ₁	0	—	7	3	—	10	100	6.º dia	MS
		v ₂	0	—	3	2	5	10			
		T	10	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas	—	—	10	5	5	—			
56992	v ₁	0	—	4	4	2	10	100	6.º dia	MS	
	v ₂	0	—	8	2	—	10				
	T	10	—	—	—	—	—				
	Totais de plantas atacadas	—	—	12	6	2	—				
57025	v ₁	0	—	5	4	1	10	100	5.º dia	MS	
	v ₂	0	—	5	5	—	10				
	T	10	—	—	—	—	—				
	Totais de plantas atacadas	—	—	10	9	1	—				
93351 4n 16	v ₁	0	—	5	2	3	10	100	4.º dia	MS	
	v ₂	0	—	4	4	2	10				
	T	10	—	—	—	—	—				
	Totais de plantas atacadas	—	—	9	6	5	—				

QUADRO 19a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>T. alexandrinum</i>	93352 4n 15	v ₁	0	—	3	6	1	10	100	4.º dia	MS
		v ₂	0	1	6	3	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		1	9	9	1				
<i>T. alexandrinum</i>	93352 4n 21	v ₁	0	—	9	1	—	10	100	3.º dia	MS
		v ₂	0	—	6	4	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		—	15	5	—				
<i>Trifolium incarnatum</i> L.	8314	v ₁	0	9	1	—	—	10	75	7.º dia	S
		v ₂	5	5	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		14	1	—	—				
<i>Trifolium pratense</i> L.	5927	v ₁	5	4	1	—	—	10	35	8.º dia	S
		v ₂	8	2	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		6	1	—	—				
<i>Trifolium pratense</i> L.	43336	v ₁	7	3	—	—	—	10	25	9.º dia	S
		v ₂	8	2	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—				
		Totais de plantas atacadas		5	—	—	—				

QUADRO 19a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparição dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>T. pratense</i>	E.A.N. 4n	v ₁	6	4	—	—	—	10	35	8.º dia	S
		v ₂	7	3	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—					
		Totais de plantas atacadas		7	—	—	—				
<i>Trifolium repens</i> L.	12109	v ₁	5	3	2	—	—	10	40	10.º dia	S
		v ₂	7	3	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—					
		Totais de plantas atacadas		6	2	—	—				
	12253	v ₁	0	8	2	—	—	10	90	6.º dia	S
		v ₂	2	5	2	1	—	10			
		T	10	—	—	—					
		Totais de plantas atacadas		13	4	1	—				
<i>Trifolium resupinatum</i> L. ssp. <i>suaveolens</i> (Willd.) Dinsm.	12254	v ₁	1	9	—	—	—	10	95	7.º dia	S
		v ₂	0	9	1	—	—	10			
		T	10	—	—	—					
		Totais de plantas atacadas		18	1	—	—				
	77140 4n 4	v ₁	0	9	1	—	—	10	100	7.º dia	S
		v ₂	0	9	—	1	—	10			
		T	10	—	—	—					
		Totais de plantas atacadas		18	1	1	—				

QUADRO 19a (continuação)

Espécies	Cultivares	Vasos	Susceptibilidade em função das classes de ataque (n.º de plantas)					Total de plantas inoculadas	Plantas atacadas %	Aparecimento dos 1.ºs sintomas	Grau de susceptibilidade
			0	1	2	3	4				
<i>T. resupinatum</i> <i>ssp. suaveolens</i>	77140 4n 6	v ₁	0	9	—	1	—	10	95	7.º dia	S
		v ₂	1	7	2	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas		16	2	1	—				
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	8334	v ₁	3	4	3	—	—	10	50	7.º dia	S
		v ₂	7	2	1	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas		6	4	—	—				
	12266	v ₁	9	1	—	—	—	10	25	11.º dia	S
		v ₂	6	4	—	—	—	10			
		T	10	—	—	—	—	—			
		Totais de plantas atacadas		5	—	—	—				

A partir dos elementos que figuram nos quadros 16a, 17a, 18a e 19a, elaborámos o Quadro 20, segundo a ordem decrescente de susceptibilidade das espécies ao *A. caulivorum*, onde se pode avaliar o comportamento de cada cultivar ao longo dos quatro ensaios realizados.

QUADRO 20

Apreciação global da susceptibilidade das forragens estudadas ao longo dos 4 ensaios

Espécies	Cultivares	1.º ensaio		2.º ensaio		3.º ensaio		4.º ensaio	
		In-cubação (dias)	Grau de susceptibilidade						
<i>T. alexandrinum</i>	I.S.A.	5	MS	7	MS	5	MS	5	MS
	8083	5	MS	7	MS	6	MS	5	MS
	8404	6	MS	7	MS	5	MS	5	MS
	12258	5	MS	7	MS	5	MS	5	MS
	56980	5	MS	7	MS	6	MS	6	MS
	56992	5	MS	6	MS	5	MS	6	MS
	57025	5	MS	7	MS	6	MS	5	MS
	93351	6	MS	7	MS	5	MS	4	MS
	4n(16)								
	93352	6	MS	7	MS	5	MS	4	MS
	4n(15)								
93252	5	MS	7	MS	5	MS	3	MS	
4n(21)									
<i>T. resupinatum</i> ssp. <i>suaveolens</i>	12253	14	R	14	S	10	S	6	S
	12254	—	MR	8	S	8	S	7	S
	77137	12	R	13	S	8	S	—	—
	77140	14	S	9	S	8	S	7	S
	4n (4)								
	77140	14	MR	12	S	9	S	7	S
4n (6)									
<i>T. pratense</i>	5927	—	MR	—	MR	7	S	8	S
	43336	11	S	12	S	6	S	9	S
	E.A.N.	—	MR	—	MR	6	S	8	S
	4n								
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	8334	—	—	7	R	9	S	7	S
	12266	—	—	7	R	7	S	11	S
<i>T. incarnatum</i>	8314	—	—	10	R	7	S	7	S
<i>T. repens</i>	12109	—	MR	—	MR	11	S	10	S

QUADRO 20 (Continuação)

Espécies	Cultivares	1.º ensaio		2.º ensaio		3.º ensaio		4.º ensaio	
		In-cubação (dias)	Grau de susceptibilidade						
<i>Melilotus alba</i>	5874	—	MR	—	MR	12	S	13	S
	8152	—	MR	—	MR	9	S	12	S
	8229	—	MR	—	MR	13	S	11	S
<i>M. segetalis</i>	I.S.A.	—	—	8	S	12	R	12	R
<i>M. indica</i>	5877	—	—	—	MR	11	R	11	R
<i>Medicago sativa</i>	8451	—	MR	—	MR	—	MR	7	S
	56963	—	MR	—	MR	9	R	12	R
<i>Melilotus officinalis</i>	5881	14	R	—	MR	—	MR	13	R

Em face do que temos vindo a expor, podemos desde já tirar as seguintes conclusões gerais:

a) As inoculações experimentais com o *A. caulivorum* foram positivas em todas as 30 cultivares pertencentes às 11 espécies ensaiadas.

b) O *T. alexandrinum* foi, de longe, a forragem que manifestou maior susceptibilidade à doença. A seguir, e por ordem decrescente situam-se: *T. resupinatum* ssp. *suaveolens*, *T. pratense*, *Trigonella foenum-graecum*, *T. incarnatum*, *T. repens*, *Melilotus alba*, *M. segetalis*, *M. indica*, *Medicago sativa* e *Melilotus officinalis*.

c) Três espécies são assinaladas pela primeira vez como susceptíveis de serem atacadas pelo *A. caulivorum* mediante inoculações artificial: *Melilotus officinalis* Lamb., *Melilotus segetalis* (Brot.) Serv. e *Trigonella foenum-graecum* L.

d) Tanto as cultivares autotetraplóides de bersim como as de trevo da Pérsia e trevo violeta parecem manifestar uma susceptibilidade muito semelhante às diplóides. Porém, é justo salientar que sob o ponto de vista cultural, todas as forragens autotetraplóides

experimentadas apresentaram um notável vigor quando comparadas com as diplóides.

Se analisarmos agora os períodos de incubação da doença para cada cultivar, assim como a distribuição das classes de ataque respectivas ao longo dos 4 ensaios, verifica-se facilmente que, de uma maneira geral e em especial para as plantas de bersim e de trevo da Pérsia, o grau de susceptibilidade foi maior no 3.º e 4.º ensaios, principalmente neste último. A explicação para o facto não poderá deixar de ser a existência nestes de melhores condições ambientais para o parasita. Com efeito, enquanto no 1.º ensaio a temperatura média correspondente ao período de incubação de 6 dias foi de 20,1º C., com uma humidade relativa média de 79,5 %, para o 2.º ensaio esses valores foram respectivamente de 14,7º C. e 88,8 %, nos 7 dias considerados, contra 15,2º C. e 88,2 % no 3.º ensaio e de 18,6º C. e 85,4 % no último, em relação aos 6 dias de incubação verificados. Quer dizer, tal como já havíamos notado quando dos ensaios preliminares, uma vez mais a temperatura teve uma acção preponderante em face, claro está, da existência de uma humidade relativa bastante elevada. Por outro lado, se no primeiro ensaio a temperatura média foi a que se aproximou mais da óptima para o desenvolvimento do parasita, a a humidade relativa, em contra-partida, traduziu-se por um valor mais baixo.

ESTAMPA VII

Figura 29 — *Necroses sobre M. indica, 3 semanas após a inoculação artificial do A. caulivorum. (Ampliada).*

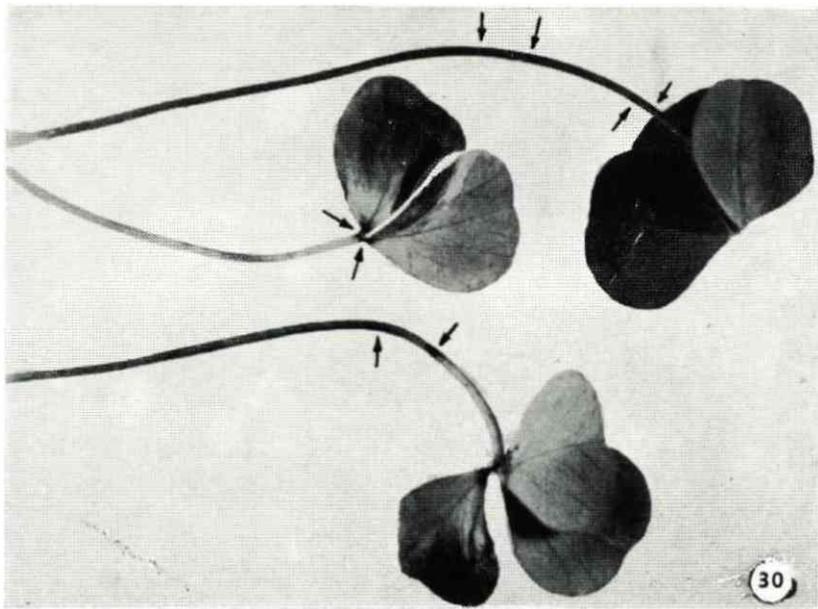
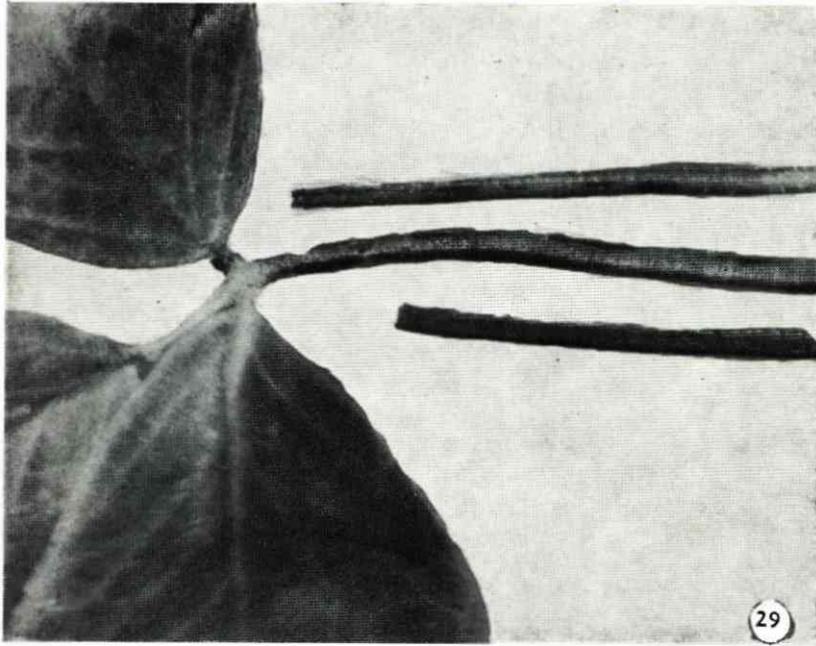
Figura 30 — *Idem, em Trifolium incarnatum, tal como indicam as setas.*

ESTAMPA VIII

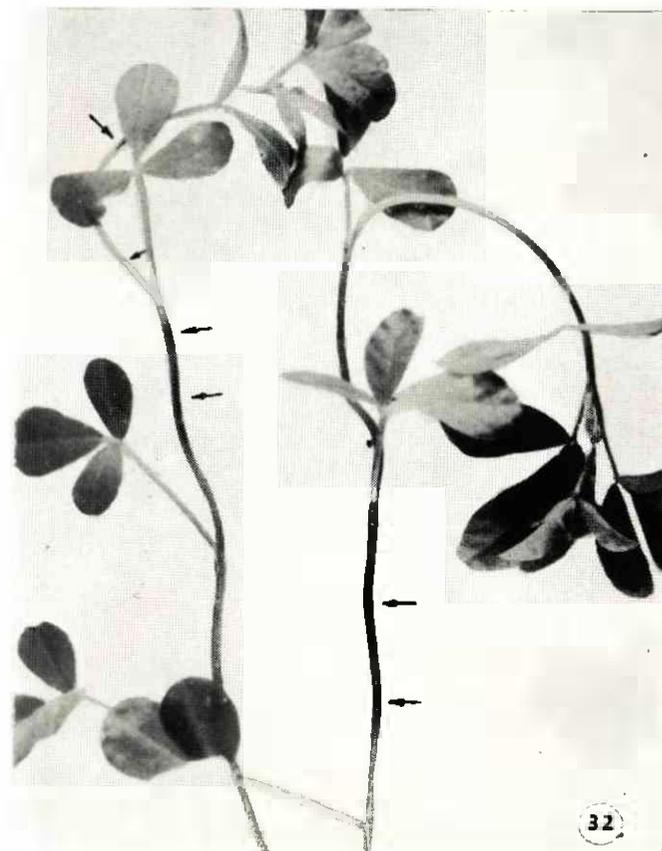
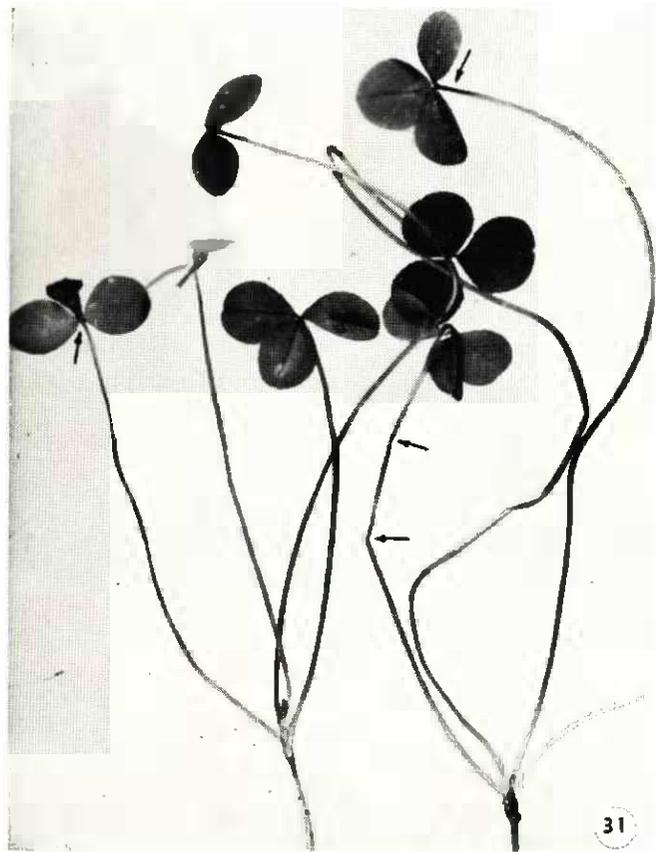
Figura 31 — *As setas indicam a existência de necroses em T. repens, produzidas pelo A. caulivorum, 3 semanas após a sua inoculação artificial.*

Figura 32 — *Idem, em Trigonella foenum-graecum.*

ESTAMPA VII



ESTAMPA VIII



ENSAIOS DE CAMPO

I. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA DESINFECÇÃO DAS SEMENTES E DO INSTRUMENTO DE CORTE NA DISSEMINAÇÃO DO *A. CAULIVORUM*

Em vista da escassez de bibliografia acerca do *A. caulivorum*, reconhecemos que muito haveria a estudar a seu respeito. Porém, interessava-nos sobretudo investigar aqueles aspectos que mais pudessem contribuir para debelar a doença no bersim, dada a sua importância económica no nosso País. Por isso, propusémo-nos averiguar a influência da desinfecção das sementes, visto termos já a informação de que o fungo é susceptível de ser transmitido através das mesmas. Para mais, o facto de CABRAL e PINTO-GANHÃO (1959) terem referido que a doença havia surgido em terrenos nunca semeados de bersim, fazia supor que a sua introdução se tenha feito por essa via. Contudo, não dispúnhamos de qualquer referência segura quanto à importância deste processo de disseminação, nem acerca dos fungicidas de sementes que estariam mais indicados para combater o parasita. Da mesma maneira, nada havíamos apurado quanto à importância do instrumento de corte na propagação da doença.

Embora CABRAL e PINTO-GANHÃO (1959) tivessem assinalado, *grosso modo*, uma quebra do rendimento da cultura do bersim devida

ao ataque do fungo, pretendemos então avaliar melhor essas perdas através do rendimento cultural e estudar também o efeito da desinfeção das sementes e a possível contribuição do instrumento de corte para a disseminação da doença. Por outro lado e sabendo, de antemão, que a humidade é um importante factor no seu aparecimento e manutenção, procurámos averiguar até que ponto tais questões poderiam ser discutidas em face da condução da cultura em sequeiro ou em regadio, ambas efectuadas entre nós, não obstante esperarmos que a temperatura relativamente elevada, que se faz sentir durante a época de regadio, pudesse diminuir consideravelmente os prejuízos causados pelo fungo.

A) *Ensaio em bersim de sequeiro*

Efectuámos dois ensaios de sequeiro, com início no Outono de 1959, sendo um realizado na Herdade das Silveiras, pertencente à Sociedade Agrícola das Silveiras *, em Samora Correia, e o outro na propriedade designada por Terra Velha, esta da Companhia das Lezírias *, em Vila Franca de Xira.

A₁) *Descrição*

1. *Ensaio nas Silveiras*

O Solo — O terreno onde se instalou o campo de ensaio situa-se em plena lezíria do Tejo e tem o seguinte perfil:

0,0—0,35 m Cinzento muito escuro, 5y3/1 (s,h) (segundo a escala de Munsell); argilosa; estrutura prismática, média moderada, composta de granulosa, média e grosseira forte; compacidade rija.

Transição nítida para:

0,35—1,00 m Cinzento muito escuro a cinzento, 5y3,5/1 (s), cinzento oliváceo escuro 5y3/2 (h), com muitas manchas médias e grandes, distintas, de cinzento oliváceo 5y5/2 (s), cinzento oliváceo 5y4/2 (h); argilosa; anisforme sub-angulosa, grosseira e muito grosseira, forte; compacidade rija.

* Agradecemos às Ex.^{mas} Administrações da Sociedade Agrícola das Silveiras e da Companhia das Lezírias todas as facilidades concedidas.

A permeabilidade era fraca, mas bastante pior na segunda camada, cuja estrutura era mais desfavorável. Por outro lado, apresentava uma drenagem externa praticamente nula, revelando ainda o perfil uma drenagem interna má, como provava a cor cinzenta escura e muito escura, o que indica que as culturas devem sofrer excesso de água durante os períodos de chuva e algum tempo após eles. Em consequência disso, observavam-se nítidas manifestações de hidromorfismo, sendo a primeira camada já um horizonte *gley*.

Análise do perfil

1.ª cova

Profundidade	pH em H ₂ O	pH em KCl	Reacção ao HCl a 10 %	SO ₄ =	Cl ⁻	Assimiláveis			
						P	K	Ca	Mg
0,00—0,35 m	8,3	6,7	forte	nulo	vestig.	Alto-m Alto	> m Alto	m Alto	Baixo-Med.
0,35—1,00 m	8,4	7,1	média	vestig.	»	Alto-m Alto	> m Alto	»	Baixo-Med.

2.ª cova

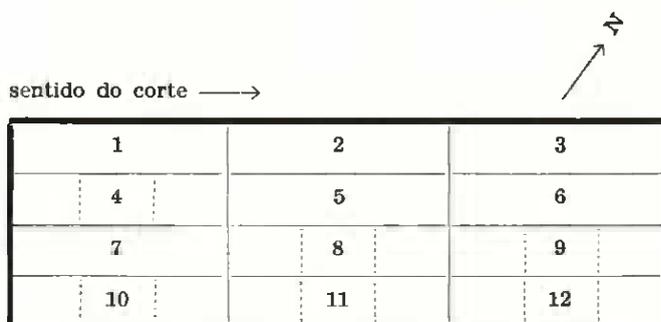
0,00—0,35 m	7,8	6,6	forte	nulo	vestig.	Alto-m Alto	> m Alto	> m Alto	Med.-Alto
0,35—1,00 m	8,7	7,0	média	»	»	Alto-m Alto	»	m Alto	Med.-Alto

Em face dos elementos assim referidos e de acordo com o sistema de classificação adoptado na Carta de Solos de Portugal, trata-se de um solo Hidromórfico Para-Aluviossolo.

O terreno havia sido semeado de trigo em Outubro de 1957 e, em princípios de Julho de 1958 foi semeado de milho para silagem; em princípios de Julho de 1958, foi semeado de cevada. Nos primeiros dias de Setembro de 1959 sofreu uma rega por aspersão, com 3 aspersores durante duas horas e meia, em virtude de tardarem as chuvas da época. Passados sete dias, fez-se uma passagem com grade de discos e outra com niveladora. Seguidamente, o terreno foi adubado com uma mistura de Superfosfato de Cálcio (300 kg/ha), Sulfato de Potássio (150 kg/ha) e Sulfato de Amónio (100 kg/ha). Esta operação

foi executada por um distribuidor mecânico, a que se seguiu uma passagem com grade de discos e, finalmente, fez-se passar um destorroador compressor. Após esta preparação, o terreno ficou em esplêndidas condições para se efectuar a sementeira e, depois de procedermos à marcação dos talhões experimentais, aquela foi efectuada no dia 10 de Setembro, por meio de semeador mecânico próprio para forragens, que distribuiu as sementes de bersim à razão de 26 kg/ha. Estas foram obtidas da colheita anterior da Sociedade Agrícola das Silveiras.

Esquema experimental — O campo de ensaio apresentava a configuração do seguinte esquema:



Modalidade (1) — Talhões 1, 2 e 6
 » g — » 8, 10 e 12
 » s — » 3, 5 e 7
 » gs — » 4, 9 e 11

onde foram delimitados 12 talhões, numerados de 1 a 12, com as dimensões de 30×6 metros e separados uns dos outros por ruas com 0,6 m de largura. Os talhões foram depois divididos em três sub-talhões com 10×6 m.

Utilizámos neste ensaio apenas o fungicida de sementes *Arasan*, à razão de 200 g/100 kg de semente que, de uma maneira geral, está indicado na desinfecção de sementes de leguminosas, muito embora não tivéssemos quaisquer referências quanto ao seu comportamento em relação ao *A. caulivorum*. Trata-se de um produto orgânico não mercurial, com 50 % de Tirame (PINTO-GANHÃO, 1957).

Para averiguar a influência do instrumento de corte na disseminação da doença, uma das modalidades consistia em desinfecção da gadoanha uma única vez com um solução a 0,5 % de formalina (aldeído

fórmico a 40 %), antes de iniciar o corte do 1.º terço de cada talhão. Como o corte foi sempre executado no mesmo sentido, no caso de haver disseminação pelo instrumento, seria de admitir que a cultura estivesse mais infectada na zona oposta àquela onde se havia iniciado o trabalho. Noutra modalidade, a gadanha era desinfectada cada vez que se iniciava o corte em cada sub-talhão. Realizando-se a operação de corte sempre no mesmo sentido, seria de supor que a infecção, a surgir, apareceria distribuída mais ou menos uniformemente pelos terços do talhão, embora possivelmente mais intensa na parte final de cada um deles.

Os gadanhos desinfetavam também as botas de borracha de acordo com as modalidades referidas. Além disso, também o pessoal que acarretava o bersim cortado procedia também à limpeza do calçado e utensílios de transporte com formalina, sempre que entrava nos talhões.

Conjugando aquelas duas modalidades de desinfecção da gadanha com a desinfecção das sementes, passámos a ter finalmente as seguintes quatro modalidades:

- (1) — Semente não desinfetada; gadanha desinfetada *apenas* antes do início do 1.º terço do talhão.
 - g — Semente não desinfetada; gadanha desinfetada antes de iniciar *cada* terço do talhão.
 - s — Semente desinfetada; gadanha desinfetada *apenas* antes do início do 1.º terço do talhão.
 - gs — Semente desinfetada; gadanha desinfetada antes de iniciar *cada* terço do talhão.

Estas modalidades, com três repetições, foram atribuídas à sorte aos 12 talhões demarcados.

Amostragem — A colheita de amostras fazia-se 2-3 dias antes de cada corte de bersim, tendo-se feito quatro amostragens; embora a cultura tivesse dado 5 cortes, o último foi destinado à obtenção de semente, atendendo ao estado avançado da cultura e da época. Além disso, a doença apresentava também um carácter bastante benigno, que justificava igualmente que não se fizesse uma quinta amostragem. A primeira colheita realizou-se em 27 de Novembro de 1959, a segunda em 9 de Janeiro de 1960 e a terceira e quarta, respectivamente em 30 de Março e 18 de Maio deste mesmo ano.

Em cada talhão, a tiragem de amostras incidia sobre cada um dos três sub-talhões (quer a modalidade exigisse ou não a sua divisão em sub-talhões), de onde se retiravam 2 amostras, com coordenadas tiradas à sorte, obtendo-se assim 6 amostras por talhão. A unidade de amostragem foi definida por um retângulo de madeira com $0,5 \times 0,25$ m.

As plantas delimitadas pelo retângulo eram cortadas junto ao solo, por meio de uma tesoura e, seguidamente, introduzidas num saco de polietileno já etiquetado. As amostras eram imediatamente levadas ao Laboratório, onde se procedia à classificação das plantas pelas 5 classes de ataque já definidas no Cap. IV e à respectiva contagem. Os resultados de cada contagem são apresentados em quadros anexos à interpretação estatística.

Produções — A fim de se avaliar o rendimento de cada modalidade, pesava-se a forragem de cada talhão no próprio campo. Os valores obtidos, expressos em t/ha, para cada talhão e por corte, figuram no Quadro 39, anexo também à análise estatística. Para que estes resultados fossem de maior rigor, houve em alguns cortes a necessidade de proceder à separação das ervas infestantes.

2. Ensaio nas Lezírias

O solo — O terreno deste ensaio situa-se a cerca de 6 km do local onde se instalou o campo das Silveiras. Conforme se pode apreciar pela descrição do perfil existente, trata-se de um solo muito semelhante ao do primeiro:

0,00–0,35 m Cinzento 5y5/1 (s), cinzento muito escuro 5y3/1 (h); argilosa; estrutura anisoforme, sub-angulosa, grosseira, forte; compacidade muito rija.

Transição nítida para:

0,35–1,00 m Cinzento muito escuro a cinzento, 5y3,5/1 (h), com muitas manchas pequenas, muito distintas de pardo amarelado escuro 10yR3/4 (h); argilosa; estrutura anisoforme, sub-angulosa, muito grosseira, forte.

Trata-se de um solo que, perante a sua defeituosa estrutura, revela fraca permeabilidade em qualquer das camadas, sendo mesmo pior que nas Silveiras; apresenta também mais acentuado hidromorfismo, provocado pela má drenagem externa e interna, sendo a primeira camada já um horizonte *gley*.

Análise de perfil

Profundidade	pH em H ₂ O	pH em KCl	Reacção ao HCl a 10 %	SO ₄ =	Cl ⁻	Assimiláveis			
						P	K	Ca	Mg
0,00—0,35 m	7,9	6,8	fraca	vestig.	multo baixo	> m Alto	> m Alto	> m Alto	Baixo
0,35—1,00 m	8,3	7,0	forte	multo baixo	multo baixo	B-m Baixo	> m Alto	> m Alto	Alto

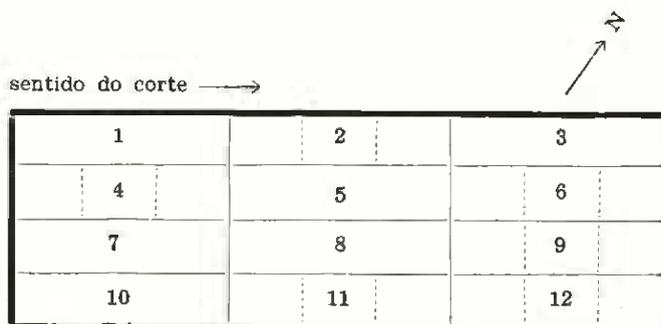
Perante os elementos apurados e de acordo com o sistema adoptado, podemos classificar o referido solo também como Hidromórfico Para-Aluviossolo.

O terreno esteve entregue a horticultura nos anos anteriores e, nos fins de Outubro de 1959, sofreu duas passagens com grade de discos. Seguidamente, marcámos os talhões experimentais e fez-se a nivelagem do terreno com ancinhos. Por se entender que o solo possuía um bom nível de fertilidade, não se procedeu a qualquer fertilização.

A sementeira foi realizada a lanço, em 30 de Outubro de 1959, à razão de 50 kg/ha, sendo as sementes de bersim provenientes da colheita do ano anterior da Companhia das Lezírias. Uma vez lançadas à terra, as sementes foram enterradas a ancinho.

Esquema experimental — A experiência foi conduzida nos moldes do ensaio das Silveiras, apenas com a diferença de que o desinfectante utilizado foi o fungicida organo-mercurial designado comercialmente por *Ceresan M*, à razão de 200 g/100 kg de sementes, o qual é constituído por 7,7 % de mercúrio, sob a forma de etilo-mercúrio para-tolueno sulfona.

O campo de ensaio apresentava a seguinte configuração:



Modalidade (1) — Talhões 3, 8 e 10
 » g — » 2, 9 e 12
 » s — » 1, 5 e 7
 » gs — » 4, 6 e 11

Amostragem — Fizeram-se apenas três colheitas de amostras, correspondentes a igual número de cortes efectuados e, pelas razões já referidas, destinou-se o 4.º e último corte para obtenção de semente.

A primeira amostragem foi executada em 18 de Março de 1960, a segunda em 6 de Maio e a terceira e última em 11 de Junho do mesmo ano.

Os resultados das contagens que incidiram, para cada corte, sobre as amostras retiradas da maneira que já se indicou no ensaio anterior, constam dos quadros que serviram de base à análise estatística.

No Quadro 40 apresentamos os valores das produções de forragem verde expressos em t/ha, para cada talhão e por corte.

A.) *Resultados e análise estatística*

Para melhor ordenação desta matéria, faremos sempre que possível, a análise estatística * paralela dos ensaios das Silveiras e das Lezírias, não obstante existirem aspectos divergentes, aliás já referidos.

* Agradecemos ao Ex.^{mo} Eng.º Agr.º Célio de Assunção Pestana a valiosa colaboração na análise estatística dos presentes ensaios.

QUADRO 21

Número de plantas nas diversas amostras colhidas antes do 1.º corte, seus totais por talhão e contribuição para χ^2 (por locais e modalidades)

Modalidades	Ensaio das Silveiras					Ensaio das Lezírias				
	Talhões	Número de amostras	Número de plantas		Contribuição para χ^2	Talhões	Número de amostras	Número de plantas		Contribuição para χ^2
			Nas amostras	Total				Nas amostras	Total	
Sem desinfecção das sementes	1	6	51; 29; 29; 55; 26; 44;	234	3,081	2	5	38; 28; 28; 80; 47;	221	13,584
	2	5	46; 37; 36; 38; 23;	180	0,273	3	6	57; 26; 49; 12; 28; 29;	201	0,179
	6	4	47; 26; 37; 33;	143	0,109	8	6	26; 50; 47; 11; 26; 39;	199	0,317
	8	4	38; 23; 30; 24;	115	4,175	9	4	23; 53; 47; 41;	164	4,872
	10	6	37; 62; 38; 39; 41; 40;	257	11,206	10	6	40; 42; 18; 12; 14; 26;	152	14,658
	12	6	19; 30; 24; 29; 24; 23;	149	17,051	12	4	32; 39; 32; 30;	133	0,186
	Total	31		1078	35,895	Total	31		1070	33,796
Com desinfecção das sementes	3	4	27; 24; 25; 24;	100	7,569	1	6	25; 37; 42; 18; 47; 33;	202	6,396
	4	5	55; 32; 34; 38; 40;	199	7,261	4	4	54; 43; 38; 38;	173	0,917
	5	5	44; 31; 34; 20; 29;	158	0,253	5	4	33; 45; 38; 33;	149	0,874
	7	3	33; 33; 32;	98	0,005	6	5	38; 54; 39; 48; 50;	229	3,879
	9	5	36; 19; 37; 24; 55;	171	0,261	7	4	30; 73; 35; 31;	169	0,412
	11	5	42; 17; 44; 29; 30;	162	0,036	11	5	38; 49; 50; 44; 23;	204	0,043
Total	27		888	15,385	Total	28		1126	12,521	
TOTAL	58		1966	51,280		59		2196	46,317	

a) *Análise do número de plantas por amostra*1. **Comparação de médias**

Esta análise efectuou-se apenas sobre as contagens realizadas antes do 1.º corte, pois convinha averiguar até que ponto a desinfeção das sementes poderia afectar o nascimento das plantas. Os resultados das contagens encontram-se no Quadro 21, onde se eliminaram algumas amostras, pelo facto de acharmos conveniente excluir as que se localizaram nas bordaduras dos talhões, com 1 metro de largura, a fim de evitar possíveis disseminações a partir dos vizinhos.

A comparação dos totais de plantas observados nas amostras dos diversos talhões do mesmo ensaio e modalidade conduziu aos valores de χ^2 , com 5 g. l., indicados no quadro anterior, bem como aos respectivos totais, com 10 g. l. A significância desses valores encontra-se no Quadro 22.

QUADRO 22

Significância dos valores de χ^2 baseados nos totais das amostras de cada talhão

	g.l.	χ^2	Nível de significância
SILVEIRAS			
sem desinfeção de sementes	5	35,895	0,001
com » » » »	5	15,385	0,01
	10	51,280	0,001
LEZIRIAS			
sem desinfeção de sementes	5	33,796	0,001
com » » » »	5	12,521	0,05
	10	46,317	0,001

Em ambos os casos se verifica que a distribuição do número de plantas pelo número total de amostras dos diversos talhões correspondentes à mesma modalidade é mais heterogénea do que seria de esperar, sendo o valor médio observado de χ^2 :

a) No ensaio das Silveiras $\frac{51,280}{10} = 5,128$

b) No ensaio das Lezírias $\frac{46,317}{10} = 4,632$

Assim, fomos levados a suspeitar que a distribuição do número de plantas por amostra, nos talhões com a mesma modalidade, não fosse a de Poisson, como deveria acontecer se, em todas as amostras dos talhões do mesmo ensaio e da mesma modalidade, o número esperado de plantas fosse o mesmo. Para ensaiar esta hipótese, recorreremos à prova (FISHER, 1954):

$$\chi^2_{[N-1]} = \frac{\sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2}{\bar{x}}$$

onde:

N = número de amostras em cada ensaio e modalidade

x_j = contagem efectuada na j-ésima amostra

\bar{x} = média geral observada para um mesma modalidade, num ensaio,

tendo obtido os resultados que figuram no Quadro 23.

QUADRO 23

Médias, variâncias e valores de χ^2 dos números de plantas em talhões da mesma modalidade e ensaio

	Média	Variância	N	$\chi^2_{[N-1]}$
SILVEIRAS				
sem desinfeção de sementes	34,77	107,381	31	92,638
com » » »	32,89	92,410	27	73,054
LEZÍRIAS				
sem desinfeção de sementes	34,52	229,591	31	199,552
com » » »	40,21	122,545	28	82,278

Todos os valores de χ^2 no Quadro 23 são significativos para o nível de significância 0,001, mostrando que não se pode manter a hipótese de o número de plantas por amostra seguir a distribuição de Poisson.

Isto traduz uma variabilidade excessiva (heterogeneidade) que deverá ser tida em conta, mediante o uso de um divisor apropriado, ao ensaiar os valores de χ^2 .

Para comparar o número médio de plantas por amostra nos talhões onde a semente foi desinfectada e naqueles em que não o foi, calculámos, com base nos totais das modalidades do Quadro 21 os valores:

$$\text{Silveiras } \chi^2_{[1]} = 1,513$$

$$\text{Lezírias } \chi^2_{[1]} = 12,834$$

O primeiro destes valores não é significativo e o segundo é aparentemente significativo (para o nível 0,001) de uma diferença no número médio de plantas por amostra, avaliada em $(40,214 - 34,516) / 34,516 = 0,1651 \approx 16,5\%$. Porém, a significância é apenas aparente, em vista da heterogeneidade que se verificou entre as amostras da mesma modalidade. Para atender a tal facto, dividimos este valor de χ^2 , pelo valor médio de χ^2 correspondente à heterogeneidade dos números de plantas nas amostras da mesma modalidade, resultando

$$\chi^2_{[1]} \text{ (corrigido)} = \frac{12,834}{4,632} = 2,771,$$

que já não é significativo.

2. Comparação de variabilidades

A heterogeneidade que verificámos no número de plantas das diversas amostras correspondentes ao mesmo ensaio e modalidade, também tem interesse para a comparação das modalidades com e sem desinfectação de sementes. No ensaio das Silveiras a relação entre os valores de χ^2 foi:

$$\text{totais de talhões com a mesma modalidade} \quad \frac{35,895}{15,385} = 2,333$$

$$\text{amostras com a mesma modalidade} \quad \frac{92,638}{73,054} = 1,268$$

No ensaio das Lezírias a relação foi:

totais de talhões com a mesma modalidade	$\frac{33,796}{12,521} = 2,699$
amostras com a mesma modalidade	$\frac{199,552}{82,278} = 2,425$

Não conhecemos métodos apropriados para ensaiar a significância destas relações entre dois valores que têm distribuições de χ^2 não centrais, como se viu anteriormente. No entanto, as relações um tanto elevadas que se verificaram no ensaio das Lezírias sugerem que, neste caso, a desinfecção das sementes tenha conduzido a uma maior regularidade de nascenças, ao passo que no das Silveiras tal efeito é menos perceptível. Não se deve esquecer, contudo, que nas Silveiras a sementeira foi feita mecânicamente, enquanto nas Lezírias se executou a lanço.

Como se verificou que as distribuições do número de plantas se afastavam da distribuição de Poisson, tentámos ajustar a cada caso uma distribuição de Poisson-Pascal (KATTI e GURLAND, 1961), com função geradora de probabilidades

$$\exp \{ \lambda [(q - pz)^{-k} - 1] \},$$

onde $\lambda > 0$, $q = 1 + p$, $p > 0$ quando $k > 0$ e $-1 < p < 0$ quando k é um inteiro negativo. As estimativas dos parâmetros são:

$$k = \frac{\hat{K}_{[3]} \hat{K}_{[1]}}{\hat{K}_{[3]} \hat{K}_{[1]} - (\hat{K}_{[2]})^2} - 2$$

$$p = \frac{\hat{K}_{[2]}}{\hat{K}_{[1]}(k + 1)}$$

$$\lambda = \frac{\hat{K}_{[1]}}{k p}$$

sendo $K_{[i]} (i = 1, 2, 3)$ os cumulantes factoriais.

No Quadro 24 reunimos as estimativas calculadas. Apenas no caso das amostras provenientes de talhões com sementes não desinfectadas, no ensaio das Lezírias, os valores estimados sugerem que

QUADRO 24

Estimativas dos parâmetros k , p e λ , para os dois ensaios e ambas as modalidades

	Silveiras		Lezírias	
	Sementes não desinfectadas	Sementes desinfectadas	Sementes não desinfectadas	Sementes desinfectadas
k	— 0,60732	— 0,56325	0,30213	— 0,54566
p	5,06350	3,90549	4,17562	2,96249
λ	— 11,30809	— 14,95105	27,36030	— 24,87722

se trata de uma distribuição próxima da distribuição binomial negativa, a que correspondem, na família de distribuições de Poisson-Pascal, os valores $k \rightarrow 0$ e $\lambda \rightarrow \infty$. Nos restantes casos, os valores negativos de λ resultam de os terceiros cumulantes das distribuições serem grandes, em comparação com os segundos cumulantes respectivos.

Os valores de $\hat{K}_{[2]}$, $\hat{K}_{[3]}$ e $\hat{K}_{[3]}/\hat{K}_{[2]}$ constam do Quadro 25, parecendo, dever concluir-se que todas as contagens do ensaio das Silveiras

QUADRO 25

	Silveiras		Lezírias	
	Sementes não desinfectadas	Sementes desinfectadas	Sementes não desinfectadas	Sementes desinfectadas
$\hat{K}_{[2]}$	69,1426	56,0993	187,6697	77,9545
$\hat{K}_{[3]}$	487,5795	314,7840	1804,0243	483,7067
$\frac{\hat{K}_{[3]}}{\hat{K}_{[2]}}$	7,05	5,61	9,61	6,20

e as contagens efectuadas em talhões com desinfecção, nas Lezírias, deixam de ter a distribuição binomial negativa (como era de esperar em face da natureza «contagiosa» do problema), devido a uma rare-

facção das caudas inferiores das respectivas distribuições. Os Gráficos VI e VII mostram justamente que as frequências acumuladas correspondentes ao ensaio das Lezírias só diferem na metade inferior das distribuições e que nas Silveiras, as duas distribuições são muito próximas.

Tal circunstância levou-nos a comparar apenas as metades inferiores das distribuições, em cada ensaio.

3. Comparação das metades inferiores das distribuições

Este estudo apoiou-se no seguinte critério: nos locais em que o terreno se encontrar bem ocupado pelas plantas, mesmo sem tratamento das sementes, não é de esperar que a sua desinfecção produza um aumento do número de plantas por unidade de superfície. A desinfecção das sementes, se tiver efeito favorável, apenas poderá permitir que nasçam e se desenvolvam mais plantas nos locais em que, sem ela, o terreno ficaria mal ocupado. Sendo assim, parece que o efeito da desinfecção se deverá procurar apenas naqueles locais em que, de outro modo, os nascimentos e o crescimento seriam prejudicados. Evidentemente que não seria possível uma experimentação directa deste problema, pelo que só a análise numérica permite abordá-lo. Assim, nas Lezírias, apenas houve 3 amostras (9,7 %) com menos de 30 plantas, quando as sementes foram desinfectadas, ao passo que nas testemunhas houve 14 amostras com menos de 30 plantas (50 %).

a) Nas Silveiras não foi possível evidenciar qualquer efeito da desinfecção das sementes sobre o número de plantas, para o que pode ter contribuído a fraca intensidade com que a doença se manifestou até à altura do 1.º corte (27/11/1959).

Seleccionando neste ensaio as contagens inferiores ou iguais às medianas das distribuições observadas, obteve-se, depois de ordenadas:

Amostras de talhões não tratados (N): 19, 23, 23, 23, 24, 24, 24, 26, 26, 29, 29, 29, 30, 30, 33.

Amostras de talhões tratados (T): 17, 19, 20, 24, 24, 24, 25, 27, 29, 29, 30, 31, 32.

GRAFICO VI

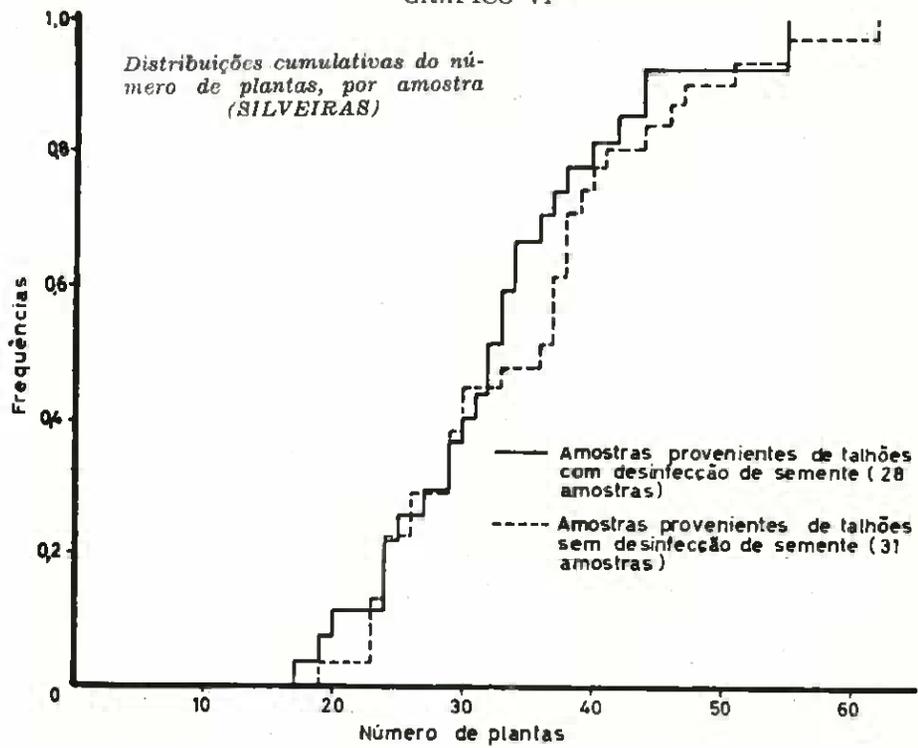
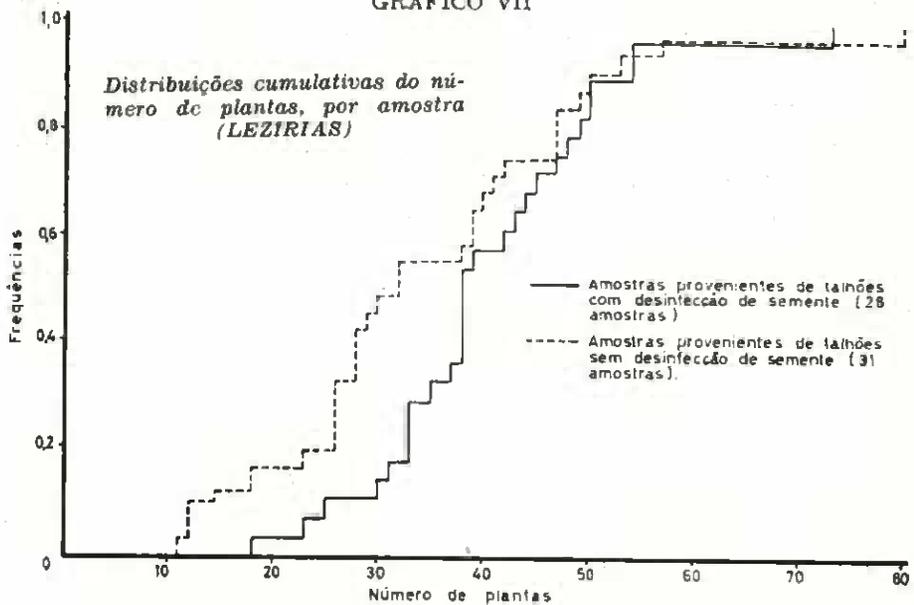


GRAFICO VII



Designando a proveniência das amostras respectivamente por N e T, a série reunida foi:

$$T \left\{ \begin{matrix} N \\ T \end{matrix} \right\} T N N N \left\{ \begin{matrix} N & N & N \\ T & T & T \end{matrix} \right\} T N N T \left\{ \begin{matrix} N & N & N \\ T & T & T \end{matrix} \right\} \left\{ \begin{matrix} N & N \\ T & T \end{matrix} \right\} T T N,$$

onde as chavetas englobam observações «empatadas». Desfazendo tais «empates» de modo a resultar o menor número possível de sequências de uma só letra, há $d = 10$ sequências. Como o número de observações no primeiro caso é $n_1 = 15$ e no segundo é $n_2 = 13$, vem $n = n_1 + n_2 = 28$; $\alpha = n_1 / n = 0,536$; $\beta = n_2 / n = 0,464$; $2n\alpha\beta = 13,927$; e $2\alpha\beta\sqrt{n} = 2,632$. Fazendo (MOOD, 1950)

$$t(0,05) = \frac{|d - 2n\alpha\beta|}{2\alpha\beta\sqrt{n}} = \frac{|d - 13,927|}{2,632} = 1,960,$$

as séries anteriores de amostras serão significativamente diferentes se $d \leq 8$, o que não acontece, pois $d = 10$ é o número (mínimo) de sequências da mesma letra.

b) Nas Lezírias as contagens inferiores ou iguais às medianas das distribuições observadas foram, depois de ordenadas:

Amostras de talhões não tratados (N): 12, 12, 12, 14, 18, 23, 26, 26, 26, 28, 28, 28, 29, 30.

Amostras de talhões tratados (T): 18, 23, 25, 30, 31, 33, 33, 33, 35, 37, 38, 38, 38.

A série reunida continha três «empates», que foram eliminados por casualização, resultando: N N N N N T N T T N N N N N N N N T N T T T T T T T T T T T T, com $d = 8$ sequências da mesma letra. Como $n_1 = 15$; $n_2 = 14$; $n = n_1 + n_2 = 29$; $\alpha = 15/29$; $\beta = 14/29$; $2n\alpha\beta = 14,483$; e $2\alpha\beta\sqrt{n} = 2,689$, resulta

$$t(0,05) = \frac{|d - 14,483|}{2,689} = 1,96,$$

sendo o valor crítico de d , $d < 9$.

Como se obteve $d = 8$, pode afirmar-se que, nas Lezírias, as contagens de plantas nos talhões tratados diferiam significativamente das dos não tratados, quanto à metade esquerda das distribuições, apresentando a dos primeiros, uma cauda esquerda menos acentuada.

QUADRO 26

Número de plantas em cada classe de ataque, por ensaio, modalidade e talhão, na altura do 1.º corte

Modalidades	Ensaio das Silveiras						Ensaio das Lezírias					
	Talhões	Classes de ataque			Total	Talhões	Classes de ataque			Total		
		0	1	2			3	0	1		2	3
sem desinfecção das sementes	1	190	44	—	—	234	2	78	101	26	16*	221
	2	144	36	—	—	180	3	92	93	11	5	201
	6	123	20	—	—	143	8	102	81	12	4	199
	8	76	39	—	—	115	9	74	69	19	2	164
	10	219	38	—	—	257	10	45	76	24	7	152
	12	110	39	—	—	149	12	72	45	10	6	133
	Total	862	216	—	—	1078	Total	463	465	102	40	1070
com desinfecção das sementes	3	89	11	—	—	100	1	82	73	43	4	202
	4	163	36	—	—	199	4	105	46	13	9	173
	5	130	28	—	—	158	5	79	62	8	0	149
	7	75	23	—	—	98	6	113	105	11	0	229
	9	136	35	—	—	171	7	54	50	53	0	169
	11	122	40	—	—	162	11	144	49	10	1	204
	Total	715	173	—	—	888	Total	577	385	138	26	1126
TOTAL	1577	389	—	—	1966	—	1040	850	240	66	2196	

* Inclui 4 plantas pertencentes à classe 4 de ataque.

QUADRO 28

Número de plantas em cada classe de ataque, por ensaio, modalidade, talhão e sub-talhão, na altura do 2.º corte

Modalidades	Sub-talhões	Ensaio das Silveiras						Ensaio das Lezírias					
		Talhões	Classes de ataque				Total	Talhões	Classes de ataque				Total
			0	1	2	3			0	1	2	3	
Sem desinfecção das sementes e gadanha desinfectada só no início do talhão (1)	a	1	33	4	7	1	45	3	22	27	30	4 *	83
	b		91	15	6	4	116		25	12	16	3	56
	c		27	15	7	7	56		12	18	14	6	50
	total		151	34	20	12	217		59	57	60	13	189
	a	2	—	—	—	—	—	8	35	14	21	8	78
	b		28	25	10	33	96		28	23	23	7	81
	c		10	7	14	40	71		29	21	25	10	85
total		38	32	24	73	167		92	58	69	25	244	
a	6	101	20	1	0	122	10	37	24	23	3	87	
b		132	9	1	0	142		18	9	5	4	38	
c		105	11	3	3	122		34	14	21	8	77	
total		338	40	5	3	386		89	47	49	15	200	
Total		527	106	49	88	770	Total	240	162	178	53	633	
Sem desinfecção das sementes e gadanha desinfectada no início de cada sub-talhão g	a	8	97	20	0	0	117	2	17	13	4	6	40
	b		112	14	8	6	140		37	31	15	14	97
	c		32	5	15	1	53		14	5	7	5	31
	total		241	39	23	7	310		68	49	26	25	168
	a	10	23	5	1	0	29	9	23	10	14	3	50
	b		104	13	3	1	121		45	28	28	6	107
	c		99	13	2	4	118		49	28	21	6	104
total		226	31	6	5	268		117	66	63	15	261	
a	12	10	7	14	19	50	12	36	15	9	5	65	
b		72	22	21	0	115		21	11	1	5	38	
c		53	6	2	0	61		17	11	21	2	51	
total		135	35	37	19	226		74	37	31	12	154	
Total		602	105	66	31	804	Total	259	152	120	52	583	
Com desinfecção das sementes e gadanha desinfectada só no início de cada talhão s	a	3	5	19	9	22	55	1	48	26	9	1	84
	b		48	16	21	7	92		—	—	—	—	—
	c		45	11	0	0	56		49	18	7	1	75
	total		98	46	30	29	203		97	44	16	2	159
	a	5	—	—	—	—	—	5	23	10	5	3	41
	b		59	24	13	3	99		35	14	14	0	63
	c		48	2	1	0	51		—	—	—	—	—
total		107	26	14	3	150		58	24	19	3	104	
a	7	24	25	21	27	97	7	28	17	6	2	53	
b		47	48	20	8	123		41	13	23	1	78	
c		76	23	3	0	102		55	24	24	1	104	
total		147	96	44	35	322		124	54	53	4	235	
Total		352	168	88	67	675	Total	279	122	88	9	498	
Com desinfecção das sementes e gadanha desinfectada no início de cada sub-talhão gs	a	4	59	13	7	0	79	4	51	24	11	0	86
	b		45	21	15	10	91		60	15	14	1	90
	c		32	12	10	0	54		40	17	28	4	89
	total		136	46	32	10	224		151	56	53	5	265
	a	9	87	13	12	2	114	6	29	12	9	1	51
	b		85	15	8	3	111		28	10	5	1	44
	c		96	16	1	5	118		67	31	11	0	109
total		268	44	21	10	343		124	53	25	2	204	
a	11	47	3	0	0	50	11	17	8	10	3	38	
b		17	15	2	0	34		—	—	—	—	—	
c		—	—	—	—	—		54	22	11	0	87	
total		64	18	2	—	84		71	30	21	3	125	
Total		468	108	55	20	651	Total	346	189	99	10	594	
TOTAL			1949	487	258	206	2900		1124	575	485	124	2308

* Plantas pertencentes à classe 4.

b) *Análise das intensidades de ataque*

Como em quase todos os casos se verificou heterogeneidade das contagens superior à que autorizaria o recurso a ensaios de χ^2 , calculávamos valores de χ^2 (corrigido) segundo

$$\chi^2 \text{ (corrigido)} = \frac{\chi^2}{F. H.},$$

sendo F. H. o valor médio observado de χ^2 , entre amostras correspondentes ao mesmo ensaio e modalidade. Quando necessário, agrupamos as classes de ataque de modo a resultarem valores esperados aceitáveis, de acordo com as recomendações de COCHRAN (1954).

1. 1.º Corte

Neste corte apenas há que considerar a classificação das plantas segundo provieram ou não de talhões semeados com semente desinfectada. Os resultados constam do Quadro 26.

QUADRO 27

Valores de χ^2 e respectivos g.l. para as comparações dentro das modalidades e entre as modalidades (1.º corte)

χ^2	Silveiras		Lezírias	
	Sementes não desinfectadas	Sementes desinfectadas	Sementes não desinfectadas	Sementes desinfectadas
Intra-modalidades g. l.	25,326 *** 5	9,047 N.S. 5	49,867 *** 15	183,708 *** 15
Combinado g. l.	34,373 *** 10		233,575 *** 30	
Valor médio observado	3,437		7,786	
Inter-modalidades (não corrigido) g. l.	0,063 (N.S.) 1		26,986 (***) 3	
Inter-modalidades (corrigido) g. l.	0,018 N.S. 1		3,466 N.S. 3	

N. S. = Não significativo.

*** = Significativo para P = 0,001.

() = Significância em provas não válidas, devido à heterogeneidade das distribuições.

A comparação das distribuições observadas nos talhões do mesmo ensaio e modalidade conduziram aos valores de χ^2 indicados no Quadro 27. Neste quadro figuram ainda os valores não corrigidos de χ^2 e os valores corrigidos (dividindo pelo valor médio: $\chi^2_{[10]}/10=3,437$, no caso das Silveiras; e por $\chi^2_{[30]}/30=7,786$, no caso das Lezírias).

2. 2.º Corte

Neste corte, além da classificação das plantas conforme provieram ou não de talhões semeados com semente desinfectada, há que considerar a sua classificação segundo o modo como se desinfectou a gadanha.

Os resultados das contagens constam do Quadro 28, onde se incluíram também os resultados correspondentes a sub-talhões, cujo estudo será feito em c).

As contagens correspondentes a talhões do mesmo ensaio e da mesma modalidade permitiram calcular os valores de χ^2 indicados no Quadro 29, que contém também os valores não corrigidos e os valores corrigidos de χ^2 , obtidos à custa dos totais das modalidades.

QUADRO 29

Valores de χ^2 e respectivos g. l. para as comparações dentro das modalidades e entre as modalidades (2.º corte)

χ^2	Silveiras			
	Sementes não desinfectadas		Sementes desinfectadas	
	(1)	g	B	gs
Intra-modalidades g.l.	311,353 *** 6	59,150 *** 6	36,554 *** 6	31,093 *** 6
Combinado g.l.	438,160 *** 24			
Valor médio observado	18,257			
Inter-modalidades (não corrigido) g.l.	143,157 (***) 9			
Inter-modalidades (corrigido) g.l.	7,841 N.S. 9			

QUADRO 29 (Continuação)

χ^2	Lezírias			
	Sementes não desinfectadas		Sementes desinfectadas	
	(1)	g	s	gs
Intra-modalidades g.l.	10,224 N.S. 6	15,588 * 6	11,457 N.S. 6	6,720 N.S. 6
Combinado g.l.	43,989 N.S. 24			
Valor médio observado	1,837			
Inter-modalidades (não corrigido) g.l.	109,265 (***) 9			
Inter-modalidades (corrigido) g.l.	59,610 *** 9			

N. S. = Não significativo.

* = Significativo para 0,05.

*** = Significativo para 0,001.

() = Significância em provas não válidas, devido à heterogeneidade das distribuições.

QUADRO 30

Decomposição de χ^2 (2.º corte)

	Silveiras		Lezírias	
	g.l.	χ^2	g.l.	χ^2
Efeito da desinfeção da semente	3	(44,795) 2,454	3	(97,680) 53,290 ***
Efeito do modo de desinfeção da gadanha	3	(79,823) 4,372	3	(10,307) 5,623
Inter-modalidades (total)	9	(143,157) 7,841	9	(109,265) 59,610
Diferença - inter-acção	3	(18,589) 1,018	3	(1,278) 0,697

*** — Significativo para 0,001.

Nota — As cifras entre parêntesis são valores de χ^2 sem correcção para a heterogeneidade das contagens; as restantes correspondem a valores corrigidos.

Apesar de no ensaio das Lezírias não ter havido uma heterogeneidade significativa, pareceu-nos prudente corrigir o valor de χ^2 inter-modalidades, que aliás é, de qualquer modo, significativo.

Os valores de χ^2 correspondentes às comparações entre as quatro modalidades foram, em ambos os ensaios, desdobradas nas suas componentes (não aditivas) relativas aos possíveis efeitos da desinfectação das sementes (S) e do modo como a gadanha foi desinfectada (G). Em nenhum caso pareceu necessário calcular a componente correspondente à inter-acção (GS), pois a soma das duas anteriores muito se aproxima do valor total de χ^2 , o que, apesar da não aditividade, indica que esta componente é pouco importante.

A decomposição dos valores de χ^2 correspondentes a modalidades está indicada no Quadro 30.

A análise feita mostra que, no ensaio das Lezírias, existe diferença significativa entre as distribuições das diversas modalidades, que se deve a um efeito benéfico da desinfectação das sementes.

QUADRO 32

Valores de χ^2 e respectivos g.l. para as comparações dentro das modalidades e entre as modalidades (3.º corte)

χ^2	Silveiras			
	Sementes não desinfectadas		Sementes desinfectadas	
	(1)	g	s	gs
Intra-modalidades g.l.	40,740 *** 8	42,685 *** 8	17,343 * 8	21,927 ** 8
Combinado g.l.	122,695 *** 32			
Valor médio observado	3,834			
Inter-modalidades (não corrigido) g.l.	37,853 (***) 12			
Inter-modalidades (corrigido) g.l.	9,873 N. S. 12			

QUADRO 31

Número de plantas em cada classe de ataque, por ensaio, modalidade e sub-talhão, na altura do 3.º corte

Modalidades	Sub-talhões	Ensaio das Silveiras							Ensaio das Lezírias						
		Talhões	Classes de ataque					Total	Talhões	Classes de ataque					Total
			0	1	2	3	4			0	1	2	3	4	
Sem desinfecção das sementes e gadoanha desinfectada só no início do talhão (1)	a	1	4	11	29	5	8	57	3	14	39	7	2	0	62
	b		7	21	48	29	17	129		21	68	57	7	2	155
	c		14	39	36	24	20	133		35	56	41	1	0	133
	total		25	78	113	58	45	319		70	163	105	10	2	350
	a	2	6	18	15	13	11	63	8	9	76	45	5	1	136
	b		4	18	30	20	12	84		0	46	35	7	2	90
	c		4	16	32	13	4	69		18	84	64	5	6	177
total	14	52	77	46	27	216	27	206	144	17	9	403			
a	6	27	32	34	28	30	51	10	8	84	52	22	4	170	
b		8	16	12	11	18	65		18	19	36	1	3	77	
c		12	14	8	6	10	50		3	67	25	10	1	106	
total	47	62	54	45	58	266	29	170	113	33	8	353			
Total		86	192	244	149	130	801	Total	126	539	362	60	19	1106	
Sem desinfecção das sementes e gadoanha desinfectada no início de cada sub-talhão g	a	8	3	11	21	12	9	64	2	17	64	23	2	0	106
	b		7	19	31	13	9	96		14	12	21	1	0	48
	c		3	36	9	15	12	50		34	65	53	11	2	165
	total		13	66	61	40	30	210		65	141	97	14	2	319
	a	10	0	12	21	7	4	44	9	0	27	17	16	0	60
	b		5	19	22	9	13	68		11	40	40	10	4	105
	c		17	42	56	16	21	152		0	51	11	2	0	64
total	22	73	99	32	38	264	11	118	68	28	4	229			
a	12	22	12	10	12	18	74	12	8	19	28	2	3	60	
b		30	46	43	24	20	163		9	26	20	7	3	65	
c		11	14	18	10	7	60		3	40	63	15	2	123	
total	63	72	71	46	45	297	20	85	111	24	8	248			
Total		98	211	231	118	113	771	Total	96	344	276	66	14	796	
Com desinfecção das sementes e gadoanha desinfectada só no início de cada talhão s	a	3	25	35	52	32	18	162	1	9	16	28	4	2	59
	b		3	22	17	18	13	73		11	43	58	7	0	119
	c		15	18	29	11	5	78		24	68	47	3	0	142
	total		43	75	98	61	36	313		44	127	133	14	2	320
	a	5	28	16	29	33	15	121	5	5	17	29	4	2	57
	b		23	27	31	12	7	100		3	79	57	8	2	149
	c		16	12	10	12	18	68		7	52	34	9	3	105
total	67	55	70	57	40	289	15	148	120	21	7	311			
a	7	16	19	31	5	4	75	7	34	80	47	4	0	165	
b		20	28	26	17	11	102		19	41	42	10	3	115	
c		3	8	12	10	6	39		29	45	38	3	0	115	
total	39	55	69	32	21	216	82	166	127	17	3	395			
Total		149	185	237	150	97	818	Total	141	441	380	52	12	1026	
Com desinfecção das sementes e gadoanha desinfectada no início de cada sub-talhão gs	a	4	17	28	64	19	7	135	4	14	76	58	11	3	162
	b		25	19	38	24	16	124		0	34	18	7	0	59
	c		23	32	46	18	20	139		9	90	29	9	1	138
	total		65	79	148	61	45	398		23	200	105	27	4	359
	a	9	14	7	14	11	13	59	6	48	53	44	1	0	146
	b		33	42	18	19	20	132		15	27	19	4	0	65
	c		8	16	22	10	6	62		18	90	42	0	0	150
total	55	65	54	40	39	253	81	170	105	5	0	361			
a	11	6	25	23	16	6	76	11	11	27	32	4	1	75	
b		15	29	46	19	16	125		24	50	58	12	2	146	
c		16	7	18	9	13	63		18	26	24	3	0	71	
total	37	61	87	44	35	264	53	103	114	19	3	292			
Total		157	205	289	145	119	915	Total	157	473	324	51	7	1012	
TOTAL		490	793	1001	562	459	3305		520	1797	1342	229	52	3940	

QUADRO 32 (Continuação)

χ^2	Lezírias			
	Sementes não desinfectadas		Sementes desinfectadas	
	(1)	g	s	gs
Intra-modalidades g.l.	55,742 *** 8	66,550 *** 8	46,086 *** 8	71,489 *** 8
Combinado g.l.	239,867 *** 32			
Valor médio observado	7,496			
Inter-modalidades (não corrigido) g.l.	34,042 (***) 12			
Inter-modalidades (corrigido) g.l.	4,541 N. S. 12			

N. S. = Não significativo. * = Significativo para 0,05.
 ** = Significativo para 0,01. *** = Significativo para 0,001.
 () = Significância em provas não válidas, devido à heterogeneidade das distribuições.

3. 3.º Corte

Os resultados das contagens encontram-se no Quadro 31 e os valores de χ^2 , obtidos como no caso do 2.º corte, constam do Quadro 32.

QUADRO 33
 Decomposição de χ^2 (3.º corte)

	Silveiras		Lezírias	
	g.l.	χ^2	g.l.	χ^2
Efeito da desinfeção da semente	4	(28,395) 7,406	4	(16,291) 2,173
Efeito do modo de desinfeção da gadanha	4	(5,259) 1,372	4	(5,614) 0,749
Inter-modalidades (total)	12	(37,853) 9,873	12	(34,042) 4,541
Diferença ~ inter-acção	4	(4,199) 1,095	4	(12,137) 1,619

QUADRO 34

Número de plantas em cada classe de ataque, por modalidade e sub-talhão, na altura do 4.º corte (Silveiras)

Tratamentos	Talhões	Sub-talhões	Classes de ataque					Total
			0	1	2	3	4	
Sem desinfeção das sementes e gadanha desinfectada só no início do talhão (1)	1	a	9	20	36	11	9	85
		b	11	0	8	6	2	27
		c	12	16	17	7	2	54
		Total	32	36	61	24	13	166
	2	a	7	26	32	14	8	87
		b	20	23	32	10	9	94
		c	4	20	58	18	10	110
		Total	31	69	122	42	27	291
	6	a	1	22	29	9	7	68
		b	6	20	43	11	5	85
		c	9	7	25	2	3	46
		Total	16	49	97	22	15	199
Total			79	154	280	88	55	656
Sem desinfeção das sementes e gadanha desinfectada no início de cada sub-talhão g	8	a	17	32	43	7	3	102
		b	2	15	24	11	7	59
		c	4	23	36	9	5	77
		Total	23	70	103	27	15	238
	10	a	0	15	17	4	3	39
		b	8	19	35	5	6	73
		c	12	33	28	14	1	88
		Total	20	67	80	23	10	200
	12	a	15	17	9	4	0	45
		b	23	20	40	8	6	97
		c	28	19	40	6	1	94
		Total	66	56	89	18	7	236
Total			109	193	272	68	32	674

QUADRO 34 (Continuação)

Tratamentos	Talhões	Sub-talhões	Classes de ataque					Total
			0	1	2	3	4	
Com desinfecção das sementes e gadanha desinfectada só no início de cada talhão	3	a	24	19	35	8	0	86
		b	35	26	19	10	3	93
		c	23	47	35	10	2	117
		Total	82	92	89	28	5	296
	5	a	8	13	23	1	0	45
		b	23	16	24	4	0	67
		c	21	30	29	4	1	85
		Total	52	59	76	9	1	197
	7	a	8	14	15	5	0	42
		b	35	30	27	5	0	97
		c	27	30	17	2	0	76
		Total	70	74	59	12	0	215
Total			204	225	224	49	6	708
Com desinfecção das sementes e gadanha desinfectada no início de cada sub-talhão	4	a	12	16	24	6	0	58
		b	19	22	14	3	0	58
		c	15	9	26	3	1	54
		Total	46	47	64	12	1	170
	9	a	22	32	24	2	0	80
		b	17	19	10	4	0	50
		c	18	15	14	0	0	47
		Total	57	66	48	6	0	177
	11	a	14	18	36	5	4	77
		b	25	32	38	6	2	103
		c	24	14	31	3	2	74
		Total	63	64	105	14	8	254
Total			166	177	217	32	9	601

A decomposição dos valores de χ^2 correspondentes a modalidades vai indicada no Quadro 33, onde não se encontra qualquer valor significativo.

4. 4.º Corte

Apenas no ensaio das Silveiras houve quatro cortes, figurando as contagens respectivas no Quadro 34.

A análise de tais contagens conduziu aos valores de χ^2 indicados no Quadro 35.

QUADRO 35

Valores de χ^2 e respectivos g.l. para as comparações dentro das modalidades e entre modalidades (4.º corte)

(Ensaio das Silveiras)

χ^2	Modalidades			
	(1)	g	s	gs
Intra-modalidades g.l.	15,489+ 8	40,851 *** 8	16,178 * 8	23,973 ** 8
Combinado g.l.	96,491 *** 32			
Valor médio observado	3,015			
Inter-modalidades (desinfecção da gadanha) (não corrigido) g.l.	7,153 N. S. 4			
Inter-modalidades (desinfecção da gadanha) (corrigido) g.l.	2,372 N. S. 4			

N. S. = Não significativo.

+ = Muito próximo do ponto 0,05.

* = Significativo para 0,05.

** = Significativo para 0,01.

*** = Significativo para 0,001.

Neste caso não atendemos à desinfecção da semente, uma vez que não fora significativa em nenhum dos cortes anteriores. Porém, ao calcular a heterogeneidade das contagens efectuadas sobre talhões da mesma categoria, tivemos-la em conta, por uma questão de prudência.

c) *Análise da intensidade de ataque nos sub-talhões*

Afim-de procurarmos um possível efeito das sucessivas desinfecções da gadanha durante o corte do mesmo talhão, procedemos à análise das contagens na base de sub-talhões: iniciais (a), médios (b) e terminais (c). Os dados em que se baseou esta análise constam dos Quadros 28 (2.º corte), 31 (3.º corte) e 34 (4.º corte das Silveiras). Sempre que necessário, procedemos ao agrupamento de classes de ataque, afim-de obtermos valores esperados de grandeza aceitável.

Calculámos os valores de χ^2 para cada categoria de sub-talhões; no caso da gadanha ser desinfectada apenas no início de cada talhão, incluímos na mesma categoria apenas os sub-talhões com o mesmo

QUADRO 36

Valores de χ^2 e respectivos g.l. para as comparações entre grupos de sub-talhões (2.º corte)

Modalidades	Silveiras			Lezírias		
	Sub-talhões	g.l. (a)	χ^2	Sub-talhões	g.l. (a)	χ^2
(1)	1a, 6a	2	19,199 ***	3a, 8a 10a	4	9,199 +
	1b, 2b, 6b	4	128,385 ***	3b, 8b, 10b	4	3,424 N. S.
	1c, 2c, 6c	4	128,736 ***	3c, 8c, 10c	4	7,529 *
	Total	10	276,320 ***	Total	12	20,152 **
s	3a, 7a	2	5,755 N. S.	1a, 5a, 7a	4	1,747 N. S.
	3b, 5b, 7b	4	19,642 ***	5b, 7b	2	1,565 N. S.
	3c, 5c, 7c	4	10,356 *	1c, 7c	2	5,405 N. S.
	Total	10	35,753 ***	Total	8	8,717 N. S.
g	8a, 8b, 8c	16	194,978 ***	2a, 2b, 2c, 9a	16	20,148 N. S.
	10a, 10b, 10c,			9b, 9c, 12a,		
12a 12b, 12c	12b, 12c					
sg	4a, 4b, 4c,	14	74,943 ***	4a, 4b, 4c, 6a	14	38,261 ***
	9a, 9b, 9c,			6b, 6c, 11a,		
	11a, 11b			11c		

N. S. = Não significativo.

+ = Próximo do nível de 0,05.

* = Significativo para 0,05.

** = Significativo para 0,01.

*** = Significativo para 0,001.

(a) — As classes de ataque consideradas foram 0, 1 e (2 + 3 + 4).

tratamento da semente e ocupando a mesma posição relativa nos talhões; no caso da gadanha ser desinfectada no início de cada sub-talhão, não atendemos à sua posição relativa.

1. 2.º Corte

No Quadro 36 reunimos os valores de χ^2 resultantes da comparação de sub-talhões na mesma situação, para o segundo corte.

No ensaio das Silveiras e para as modalidades (1) e s, a heterogeneidade entre sub-talhões na mesma situação parece ter sido maior quando a semente não foi desinfectada. Por isso, usámos, respectivamente para as modalidades (1) e s, os divisores

$$D_{1S} = \frac{276,320}{10} = 27,632$$

e

$$D_{2S} = \frac{35,753}{10} = 3,575$$

ao corrigir os valores de χ^2 obtidos quando comparámos os totais dos diversos sub-talhões designados pela mesma letra. Por analogia, usámos o mesmo critério no ensaio das Lezírias, tendo-se obtido

modalidade (1): $D_{1L} = \frac{20,152}{12} = 1,679$

modalidade s: $D_{2L} = \frac{8,717}{8} = 1,090.$

As comparações entre os totais dos sub-talhões com a mesma posição relativa nos talhões das modalidades (1) e s, conduziram aos seguintes valores de:

Silveiras:

Modalidade (1) $\chi^2_{[4]} = \frac{44,168}{D_{1S}} = 1,598 \quad \text{N. S.}$

Modalidade s $\chi^2_{[4]} = \frac{168,711}{D_{2S}} = 47,179 \quad \dots$

Lezírias

Modalidade (1) $\chi^2_{[4]} = \frac{1,883}{D_{1L}} = 1,122$ N. S.

Modalidade s $\chi^2_{[4]} = \frac{10,316}{D_{2L}} = 9,464^+$

O único valor aparentemente significativo que obtivemos corresponde porém a uma diminuição da intensidade de ataque ao passar-se dos sub-talhões *a* para os *b* e *c*. Esta variação de intensidade de ataque é oposta à que seria razoável esperar se houvesse vantagens nas sucessivas desinfecções da gadanha.

2. 3.º Corte

No Quadro 37 figuram os valores de χ^2 obtidos ao comparar sub-talhões da mesma situação, para o 3.º corte.

QUADRO 37

Valores de χ^2 e respectivos g.l. para as comparações entre grupos de sub-talhões (3.º corte)

Modalidades	Silveiras			Lezírias		
	Sub-talhões	g.l. (a)	χ^2	Sub-talhões	g.l. (b)	χ^2
(1)	1a, 2a, 6a	8	22,046 **	3a, 8a, 10a	6	40,091 ***
	1b, 2b, 6b	8	15,834 *	3b, 8b, 10b	6	31,458 ***
	1c, 2c, 6c	8	24,703 **	3c, 8c, 10c	6	51,170 ***
	Total	24	62,583 ***	Total	18	122,719 ***
s	3a, 5a, 7a	8	23,445 **	1a, 5a, 7a	6	25,894 ***
	3b, 5b, 7b	8	19,408 *	1b, 5b, 7b	6	27,535 ***
	3c, 5c, 7c	8	22,049 **	1c, 5c, 7c	6	25,426 ***
	Total	24	64,902 ***	Total	18	78,855 ***
g	8a, 8b, 8c 10a, 10b, 10c 12a, 12b, 12c	32	85,520 ***	2a, 2b, 2c 9a, 9b, 9c 12a, 12b, 12c	24	157,706 ***
	4a, 4b, 4c 9a, 9b, 9c 11a, 11b, 11c					
sg	4a, 4b, 4c 9a, 9b, 9c 11a, 11b, 11c	32	82,333 ***	4a, 4b, 4c 6a, 6b, 6c 11a, 11b, 11c	24	127,967 ***

* = Significativo para 0,05.
 ** = Significativo para 0,01.
 *** = Significativo para 0,001.

(a) — As classes de ataque consideradas foram 0, 1, 2, 3 e 4.
 (b) — As classes de ataque consideradas foram 0, 1, 2 e (3+4).

A heterogeneidade dos sub-talhões na mesma situação não parece ter diferido entre as modalidades (1) e s, em qualquer dos ensaios. Por isso, usámos os divisores

$$D_S = \frac{62,583 + 64,902}{24 + 24} = 2,656$$

e

$$D_L = \frac{122,719 + 78,855}{18 + 18} = 5,599,$$

respectivamente nos ensaios das Silveiras e das Lezírias, ao corrigir os valores de χ^2 destinados a comparar os totais dos sub-talhões designados pela mesma letra, nas modalidades (1) e s. Estas comparações conduziram aos valores de χ^2 :

Silveiras:

$$\text{Modalidade (1)} \quad \chi_{[s]}^2 = \frac{12,638}{D_S} = 4,758 \quad \text{N. S.}$$

$$\text{Modalidade s} \quad \chi_{[s]}^2 = \frac{10,698}{D_S} = 4,028 \quad \text{N. S.}$$

Lezírias:

$$\text{Modalidade (1)} \quad \chi_{[s]}^2 = \frac{24,086}{D_L} = 4,302 \quad \text{N. S.}$$

$$\text{Modalidade s} \quad \chi_{[s]}^2 = \frac{19,106}{D_L} = 3,412 \quad \text{N. S.}$$

3. 4.º Corte

Apenas no ensaio das Silveiras houve um quarto corte. Tal como ao analisar a intensidade de ataque nos talhões, ignorámos o facto de as sementes terem ou não sido desinfectadas. Ao comparar os sub-talhões na mesma situação, obtivemos os resultados contidos no Quadro 38.

QUADRO 38

Valores de χ^2 e respectivos g.l. para as comparações entre grupos de sub-talhões

(4.º corte)

Ensaio das Silveiras

Modalidades	Sub-talhões	g.l. (a)	χ^2
(1) e s	1a, 2a, 3a, 5a, 6a, 7a	15	44,841 ***
	1b, 2b, 3b, 5b, 6b, 7b	15	57,510 ***
	1c, 2c, 3c, 5c, 6c, 7c	15	83,135 ***
	Total	45	185,486 ***
g e gs	4a, 4b, 4c, 8a, 8b, 8c, 9a, 9b, 9c, 10a, 10b, 10c, 11a, 11b, 11c, 12a, 12b, 12c	51	153,670 ***

*** = Significativo para 0,001.

(a) — As classes de ataque consideradas foram 0, 1, 2 e (3 + 4).

Com base neste quadro, calculámos o divisor

$$D = \frac{185,486}{45} = 4,122$$

para corrigir o valor de χ^2 destinado a comparar os totais de sub-talhões designados pela mesma letra, no caso em que a gadanha foi desinfectada apenas no início dos talhões. Assim, resultou

$$\chi^2_{[s]} = \frac{32,981}{D} = 8,001 \quad \text{N. S.}$$

d) *Análise das produções*

Nos Quadros 39 e 40, respectivamente para o ensaio das Silveiras e das Lezírias, figuram as produções de matéria verde expressas em t/ha, por talhões, modalidades e cortes.

QUADRO 39
 Produções de bersim expressas em t/ha por talhões, modalidades e cortes
 Ensaio das Silveiras

Talhões	Modalidades	Produções					Total (2.º, 3.º e 4.º)
		1.º corte	2.º corte	3.º corte	4.º corte		
1	(1)	9,86	8,89	4,67	6,16	19,71	
2		10,11	11,97	4,67	7,30	23,94	
6		8,89	13,10	5,53	7,68	26,31	
		28,86	33,96	14,87	21,14	69,96	
8	E	10,06	12,74	5,15	7,39	25,28	
10		9,83	9,93	4,99	6,63	21,54	
12		10,33	10,71	5,40	7,49	23,61	
		30,22	33,38	15,54	21,51	70,43	
3	S	8,00	11,86	5,75	8,34	25,95	
5		8,11	13,03	4,90	7,04	24,98	
7		11,22	12,21	x	y	X	
		27,33	37,10	10,65 + x	15,38 + y	50,93 + X	
4	ES	7,83	11,00	4,75	4,76	20,51	
9		9,11	11,99	5,40	7,71	25,10	
11		9,06	9,92	5,38	7,96	23,25	
		26,00	32,91	15,53	20,43	68,86	
Datas dos cortes		27-11-59	11-1-60	1-4-60	23-5-60	—	

Valores estimados: x = 5,32 t/ha. y = 7,69 t/ha. X = 25,22 t/ha.

QUADRO 40

Produções de bersim expressas em t/ha por talhões, modalidades e cortes

Ensaio das Lezírias

Talhões	Modalidades	Produções			
		1.º corte	2.º corte	3.º corte	Total (2.º e 3.º)
3	(1)	4,13	14,46	14,84	29,30
8		1,37	23,22	17,72	40,93
10		1,03	15,96	19,76	35,72
		6,53	53,64	52,32	105,95
2	g	5,01	12,21	15,76	27,96
9		4,26	21,25	18,44	39,69
12		4,87	24,91	20,49	45,39
		14,14	58,37	54,69	113,04
1	s	2,97	9,51	15,93	25,44
5		2,00	18,61	15,50	34,11
7		1,58	12,63	14,12	26,78
		6,55	40,75	45,55	86,33
4	gs	1,71	9,04	14,78	23,82
6		3,12	21,98	14,38	36,36
11		2,00	22,53	20,11	42,64
		6,83	53,55	49,27	102,82
Datas dos cortes		22-3-60	10-5-60	20-6-60	—

Nos Quadros 41 e 42 apresentamos os resultados das análises de variância, respectivamente para os ensaios das Silveiras e das Lezírias.

No 3.º e 4.º cortes das Silveiras, o talhão n.º 7 apresentou forte infestação de ervas, o que nos levou a rejeitar as suas produções e a estimar os seus valores utilizando o princípio dos quadrados mínimos. Por isso, no Quadro 41, o número de graus de liberdade foi apenas de 7 naqueles cortes e para o total dos três últimos.

Nos Quadros 41 e 42 não se encontra qualquer valor significativo para os efeitos dos tratamentos. Desta maneira, em relação ao ensaio das Silveiras, o estudo das produções não acrescentou qualquer informação ao efectuado na base das contagens de plantas e seus graus de ataque. No que se refere ao ensaio das Lezírias, tam-

QUADRO 41

Análise de variância das produções de bersim no Ensaio das Silveiras

(t/ha)

Cortes	Origem	g.l.	S. Q.	Q. M.	F
1.º	Tratamentos	1	2,7552	2,7552	2,966
	Erro	10	9,2985	0,9298	—
	Total	11	12,0537	—	—
2.º	S	1	0,5927	0,5927	0,287
	G	1	1,9016	1,9016	0,919
	GS	1	1,0866	1,0866	0,525
	Tratamentos	3	3,5810	1,1937	0,577
	Erro	8	16,5476	2,0685	—
	Total	11	20,1286	—	—
3.º	S	1	0,1014	0,1014	0,580
	G	1	0,0045	0,0045	0,026
	GS	1	0,1065	0,1065	0,609
	Tratamentos	3	0,2125	0,0708	0,405
	Erro	7	1,2242	0,1749	—
	Total	10	1,4367	—	—
4.º	S	1	0,0602	0,0602	0,047
	G	1	0,4287	0,4287	0,336
	GS	1	0,7576	0,7576	0,594
	Tratamentos	3	1,2465	0,4155	0,328
	Erro	7	8,9239	1,2748	—
	Total	10	10,1704	—	—
2.º, 3.º e 4.º	S	1	1,7779	1,7779	0,307
	G	1	3,8635	3,8635	0,667
	GS	1	5,0194	5,0194	0,866
	Tratamentos	3	10,6609	3,5536	0,613
	Erro	7	40,5514	5,7931	—
	Total	10	51,2123	—	—

QUADRO 42

Análise de variância das produções de bersim no Ensaio das Lezírias
(t/ha)

Cortes	Origem	g.l.	S. Q.	Q. M.	F
1.º	Tratamentos	1	4,4273	4,4273	2,481
	Erro	10	17,8477	1,7848	—
	Total	11	22,2750	—	—
2.º	S.	1	26,1282	26,1282	0,724
	G	1	28,9581	28,9581	0,803
	GS	1	2,0700	2,0700	0,057
	Tratamentos	3	57,1562	19,0521	0,528
	Erro	8	288,6659	36,0832	—
Total	11	345,8221	—	—	
3.º	S	1	12,3424	12,3424	2,158
	G	1	3,0947	3,0947	0,541
	GS	1	0,1546	0,1546	0,027
	Tratamentos	3	15,5917	5,1972	0,753
	Erro	8	45,7550	5,7194	—
Total	11	61,3467	—	—	
2.º e 3.º	S	1	74,2370	74,2370	1,311
	G	1	46,3779	46,3779	0,819
	GS	1	7,3680	7,3680	0,130
	Tratamentos	3	127,9829	42,6610	0,753
	Erro	8	453,0062	56,6258	—
Total	11	580,9891	—	—	

bém não foi possível demonstrar qualquer efeito dos tratamentos sobre as produções, embora possa existir. Porém, o seu reflexo nas produções será de grandeza inferior àquela que um ensaio pode detectar, com três repetições por modalidade e talhões de 180 m² de área total.

A₃) *Discussão dos resultados da análise estatística*

A feição mais importante observada no decurso da análise estatística, diz respeito à heterogeneidade das diversas contagens. Efectivamente, ao comparar amostras correspondentes às mesmas modali-

dades, encontrámos frequentemente valores significativos de χ^2 . Isto aconteceu quando se considerou o número de plantas por amostra e a repartição dessas plantas pelas classes de ataque.

Em face desta heterogeneidade das contagens, muitos valores de χ^2 , que de outro modo seriam significativos, deixaram de sê-lo. Isto pode ter correspondido a uma diminuição da sensibilidade das provas de significação, pelo que os resultados verdadeiramente significativos de efeitos das modalidades ensaiadas foram escassos. Aquela heterogeneidade das contagens é a consequência lógica de a doença aparecer às manchas, pelo que frequentemente as amostras diferem entre si de modo notável, consoante tenham ou não caído em tais manchas. Isto verificou-se em ambos os ensaios e em todos os cortes, embora com intensidade variável.

Para se conseguir uma amostragem mais representativa, sem implicar um aumento substancial do número de plantas a examinar, de futuro deverá trabalhar-se, em relação a esta doença ou a qualquer outra do mesmo tipo, com unidades de amostragem definidos por rectângulos em que a relação maior/menor dimensão seja, tanto quanto possível elevada, tendendo para a amostragem em linhas. Outro processo, embora possivelmente mais trabalhoso, será colher maior número de amostras, de dimensões mais reduzidas, mas também tendendo para a forma linear.

a) *Ensaio das Silveiras*

No primeiro corte, efectuado em 27/11/59, o número de plantas por amostra não parece ter sido afectado pela desinfeção das sementes com *Arasan*.

Quando as sementes não sofreram tratamento, verificou-se uma maior heterogeneidade nas contagens, ao trabalhar com os totais das amostras dos talhões, do que quando foram tratadas; porém, o mesmo não parece ter sucedido quando se compararam individualmente as amostras. Por outro lado, também não foi possível obter uma diferença significativa quando se consideraram apenas as caudas inferiores das distribuições. Em ambos os casos, estas sofreram uma rarefacção da metade esquerda, mais ou menos da mesma intensidade, pelo que a distribuição binomial negativa não pareceu apropriada.

Ao estudar as percentagens de ataque, também não se notou qualquer benefício da desinfeção das sementes (Quadro 17) com o fungicida já referido. Contudo, não deixa de ser interessante compa-

rar os valores de χ^2 intra-modalidades (Quadro 17), pois o valor bastante maior obtido no caso das sementes não desinfectadas parece indicar que tenha havido uma tendência para ocorrerem mais focos de infecção nos talhões com esta modalidade (haja em vista que a percentagem de plantas atacadas nesta altura era apenas de 19,8).

No 2.º corte, exectuado em 11/1/60, também não se observou (Quadro 30) qualquer efeito significativo da desinfectação das sementes, nem do modo como se fez a desinfectação da gadanha. Mesmo quando se analisou a variação do ataque ao longo dos talhões, não foi possível evidenciar qualquer acção deste último factor. No entanto, no Quadro 29, os valores de χ^2 intra-modalidades tenderam a ser maiores quando as sementes não foram desinfectadas (311,353 e 59,150 em comparação com 36,554 e 31,093, todos com g. l. = 6). Isto sugere, principalmente para a modalidade (1), que as manchas atacadas tenham sido em maior número visto que, na altura do 2.º corte, a percentagem de plantas doentes era de 32,8. O mesmo se verificou ao calcular (Quadro 36) a heterogeneidade na base dos sub-talhões, que conduziram aos valores médios de χ^2 :

(1)	27,63
g	12,19
s	3,58
gs	5,35

No 3.º corte, realizado em 1/4/60, não se verificou qualquer diferença entre as modalidades comparadas, quer na base de talhões (Quadro 33), quer na de sub-talhões. Neste corte houve 85,2 % de plantas atacadas, pelo que a doença já se encontrava muito disseminada. Não obstante tal disseminação, ainda se nota (Quadro 32) uma heterogeneidade ligeiramente maior nas modalidades (1) e g (40,740 e 42,685 em comparação com 17,343 e 21,927), mas deixa de notar-se (Quadro 37) quando se consideram os sub-talhões, pelo que aquela diferença deverá ser olhada como casual.

Ao analisarmos os resultados do 4.º corte, feito em 23/5/60, já não se considerou o possível efeito da desinfectação das sementes, excepto na 1.ª linha do Quadro 35, onde aliás se confirma que a heterogeneidade é independente do tratamento das sementes (neste corte a percentagem de plantas atacadas foi à volta de 72 %).

Embora fôsse de esperar que qualquer efeito da desinfectação mais frequente da gadanha se tornasse mais nítido nos últimos cortes,

mesmo no 4.º corte ele não se revelou significativamente. Nem mesmo a comparação das heterogeneidades, à base do Quadro 38, sugere qualquer influência da desinfecção do instrumento de corte, pois os valores médios de χ^2 foram muito semelhantes:

$$(1) \text{ e } s \quad \frac{185,486}{45} = 4,122$$

$$g \text{ e } gs \quad \frac{153,670}{51} = 3,013$$

b) *Ensaio das Lezírias*

Neste ensaio, cuja sementeira foi feita a lanço, verificou-se também, em geral, uma grande heterogeneidade entre os números de plantas por amostra. Por isso, não foi possível evidenciar o efeito da desinfecção das sementes, feita com o fungicida *Ceresan M*, sobre a densidade de plantas, à custa da comparação de todas as contagens. Porém, visto tal heterogeneidade ter sido um tanto maior quando não se fez a desinfecção, suspeitámos que o tratamento tivesse algum efeito. Por outro lado, verificámos que a distribuição do número de plantas, provenientes de sementes não desinfectadas, não andaria longe da distribuição binomial negativa, ao passo que as provenientes de sementes desinfectadas pareciam seguir uma distribuição cuja cauda esquerda sofrera rarefacção de frequências. A distribuição binomial negativa não é inverosímil, se admitirmos que o ataque de plantas jovens conduza à sua destruição, pois a sementeira a lanço e a subsequente infecção de plantas vizinhas de outras inicialmente doentes, conduzirão a uma situação análoga à de uma população natural sujeita a contágio. Assim, a rarefacção observada no caso das plantas tratadas pareceu poder interpretar-se como um efeito da desinfecção, que se manifestaria apenas por permitir o desenvolvimento de plantas que, de outro modo, seriam destruídas. Por isso, esse efeito deveria exercer-se apenas nas vizinhanças dos pontos em que houvesse infecção potencial. Procurámos, segundo essas premissas, tal efeito, para o que recorreremos apenas à comparação das metades inferiores das distribuições, por meio de uma prova estatística não paramétrica, que nos permitiu verificar significativamente o efeito favorável da desinfecção sobre a homogeneidade da cultura.

No 1.º corte, realizado em 22/3/1960, o ataque foi considerável, pois encontrámos 52,6 % de plantas atacadas e a heterogeneidade foi bastante grande (Quadro 27), sobretudo no caso das plantas desinfectadas, onde foi $183,708 / 49,867 = 3,684$ vezes maior. Porém, a percentagem de ataque foi menor quando a heterogeneidade aumentou, o que é razoável quando as percentagens de ataque são elevadas. Isto pode significar que a disseminação da doença estivesse mais avançada nos talhões em que a semente não foi desinfectada, embora a grande heterogeneidade que neste caso se verifica, não tenha permitido chegar a valores significativos de χ^2 (corrigido).

No 2.º corte (executado em 10/5/60), a dispersão da doença foi mais regular, não obstante a proporção de plantas atacadas não ter aumentado, em relação ao 1.º corte, sendo da ordem dos 48 %. A diminuição da heterogeneidade em relação ao corte anterior deve resultar de uma maior disseminação da doença, aliada possivelmente a condições meteorológicas menos favoráveis ao parasita. Como consequência dessa diminuição de heterogeneidade, foi possível evidenciar significativamente (Quadros 29 e 30), para o nível de 0,001, um efeito da desinfecção das sementes sobre a intensidade de ataque no 2.º corte. Isto confirmou que tal efeito se tenha exercido já no 1.º corte, como havíamos suspeitado.

No 3.º corte, efectuado em 20/6/1960, as contagens efectuadas conduziram às seguintes distribuições das plantas pelas classes de ataque:

Modalidades	Classes de ataque				Total
	0	1	2	3 + 4	
(1) e g	499	314	298	105	1216
s e gs	625	261	187	19	1092
	1124	575	485	124	2308

e com as respectivas percentagens:

Modalidades	Classes de ataque			
	0	1	2	3 + 4
(1) e g	41,0	25,8	24,5	8,6
s e gs	57,2	23,9	17,1	1,7

Verifica-se, assim, que a desinfecção da semente conduziu a menores percentagens em todas as classes de ataque, mas principalmente nas de maior grau. Isto sugere que a desinfecção, além de diminuir a proporção de plantas atacadas, diminui também a gravidade do ataque.

Quanto às três sucessivas desinfecções da gadanha, nos sub-talhões de cada talhão, não foi possível evidenciar qualquer efeito, quer considerando os talhões, quer os sub-talhões.

No 3.º corte, em que a proporção de plantas atacadas desceu para 13,2 %, a heterogeneidade voltou a aumentar (Quadro 32) e não foi possível evidenciar efeitos de nenhuma das modalidades, nem mesmo quando se compararam as contagens efectuadas nos sub-talhões.

B) Ensaio em bersim de regadio

Esta experimentação, conduzida também nas Silveiras, foi realizada num solo com as características já referidas para o ensaio de sequeiro e, após ter sofrido uma preparação semelhante, o terreno foi semeado mecânicamente nos primeiros dias de Junho, à razão de 26 kg/ha. Sempre que necessário, a cultura era regada por aspersão, de acordo com o plano de rega normal da exploração.

Modalidades e Amostragem

Seguimos exactamente os moldes do ensaio de sequeiro. Na altura da 1.ª colheita de amostras, que teve lugar em 14 de Julho de 1960, a cultura apresentava um forte ataque de *Uromyces trifolii* (Hedw. f.) Lév. e encontrava-se já em plena floração. As 6 amostragens efectuadas em cada um dos 12 talhões vieram revelar que o *Aureobasidium caulivorum* era, praticamente, inexistente. Deste modo, embora em todos os talhões tivessem surgido plantas atacadas, os sintomas manifestaram-se sempre por ligeiros «traços» (classe 1), sem qualquer interesse económico. Por outro lado, a percentagem total de

plantas assim atacadas, nas 6 amostras de cada talhão, oscilou entre 0,9 e 4,2 %. A percentagem média de plantas atacadas para os seis talhões, em que se procedeu à desinfecção das sementes com *Arasan*, foi de 2,2 %, contra 2,0 % nas 36 amostras correspondentes aos talhões testemunhas. Contudo, o 1.º corte efectuado em 19 de Julho veio revelar que a produção total nos seis talhões em que se havia procedido à desinfecção da semente, foi de 12,7 t/ha, enquanto que a dos talhões testemunhas foi de 10,8 t/ha, isto é, 11,8 % a mais nos talhões tratados. Sendo assim, o facto de a amostragem não ter revelado benefício com a desinfecção da semente parece ser apenas aparente, uma vez que o aumento ainda apreciável da produção nos talhões tratados não pode ter outra explicação, a não ser que o fungicida tenha permitido o desenvolvimento de plantas que, de outro modo seriam destruídas, quer por acção do *A. caulivorum*, quer de outros fungos existentes no solo. Por outras palavras, a desinfecção das sementes de bersim com *Arasan* parece ter agora revelado um efeito favorável sobre a homogeneidade da cultura, o que afinal já havíamos verificado no ensaio das Lezírias, mas apenas em relação ao *Ceresan M*.

A 2.ª amostragem efectuou-se em 26 de Agosto e, nesta data, a cultura manifestava-se deveras enfraquecida, em virtude de persistir o ataque já mencionado da ferrugem e ainda porque, simultaneamente, grassava também agora o *Oidium erysiphoides* Fr. Nesse momento, o bersim encontrava-se de novo em floração.

No que respeita ao ataque de *A. caulivorum*, as amostras vieram revelar um débil acréscimo da doença, sem contudo se afastar do carácter benigno já assinalado para a 1.ª amostragem. Na verdade, todos os sintomas se limitavam aos característicos «traços» e a percentagem de ataque nos talhões oscilou entre 1,1 e 6,9 %.

Atendendo ao fraco nível da infecção existente por altura do 1.º corte, é evidente que não seria de esperar agora que se conseguisse averiguar algo sobre a responsabilidade do instrumento de corte na disseminação da doença. Com efeito, esse facto aliado à circunstância de persistirem condições meteorológicas desfavoráveis ao parasita, anulou antecipadamente qualquer tentativa nesse sentido, conforme facilmente se pode deduzir perante as percentagens de ataque acima referidas. Se considerarmos globalmente as amostragens em cada talhão e, portanto, abstraindo-nos da sua localização nos sub-

-talhões, verifica-se que, para cada modalidade, a percentagem média de plantas atacadas foi a seguinte:

(1)	5,0 %
g	4,4 %
s	2,4 %
gs	4,0 %

Isto é, os talhões onde se procedeu à desinfecção da semente acusam menor percentagem de ataque que persiste, se logicamente agruparmos as modalidades (1) com g e s com gs. Desta maneira, teremos:

(1) + g	4,7 %
s + gs	3,2 %

À luz do que já dissemos para o primeiro corte, não encontramos melhor explicação para o facto do que a maior regularidade da cultura que teria existido nos talhões onde se procedeu à desinfecção da semente. Sendo assim, mais francas condições de arejamento poderiam ter surgido nesses locais, contrariando a formação de ambiente húmido favorável à expansão da doença.

Perante o extremo depauperamento que a cultura do bersim apresentava, não obstante a aplicação das convenientes regas por aspersão, resolvemos dar por findo o ensaio e reservar o 2.º e último corte para obtenção de semente.

II. ESTUDO DO COMBATE AO *A. CAULIVORUM* COM TRATAMENTOS QUÍMICOS

Quando decidimos estudar esta doença do bersim, uma das nossas preocupações foi a de encontrar a solução para o problema, do ponto de vista fitossanitário, uma vez que a sua virulência fazia recear que, à semelhança do que acontece em certas regiões dos E. U. A. em relação ao trevo violeta, a micose passasse a ter um carácter limitante.

Convencidos da viabilidade técnica e económica da aplicação de tratamentos químicos contra a micose, embora não dispuséssemos de quaisquer indicações bibliográficas sobre tal, resolvemos experimentar pulverizações de fungicidas a alto volume, mas tendo em conta que o bersim é uma cultura anual sujeita a vários cortes, distanciados normalmente de cerca de um mês. Por outro lado, não poderíamos esquecer o facto de a matéria verde ser destinada principalmente à alimentação de gado leiteiro e de carne.

Vimos no Cap. III, quando estudámos laboratorialmente a eficácia relativa de 7 fungicidas, que tinham revelado boas possibilidades de serem experimentados no campo, o sulfato de cobre e o oxiclureto de cobre, entre os cúpricos e, no grupo dos orgânicos, o «Captane», o Zirame e o Tiocianato de Dinitrofenilo. Escolhemos o sulfato de cobre porque, sob a forma de calda Bordalesa, é ainda hoje um fungicida bastante seguro e dotado de grande aderência, característica esta muito importante, pois as épocas dos cortes correspondem normalmente em regime de sequeiro, a períodos de certa pluviosidade. O «Captane» foi preferido ao Zirame e ao Tiocianato de Dinitrofenilo, pelo facto de ser dotado de baixa toxicidade para o Homem e animais de sangue quente. Com efeito, segundo SHARVELLE (1961), nos E. U. A. a tolerância dos resíduos para o «Captane», emanadas pela Federal Food and Drug Administration, é de 100 p.p.m., não havendo restrições quanto ao intervalo de dias a respeitar entre a pulverização das culturas e a sua colheita, enquanto que para o Zirame se indica a tolerância de 7 p.p.m. e se recomenda que as plantas tratadas sejam consumidas só ao fim de 7 dias. No que respeita ao Tiocianato de Dinitrofenilo, este é um fungicida relativamente novo e, por isso mesmo, ainda mal estudado sob o ponto de vista toxicológico. Restamos ainda acrescentar que, segundo aquela organização americana, os produtos cúpricos estão ainda isentos de tolerâncias de resíduos, nomeadamente, a calda Bordalesa, pelo que julgamos assim ter salvaguardado a questão toxicológica.

À semelhança do que fizemos anteriormente, resolvemos também executar os tratamentos em sequeiro e regadio e decidimos ainda estudar a influência das condições meteorológicas sobre o parecimento e expansão da micose, o que foi realizado durante os quatro últimos anos (1959-63) na Tapada da Ajuda. Porque este estudo exigia a vizinhança de um posto meteorológico, os campos de ensaio em regime de sequeiro localizaram-se sempre na zona designada por Terra Grande e foram dispostos num raio de 100 metros à volta do posto ali existente, enquadrados na área ocupada pela cultura do bersim, segundo o plano de exploração do Instituto Superior de Agronomia (*).

* Agradecemos ao Ex.^{mo} Prof. Eng.^o Agr.^o Carlos Ernesto Helbling as inúmeras facilidades concedidas ao longo dos quatro anos de ensaio na Tapada da Ajuda; ao Ex.^{mo} Prof. Eng.^o Agr.^o J. Ponciano Penim ficámos a dever também a colaboração prestada.

A) Ensaio em *bersim* de sequeiro

A,) Descrição

O Solo — Atendendo à proximidade dos campos de ensaio, procedemos apenas à abertura de duas covas, situadas ambas na 9.^a Secção da Terra Grande, e, respectivamente, na 3.^a e 2.^a Folhas, por ter sido nelas que a doença se manifestou com maior intensidade nas épocas de 1959-60 e 1962-63, principalmente na primeira. As características dos perfis observados foram as seguintes:

1.^a Cova (2.^a Folha)

0,0-0,25 m Pardo-avermelhado escuro, 2,5yR 3/4 a 2/4, argilosa; estrutura granulosa média a grosseira, forte; compactidade rija; algumas pedras miúdas de calcário e basalto meteorizado.

Transição plana e nítida para:

0,25-0,65 m Pardo-avermelhado escuro, 5yR 2/2, argilosa; estrutura prismática média e grosseira, moderada a forte; compactidade firme; algumas pedras de calcário e basalto meteorizado; películas de argila na base dos agregados; muitas raízes.

Transição plana e nítida para:

0,65-0,95 m Pardo-avermelhado escuro, 5yR 3/4, argilosa; estrutura prismática, muito grosseira, moderada a forte; compactidade firme; algumas pedras de calcário e basalto meteorizado; raras raízes.

2.^a Cova (3.^a Folha)

0,0-0,30 m Pardo-avermelhado escuro, 5yR 3/3, argilosa; estrutura granulosa média a grosseira, forte; compactidade rija; algumas pedras de calcário e basalto meteorizado; muitas raízes.

Transição plana e nítida para:

0,30-0,70 m Pardo-avermelhado escuro, 5yR 3/2, argilosa; estrutura prismática, grosseira, moderada a forte; compacidade firme; algumas pedras de calcário e basalto meteorizado; algumas raízes.

Transição nítida para:

0,70-1,00 m Pardo-avermelhado escuro, 5yR 3/4, argilosa; estrutura prismática muito grosseira, moderada a forte; compacidade firme; algumas pedras de calcário e basalto meteorizado; raras raízes.

Trata-se de um solo fundo, bem estruturado, com boa drenagem interna nas 1.^{as} e 2.^{as} camadas, regular nas 3.^{as} e possuindo também boa drenagem externa, sendo além disso, muito susceptível a abrir fendas, sob tempo seco.

Análise dos perfis

1.^a Cova

Profundidade	pH em H ₂ O	pH em KCl	Reacção ao HCl a 10 %	SO ₄ =	Cl -	Assimiláveis			
						P	K	Ca	Mg
0,0 -0,25 m	7,7	6,4	fraca	nulo	vest.	>m Alto	Baixo-Med.	>m Alto	Med.
0,25-0,65 m	8,2	6,5	média	»	»	»	mBaixo-Baixo	»	»

2.^a Cova

0,0 -0,30 m	7,4	6,0	fraca	nulo	vest.	>m Alto	Baixo-Med.	>m Alto	Baixo-Med.
0,30-0,70 m	8,0	6,4	»	»	»	»	Baixo	»	»

Embora não tivéssemos encontrado o material originário, a descrição dos perfis leva-nos a referir que se trata de um solo argiloso (barro vermelho) derivado de basaltos ou doloritos, com intromissões calcárias.

Modalidades

Empregámos nos ensaios a calda Bordalesa neutra a 1 % e o «Captane» a 0,15 % de um pó molhável com 83 % de matéria activa. Havendo toda a conveniência em efectuar o menor número possível de pulverizações, resolvemos tratar a cultura uma única vez entre cada corte, em duas modalidades distintas: logo após o corte e duas semanas depois. Assim salvaguardaríamos o factor económico e respeitáramos razoavelmente o período de protecção conferido normalmente por um bom fungicida. Paralelamente, considerámos ainda duas modalidades testemunhas em que se procedia nas mesmas datas à simples pulverização de água. Desta maneira, passámos a ter o seguinte esquema experimental:

- B₁ — Pulverização com calda Bordalesa neutra a 1 %, logo após o corte.
- B₂ — Pulverização com calda Bordalesa neutra a 1 %, 2 semanas depois do corte.
- C₁ — Pulverização com «Captane» (83 % de m.a.) a 0,15 %, logo após o corte.
- C₂ — Pulverização com «Captane» a 0,15 %, 2 semanas depois do corte.
- A₁ — Pulverização com água, logo após o corte.
- A₂ — Pulverização com água 2 semanas depois do corte.

Os tratamentos foram sempre realizados a alto volume com um pulverizador do tipo Vermorel, à razão de 1200 litros por hectare. Por vezes, em virtude do tempo chuvoso, houve necessidade de retardar alguns dias as pulverizações. As 6 modalidades foram distribuídas à sorte por 18 talhões numerados de 1 a 18, cabendo 3 talhões a cada modalidade. Os talhões possuíam as dimensões de 4 × 3 m, sendo separados uns dos outros, por ruas com 0,60 m de largura. Sòmente no ensaio de 1961-62, o número de talhões foi de 24.

Amostragem — A colheita de amostras fazia-se normalmente no dia anterior ao do corte e de cada talhão retiravam-se duas amostras de coordenadas tiradas à sorte, sendo a unidade de amostragem definida por um quadrado de madeira com 0,25 m de lado. Deste modo, cada amostra era constituída pelas plantas que se encontravam dentro desse quadrado, as quais eram cortadas com uma tesoura junto ao

solo e, seguidamente, introduzidas num saco de polietileno previamente etiquetado. No Laboratório procedia-se então à classificação e contagem das plantas pelas 5 classes de ataque já referidas no Cap. IV.

Os resultados das contagens em cada corte, nos quatro anos de ensaios figuram adiante nos quadros anexos à interpretação estatística.

Produções — Para analisarmos possíveis efeitos dos tratamentos sobre o rendimento da cultura em matéria verde, pesava-se a forragem de cada talhão após cada corte, operação que se fazia imediatamente junto dos respectivos campos. Os valores obtidos são apresentados no Quadro 49 anexo também à análise estatística.

1.º ENSAIO (Época de 1959-60)

Foi realizado na 3.ª Folha da 9.ª Secção, da Terra Grande do I.S.A., onde na época de 1958-59 se cultivaram trigos. Em 3 de Agosto de 1959, o terreno foi lavrado com juntas de bois e no dia 12 de Outubro sofreu uma gradagem com grade portuguesa e dois corpos de grades Greiner. A sementeira do bersim foi realizada a lanço neste mesmo dia, à razão de 30 kg/ha, com sementes da exploração do I. S. A., da época de 1957-58; a cobertura da semente foi obtida por gradagem com três corpos Greiner.

Os talhões de ensaio foram implantados depois do nascimento das plantas, procurando-se que correspondessem a uma zona onde a densidade da cultura fosse homogénea. No esquema seguinte apresentamos a configuração do campo de ensaio:

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18



Modalidade B ₁	—	Talhões	5, 8 e 16
»	B ₂	»	1, 4 e 12
»	C ₁	»	10, 11 e 14
»	C ₂	»	2, 7 e 18
»	A ₁	»	6, 13 e 15
»	A ₂	»	3, 9 e 17

A 19 de Dezembro de 1959 fez-se a 1.^a amostragem. Apenas as amostras dos talhões n.ºs 11, 13 e 15 revelaram a presença da doença com, respectivamente, 4, 6 e 1 plantas atacadas, a que se atribuiu o grau de ataque 1, facto que mostra bem o carácter benigno com que, nessa data, o parasita se manifestou.

Em 21 do mesmo mês, procedeu-se ao 1.º corte, mas só a 25 se conseguiu cumprir as modalidades A₁, B₁ e C₁, devido ao tempo chuvoso; os tratamentos A₂, B₂ e C₂ foram realizados em 5 de Janeiro de 1960.

A 2.^a colheita de amostras teve lugar em 24 de Fevereiro de 1960, isto é, cerca de dois meses após a primeira e, entretanto, já se havia desencadeado um forte ataque; tal como já havíamos referido nos ensaios das Silveiras e das Lezírias, de novo verificámos que a doença começa por surgir em focos que a pouco e pouco vão alastrando em manchas. Numa observação sintomatológica de todo o conjunto, pareceu-nos que os talhões das modalidades B₂ e C₂ apresentavam uma melhoria nítida sobre os das modalidades B₁ e C₁. Em relação às testemunhas, o ataque era particularmente notável nos talhões 9 e 13, onde, em consequência da doença, as plantas haviam sido destruídas quase totalmente, assistindo-se a nova rebentação em cerca de 90 % de área do talhão n.º 9 e de 100 % no talhão n.º 13!

O 2.º corte foi executado a 25 de Fevereiro e dois dias depois realizaram-se os tratamentos A₁, B₁ e C₁, sob bom tempo; em 11 de Março efectuaram-se os tratamentos A₂, B₂ e C₂, os quais foram seguidos de fortes aguaceiros passadas 6 horas.

A 3.^a amostragem realizou-se em 21 de Março, notando-se de uma maneira geral melhor aspecto sanitário do que na altura do 1.º corte e, facto curioso, pareceu-nos existir desta vez ligeira melhoria das modalidades B₁ e C₁ sobre as B₂ e C₂, ao contrário do que havíamos notado antes de efectuarmos o corte anterior.

O 3.º corte foi executado no dia 24 de Março; por causa do mau tempo, só foi possível cumprir as modalidades A₁, B₁ e C₁ em 28 daquele mês e os segundos tratamentos tiveram lugar em 8 de Abril, já sob bom tempo.

A 4.^a colheita de amostras foi efectuada em 26 de Abril, pouco mais de um mês sobre a anterior. Vale a pena salientar que, desta vez, se havia acentuado de maneira notável, o melhor aspecto dos talhões tratados com os fungicidas após o corte, do que os pulve-

rizados 17 dias depois. De tal maneira estas diferenças eram nítidas, que nos foi fácil estabelecer *in loco* e globalmente, a seguinte classificação (por ordem decrescente de eficácia das modalidades ensaiadas) :

- 1.^a — B₁ (Bordalesa após o corte)
- 2.^a — C₁ («Captane» após o corte)
- 3.^a — B₂ (Bordalesa 2 semanas após o corte)
- 4.^a — C₂ («Captane» 2 semanas após o corte)

Os talhões das modalidades testemunhas apresentavam-se semelhantes, ostentando porém razoável aspecto vegetativo os talhões n.ºs 15 (A₁) e 17 (A₂), embora com menor porte e uma coloração mais amarelada que os tratados.

No dia 27 de Abril e antes de efectuarmos o 4.º corte, tirámos algumas fotografias (figs. 34 a 39), através das quais procurámos registar para cada modalidade, as diferenças mais salientes no que respeita ao porte, densidade da cultura e grossura dos caules das plantas situadas nos talhões tratados sobre as dos talhões testemunhas correspondentes. Claro está que estes aspectos não deixaram de se fazer sentir nas produções, conforme se pode observar no Quadro 49.

O 4.º corte foi executado no dia 28 de Abril e só no dia 2 de Maio conseguimos efectuar as modalidades A₁, B₁ e C₁, em virtude das chuvas contínuas que, entretanto, ocorreram. No dia 14 de Maio e, portanto, 16 dias após o corte, procedemos à realização das modalidades A₂, B₂ e C₂. Vale a pena referir que, depois de efectuarmos as modalidades A₂ e C₂, surgiu um aguaceiro com certa intensidade; logo que terminou, cumprimos a modalidade B₂ e durante todo o dia o tempo foi esplêndido; nos dias seguintes continuou o mau tempo.

Em 24 de Maio teve lugar a 5.^a amostragem e, enquanto que por altura dos cortes anteriores o estado sanitário do nosso campo de ensaio era nitidamente superior ao do campo de bersim circundante da exploração do I. S. A., desta vez verificou-se o contrário. Contudo, o facto tem explicação pois, de maneira geral, os talhões do nosso ensaio têm apresentado uma maior densidade de plantas que a restante área cultivada de bersim. Isto deve-se, certamente, à circunstância de os talhões testemunhas, enquadrados por talhões tratados, terem contraído menor grau de ataque do que o campo vizinho. Por outro lado, temos notado sem sombra de dúvida que, sendo a humidade

elevada, o ataque de *A. caulivorum* é tanto mais de temer, quanto maior for a densidade com que a cultura se apresenta. Desta maneira, os tratamentos efectuados no período que decorreu entre o 4.º corte e a 5.ª amostragem foram realizados, como já vimos, sob intensas chuvas que, praticamente, devem ter inutilizado a protecção pretendida. Sendo assim, a maior pujança dos nossos talhões foi, afinal, a causa da maior susceptibilidade verificada, embora as produções do 5.º corte não se tivessem ressentido grandemente relativamente ao anterior, dado que o ataque se desenvolveu já um tanto tardiamente. Na verdade, a análise do Quadro 49, permite verificar que no 5.º corte, a produção (expressa em kg/10 m²) na modalidade B₁ foi menor (- 1,93 kg), mas não devemos esquecer que, por altura do 4.º corte, os talhões desta modalidade eram os mais exuberantes; na B₂ já foi ligeiramente maior (+ 0,58 kg.), e sensivelmente a mesma para a modalidade C₁. Além disso, foi pouco inferior na C₂ (- 1,03 kg) mas foram já nitidamente menores nas modalidades testemunhas (- 1,87 na A₁ e - 2,33 kg na A₂). Quer dizer, apesar das condições adversas da aplicação dos tratamentos, o balanço não deixa de ser favorável ao emprego dos fungicidas.

O 5.º corte foi executado em 24 de Maio e as modalidades A₁, B₁ e C₁ foram efectuadas no dia seguinte; em 7 de Junho procedemos à realização das modalidades A₂, B₂ e C₂, sob tempo ventoso e algo nublado, mas sem denunciar chuva.

A 6.ª colheita de amostras teve lugar em 24 de Junho e o corte correspondente no dia seguinte, findo o qual considerámos o ensaio terminado, uma vez que o bersim se encontrava em plena floração e o tempo quente que se fazia sentir, já não assegurava boas condições à cultura e à doença. Desta maneira, destinou-se o 7.º corte à obtenção de semente.

2.º ENSAIO (Época de 1960-61)

Este ensaio foi efectuado na 3.ª Folha da 1.ª Secção do I. S. A., que anteriormente havia sido cultivada de milho. Em 28 de Novembro de 1960, o terreno sofreu uma lavoura com charrua singeleira e, em virtude das fortes chuvadas outonais que se fizeram sentir seguidamente, voltou a ser lavrada em 5 de Dezembro. No mesmo dia supor-

tou uma gradagem com grade portuguesa e, em 14 de Janeiro de 1961, a mesma operação foi também realizada com grades Greiner. Depois, procedeu-se à sementeira do bersim a lanço, à razão de 50 kg/ha, com sementes da exploração do I. S. A., tendo-se feito a cobertura da semente com três corpos de grades Greiner.

A configuração e orientação do campo foram semelhantes às do ensaio anterior e a distribuição dos talhões pelas modalidades foi a seguinte:

Modalidade B ₁ —	Talhões 1, 9 e 18
» B ₂ —	» 2, 10 e 17
» C ₁ —	» 4, 6 e 13
» C ₂ —	» 5, 12 e 14
» A ₁ —	» 8, 11 e 15
» A ₂ —	» 3, 7 e 16

Atendendo à época tardia a que só foi possível efectuar a sementeira do bersim, a 1.^a amostragem teve lugar apenas em 27 de Março de 1961 e as amostras revelaram a presença da doença com carácter benigno pois, praticamente, todas as plantas doentes observadas pertenciam à classe 1 (Quadro 49).

Em 28 de Março procedemos ao 1.^o corte e, no mesmo dia, executámos as modalidades A₁, B₁ e C₁; em 14 de Abril tiveram lugar as modalidades A₂, B₂ e C₂.

A 2.^a colheita de amostras efectuou-se em 27 de Abril, cerca de um mês depois do 1.^o corte e, desta vez, observou-se já um ataque mais forte, mas ainda sem carácter alarmante, conforme se pode deduzir a partir do Quadro 49. Nesta mesma data foi executado o 2.^o corte e tiveram lugar as modalidades A₁, B₁ e C₁; as A₂, B₂ e C₂ foram levadas a cabo em 11 de Maio.

A 3.^a amostragem foi realizada em 18 de Maio e, entretanto, houve necessidade de proceder a uma rega do bersim por aspersão, em virtude da prolongada seca que se fazia sentir. Desta maneira, houve desfavoráveis condições atmosféricas para o parasita, que conduziram a uma regressão da doença, conforme se pode observar no Quadro 49.

O 3.^o corte foi realizado em 19 de Maio. Em consequência de uma distribuição deficiente dos aspersores durante aquela rega, houve talhões que foram melhor regados que outros, o que não deixou de

afectar a produção dos mesmos. Assim, foram nitidamente prejudicados os talhões n.ºs 5, 11, 12, 15 e 17.

Em 21 de Maio a cultura sofreu nova rega por aspersão e, no dia seguinte, procedemos então à realização das modalidades A₁, B₁ e C₁; em 2 de Junho efectuámos as A₂, B₂ e C₂.

A 4.ª colheita de amostras foi realizada em 16 de Junho, tendo subido apreciavelmente, de uma maneira geral, o grau de ataque registado por ocasião da 3.ª amostragem (Quadro 49). Nesta altura notava-se um apreciável ataque de oídio (*Oidium erysiphoides* Fr.) e estava já generalizada a floração da cultura.

O 4.º corte foi efectuado também naquele dia, assim como as modalidades A₁, B₁ e C₁; em 30 de Junho procedemos à realização das A₂, B₂ e C₂.

A 5.ª amostragem foi efectuada em 11 de Julho, notando-se agora, globalmente, um ligeiro recrudescimento da doença (Quadro 49). De novo a cultura se encontrava em floração e intensificara-se o ataque de oídio que, desta vez, veio acompanhado por uma não menos severa micose, a ferrugem *Uromyces trifolii* (Hedw. f.) Lév.

O 5.º corte foi efectuado em 13 de Julho e, nesta altura, deu-se por findo o ensaio, destinando-se o 6.º e último corte à obtenção de semente.

3.º ENSAIO (Época de 1961-62)

Foi realizado na 3.ª Folha da 8.ª Secção, a qual na época anterior havia sido cultivada de trigos. O terreno foi lavrado com charrua singeleira em meados de Outubro de 1961 e, em 14 de Novembro, fez-se uma gradagem com grades Greiner; no mesmo dia, teve lugar a sementeira do bersim a lanço, à razão de 50 kg/ha, sendo a cobertura da semente feita com dois corpos de grades Greiner. As sementes utilizadas resultaram de um lote constituído por sementes da exploração do I. S. A. e de uma aquisição no comércio.

Em virtude de o bersim ter nascido muito irregularmente, fomos obrigados a instalar o ensaio desta campanha em dois blocos, dispondo-se um deles com a mesma orientação dos ensaios anteriores, enquanto o outro bloco seguiu uma orientação perpendicular, correspondente ao lado do campo exposto a Norte, por ser nestas zonas que a cultura surgiu um tanto mais homogénea.

Não obstante e porque receávamos que isso não fosse suficiente, resolvemos constituir em cada bloco 12 talhões, cuja distribuição pelas modalidades foi a seguinte:

Modalidade B ₁ —	Talhões 2, 9, 18 e 22
» B ₂ —	» 3, 12, 17 e 19
» C ₁ —	» 1, 7, 15 e 23
» C ₂ —	» 6, 10, 16 e 24
» A ₁ —	» 5, 8, 13 e 20
» A ₂ —	» 4, 11, 14 e 21

A 1.^a colheita de amostras teve lugar em 12 de Fevereiro de 1962. Conforme se pode verificar no Quadro 49 a doença já se manifestava mas com um carácter muito benigno, dado que predominavam plantas sãs; embora existissem nas amostras de todos os talhões algumas plantas da classe 1, só em cerca de 50 % dos talhões as amostras revelaram raros indivíduos com o grau de ataque 2.

O 1.^o corte foi efectuado nesta mesma data e, no dia seguinte, procedeu-se à realização das modalidades A₁, B₁ e C₁; em 27 de Fevereiro, tiveram lugar as modalidades A₂, B₂ e C₂.

A 2.^a colheita de amostras efectuou-se em 23 de Março e veio revelar (Quadro 49) que o estado sanitário da cultura havia melhorado.

O 2.^o corte foi executado em 24 de Março e, no mesmo dia, procedemos à aplicação das modalidades A₁, B₁ e C₁; no dia 7 de Abril tiveram lugar as A₂, B₂ e C₂. A partir deste corte, predominaram condições de estiagem, o que teve como efeito que os talhões n.^{os} 1 a 12, situados no bloco poente, em que a humidade do solo era maior, tivessem adquirido maior pujança que os restantes talhões instalados no outro bloco.

Durante o período que decorreu entre o 1.^o corte e a 2.^a colheita de amostras, deparou-se-nos um ligeiro ataque de *Sminthurus viridis* (L.), (*Collembola, Sminthuridae*) à cultura do bersim. Já havíamos encontrado pela primeira vez, em Abril de 1958, este insecto (fig. 33), quando infestava fortemente aquela cultura, também na Tapada da Ajuda. Voltámos a encontrá-lo, sem grande gravidade, por altura da 2.^a amostragem efectuada no campo de ensaio das Silveiras (Janeiro de 1960), mas quando procedemos à 3.^a colheita, deparámos já com uma tremenda infestação que coincidiu com o maior ataque de *A. caulivorum* registado nesse ensaio. Nessa altura, conseguimos combater

eficazmente a praga aplicando uma calda a baixo volume, de um concentrado emulsionável de malatião com 50 % de m. a., a 0,6 %, logo a seguir ao corte, por meio de um atomizador de dorso trabalhando com o débito de 200 l/hectare. Aquele insecticida é, entre todos os susceptíveis de serem aplicados em forragens, o menos tóxico (FREAR, 1959).

GAMA (1961) assinala aquele insecto no Jardim do Museu Zoológico de Coimbra, mas sem qualquer referência a hospedeiros. Ficámos a dever àquela autora, o seu valioso apoio na identificação da referida espécie, que igualmente nos informou não ter conhecimento de que alguém mais a tivesse registado em Portugal. Conforme tivemos também ocasião de verificar, a *S. viridis* ataca também *Vicia* sp., luzerna e trevo da Pérsia, embora não tão acentuadamente como o bersim. Em qualquer destas culturas e quando a infestação é grande, os tecidos tornam-se mais tarde necróticos e tomam uma coloração acastanhada que, de longe, faz lembrar um ataque de *A. caulivorum*.

A 3.^a amostragem (Quadro 49) foi realizada em 2 de Maio e revelou, tal como esperávamos, um carácter ligeiramente mais benigno da doença que o anterior, com excepção para o talhão n.º 11 (modalidade A₂), onde o grau de ataque foi acentuadamente mais grave.

O 3.º corte foi efectuado em 4 de Maio, assim como as modalidades A₁, B₁ e C₁; no dia 18 do mesmo mês, tiveram lugar as A₂, B₂ e C₂.

A 4.^a colheita de amostras foi executada em 5 de Junho e veio mostrar que, perante as condições de estiagem existentes anteriormente, a cultura apresentava-se praticamente sã (Quadro 49), mas num estado de grande depauperamento conjugado com a existência de uma floração generalizada. Desta maneira, nada mais havia a fazer senão dar por findo o ensaio, ao procedermos ao 4.º corte em 5 de Junho de 1962. Pelas razões apontadas, também a *S. viridis* deixara de se manifestar, o que parece estar de acordo com BONNEMAISSON (1961), que refere ser o insecto muito sensível à secura.

4.º ENSAIO (Época de 1962-63)

Este ensaio teve lugar na 2.^a Folha da 9.^a Secção, a qual na época de 1961-62 havia sido cultivada de gramíneas. O terreno foi lavrado com charrua singeleira em 8 de Outubro de 1962 e, no dia 19 do mesmo mês, sofreu uma gradagem com grade portuguesa

seguida de outra com grades Greiner. Ainda neste último dia teve lugar a sementeira do bersim, feita a lanço, à razão de 60 kg/ha, sendo as sementes provenientes da exploração do I. S. A.; a cobertura das mesmas foi efectuada com grades Greiner.

A configuração e orientação deste ensaio foram semelhantes às dos dois primeiros e a distribuição dos talhões pelas modalidades foi a seguinte:

Modalidade B ₁	—	Talhões 4, 7 e 14
»	B ₂	» 6, 12 e 16
»	C ₁	» 1, 11 e 15
»	C ₂	» 2, 8 e 13
»	A ₁	» 3, 9 e 17
»	A ₂	» 5, 10 e 18

A 1.^a amostragem teve lugar em 15 de Janeiro de 1963 e mostrou que a doença surgiu com um carácter muito incipiente (Quadro 49), dado que sòmente apareceu nas amostras dos talhões n.ºs 7, 13 e 16 com, respectivamente, uma, duas e uma plantas atacadas, todas com a classe de ataque 1.

O 1.º corte foi executado logo no dia 16, assim como as modalidades A₁, B₁ e C₁; a 30 do mesmo mês procedemos à realização das A₂, B₂ e C₂.

A 2.^a colheita de amostras foi efectuada no dia 1 de Março de 1963, isto é, cerca de mês e meio após o 1.º corte e revelou existir já um ataque bastante disseminado, mas ainda sem grande reflexo na produção, uma vez que a grande maioria das plantas doentes pertencia à classe 1 (Quadro 49). Por outro lado, apenas as amostras correspondentes a 11 talhões apresentavam algumas plantas com a classe 2 e sòmente em relação ao talhão n.º 9 (modalidade A₁) tinham aparecido 3 plantas da classe 3.

O 2.º corte foi realizado no dia 2 de Março e, dois dias depois, efectuaram-se os tratamentos A₁, B₁ e C₁; a 18 de Março tiveram lugar as modalidades A₂, B₂ e C₂.

A 3.^a amostragem foi executada a 29 de Março e, em face do Quadro 49, verifica-se que, relativamente à 2.^a colheita de amostras, houve um ligeiro recrudescimento da doença, dado que aquelas em 50 % dos talhões revelaram a existência de plantas pertencentes à classe 3. De salientar ainda, a existência de um forte ataque da colêmbola *S. viridis*.

O 3.º corte foi efectuado no dia 1 de Abril e as modalidades A₁, B₁ e C₁ e A₂, B₂ e C₂ foram realizadas, respectivamente, a 2 e 17 do mesmo mês.

No dia 7 de Maio procedemos à 4.ª colheita de amostras, que revelou existir uma considerável diminuição no número de plantas sãs e um ligeiro aumento de plantas da classe 3, relativamente à amostragem anterior. Em resumo, podemos dizer que, neste ensaio e até à data, foi agora que a doença manifestou maior infecciosidade. Por outro lado, mantinha-se ainda a infestação da colêmbola já referida, mas agora com carácter benigno.

O 4.º corte foi também executado naquele dia, assim como as modalidades A₁, B₁ e C₁; em 21 de Maio, procedemos à aplicação das A₂, B₂ e C₂.

A 5.ª amostragem teve lugar em 11 de Junho e, tal como o Quadro 49 indica, assiste-se de uma maneira geral a um substancial aumento de plantas sãs relativamente ao período anterior, sobretudo nos talhões tratados com fungicidas.

O 5.º corte foi realizado em 14 de Junho e por nesta data a cultura se apresentar com uma floração generalizada e num estado que fazia prever curta vida, resolvemos dar como findo o ensaio e reservar o 6.º corte para obtenção de semente. Nesta altura, a infestação da *S. viridis* era já insignificante.

Conforme deixámos já transparecer, ao relacionarmos o recrudescimento do *A. caulivorum* com a presença de uma importante infestação daquela colêmbola, cedo se arreigou em nós a suspeita de que o insecto pudesse actuar como vector da doença. Desta maneira, procurámos provar esta hipótese mediante a inoculação de plantas de bersim envasadas com insectos portadores de conídios do fungo. Infelizmente, no ano de 1961 a praga não surgiu e em 1962 teve apenas uma aparição esporádica, não nos permitindo obter material em quantidade suficiente para procedermos aos ensaios previstos.

Sòmente na primavera de 1963 nos foi possível tentar a inoculação, mas a afinação da técnica coincidiu com a falta de insectos. Contudo, ainda conseguimos infectar algumas plantas, mas o pequeno número alcançado (apenas 3) e o facto de a época avançada não nos ter permitido repetir as nossas experiências, leva-nos a referir o caso sob reserva. Por outro lado, conseguimos observar conídios agarrados aos pelos das patas do insecto e, o que é ainda mais

curioso, notámos que os excrementos do *S. viridis* surgiam frequentemente sobre as necroses das plantas provocadas pelo *A. caulivorum*; tal era o aspecto, que a princípio e macroscopicamente fomos levados a suspeitar que se trataria de alguma frutificação do fungo. Porém, o exame microscópico dos excrementos veio revelar que estes continham verdadeiras massas de conídios de *A. caulivorum*. Isto parece evidenciar que o *S. viridis* poderá também alimentar-se de esporos, o que está de acordo com ESSIG (1942), quando refere que na Ordem *Collembola* existem algumas espécies que têm esse hábito alimentar, ou então, que os excrementos estimulam a formação local de conídios nas necroses. De qualquer maneira, esperamos esclarecer este assunto logo que nos seja possível.

Tivemos ainda ocasião de registar a infestação da cultura do bersim por duas espécies de afídeos, o *Aphis craccivora* Koch e o *Acyrtosiphon pisum* Harris, cuja identificação ficámos a dever ao Ex.^{mo} Eng.^o Agr.^o Fernando Ilharco. Estes insectos surgiram sempre com um carácter bastante benigno.

A₂) Resultados e análise estatística

Para a avaliação de efeitos dos tratamentos sobre o grau de ataque de *A. caulivorum* em bersim, a interpretação estatística (*) dos ensaios de campo realizados de 1959 a 1963, que acabámos de descrever, foi apoiada nas contagens de plantas efectuadas antes de cada corte e tomando em conta as classes de ataque, já definidas anteriormente. Contudo, tendo-se convencionado agrupar as classes (1 + 2) e (3 + 4) que poderemos designar, respectivamente por plantas «atacadas» e «muito atacadas», a análise foi feita ano a ano e no conjunto de anos principalmente em relação às plantas que possuíam menor grau de ataque (1 + 2). No que respeita à produção de matéria verde, os cálculos tiveram como base, os valores contidos no Quadro 49.

a) Ensaio de 1959-60

Atendendo a que o ano agrícola de 1959-60 foi, sem dúvida alguma, aquele que se revestiu da maior importância, dado o facto

(*) Agradecemos ao Ex.^{mo} Eng.^o Agr.^o Augusto José de Oliveira a valiosa colaboração na análise estatística dos presentes ensaios.

de nele ter ocorrido a máxima virulência do *A. caulivorum* registada ao longo dos quatro ensaios, apresentamos no Quadro 43 a título exemplificativo, os resultados obtidos para o 3.º corte.

QUADRO 43

Resultados obtidos em 1959/60, no 3.º corte do bersim relativos à produção e ao grau de ataque (classes 1+2)

(Tapada da Ajuda, Lisboa)

Altura de aplicação	C. Bordal.		«Captane»		Total	Testemunhas	
	Prod.	% (a)	Prod.	% (a)		Prod.	Prod.
Após o corte	8,33	61,2	9,28	71,7	66,94-435,9	8,10	31,3
	12,91	63,1	8,26	84,6		5,95	74,6
	14,77	69,3	13,39	86,0		8,33	68,6
	36,01	193,6	30,93	242,3		22,38	174,5
2 semanas após o corte	11,15	59,0	10,87	50,6	63,99-388,0	7,93	59,7
	10,08	77,2	10,38	60,1		6,80	72,9
	10,60	70,0	10,91	71,1		8,33	68,3
	31,83	206,2	32,16	181,8		23,06	200,9
Totais	67,84	399,8	63,09	424,1	130,93-823,9	45,44	375,4

(a) — Média de duas unidades de amostragem.

A análise de variância dos dados respeitantes à produção obtida também no 3.º corte, figura no Quadro 44.

QUADRO 44

Análise de variância dos resultados da produção do 3.º corte de bersim (ensaio de 1959/60)

	g.l.	Soma de quadrados	Quadrado médio
Test/Trat. efectivos	1	44,56	44,56 (**)
Entre Fungicidas (F)	1	1,88	1,88
Entre Elocas (E)	1	0,72	0,72
Interação F×E	1	2,44	2,44
Testemunhas	1	0,08	0,08
Erro experimental	12	42,17	3,51
Total geral	17	91,85	—

(**) — Ensaio altamente significativo.

O Quadro 44 permite concluir que apesar do número restrito de graus de liberdade para «Erro experimental», o ensaio acusa diferença altamente significativa, quanto à produção de matéria verde, entre as testemunhas e os tratamentos com os fungicidas que, por sua vez, não diferem entre si, assim como os restantes efeitos.

Estas conclusões mantêm-se, praticamente, para os casos dos restantes cortes.

No que respeita aos dados relativos ao número de plantas atacadas (1 + 2), a análise de variância feita após a transformação angular mostrou que não existe diferença significativa entre as testemunhas e os tratamentos efectivos; as restantes comparações também não atingiram o nível de significância.

Idênticas conclusões foram obtidas nos casos dos restantes cortes, ou com os dados do índice de maior ataque (3 + 4).

b) *Apreciação individual das experiências efectuadas (1959 a 1963)*

A análise estatística corte a corte e por ensaio e por ensaio anual, dos resultados das contagens sobre o «número de plantas», não revelou qualquer diferença significativa para os diversos efeitos (primários e interacções).

Para o estudo de efeitos dos tratamentos sobre o grau de ataque

QUADRO 45

Análise de variância dos resultados não transformados, quanto ao grau de ataque verificado no 3.º corte (índices 1+2) dos quatro ensaios

(em percentagem)

Origem da variação	g.l. (a)	Quadrados médios			
		1959/60	1960/61	1961/62 (a)	1962/63
Test. vs tratamentos	1	298,09	0,01	38,76	601,47
Entre Fungicidas (F)	1	98,01	21,47	71,40	250,26
Entre Épocas (E)	1	384,80	0,22	43,24	27,95
Interação F×E	1	891,82	1,17	13,26	0,05
Testemunhas	1	233,20	0,21	100,50	288,12
Erro Experimental	12	289,07	8,49	59,83	225,95
Erro de amostragem	18	177,55	7,81	19,64	189,72

(a) — O ensaio de 1961/62 incluiu 4 repetições.

do *A. caulivorum*, adoptou-se o princípio de apreciar estatisticamente para cada ensaio, os dados do 3.º corte, sem se recorrer à transformação angular dos valores das respectivas percentagens, por se entender desnecessária, dado o género de conclusões gerais a tirar.

Os resultados da análise de variância obtidos para cada ano figuram sinópticamente no Quadro 45.

Conforme se pode observar no Quadro 45, em qualquer dos anos nenhum dos efeitos se revelou significativo no 3.º corte. Contudo, no ensaio de 1962-63, a diferença entre as testemunhas e os tratamentos está muito próxima da significância.

Por outro lado, a simples observação crítica dos valores médios das percentagens de ataque que figuram no Quadro 49, leva-nos a concluir que aquelas indicações se mantêm para os outros cortes, até mesmo para as plantas mais atacadas (3 + 4).

QUADRO 46

Valores médios, em kg/10 m², da produção total de bersim nos ensaios realizados na Tapada da Ajuda

Épocas de aplicação	Anos Agrícolas	Bordalesa	«Captane»	Médias	Testemunhas
Após o corte	1959/60	55,1	46,4	50,8	40,3
	1960/61	72,0	73,1	72,6	64,0
	1961/62	63,6	65,2	64,4	65,7
	1962/63	76,3	74,6	75,6	83,0
	Média	66,5	64,9	65,7	63,5
2 semanas após o corte	1959/60	48,2	45,7	47,0	42,4
	1960/61	70,8	62,6	66,8	74,8
	1961/62	62,7	67,4	65,0	62,9
	1962/63	80,7	74,8	77,3	76,9
	Média	65,4	63,0	64,2	64,1
Médias	1959/60	51,7	46,1	48,9	41,4
	1960/61	71,5	67,9	69,7	69,5
	1961/62	63,1	66,3	64,7	64,3
	1962/63	78,6	74,8	76,7	80,1
	Média	66,0	64,0	65,0	63,8

Nota -- Médias de 3 repetições (de 4 repetições, em 1961/62).

No que respeita à «produção total» da matéria verde (com excepção do 1.º corte) colhida em cada ano agrícola, apresentamos no Quadro 46 os valores médios obtidos, os quais permitem ainda avaliar, *grosso modo*, o efeito dos fungicidas nas modalidades ensaiadas (após o corte e duas semanas depois), em face das testemunhas.

No Quadro 47 figura a análise de variância dos resultados da produção total de matéria verde, para os ensaios efectuados de 1959 a 1963.

QUADRO 47

Análise de variância dos resultados da produção total de m.v. (kg/10 m²) dos ensaios efectuados em 1959-63

Origem da variação	g.l. (a)	Quadrados médios			
		1959/60 (b)	1960/61	1961/62 (a)	1962/63
Test./Tratamentos	1	226,75	0,22	0,94	45,12
Entre Fungicidas (F)	1	92,57 (c)	37,45	39,44 (*)	44,47
Entre Épocas (E)	1	43,13	102,08	1,76	15,64
Interação F×E	1	27,94	64,41	9,21	13,86
Testemunhas	1	6,68	172,80	15,99	57,04
Erro Experimental	12	123,76	74,47	7,64	31,72

(a) — O ensaio de 1961/62 incluiu 4 repetições.

(b) — O elevado erro experimental é devido à inclusão da produção do 6.º corte.

(c) — A comparação quase atinge o nível de significância, quando se exclui a produção do 6.º corte.

(*) — Ensaio significativo.

Pelo que é dado observar no Quadro 47, em geral os ensaios não acusam efeitos significativos. Contudo, se excluirmos a produção do 6.º corte que no ano agrícola de 1959-60 apresenta grande variabilidade entre as repetições, o erro experimental baixa para menos de metade, pelo que a diferença entre as modalidades Calda Bordalesa e Testemunhas ou entre aquela calda e o «Captane», quase atinge o nível de significância. Também no caso do ensaio de 1961-62, naturalmente só porque houve então 4 e não 3 repetições, já foi possível eliminar do erro experimental, a variação associada à diferença entre repetições e, desta maneira, o ensaio já foi significativo.

c) *Análise conjunta da produção dos 4 anos de ensaios (1959-63)*

Na primeira tentativa de análise estatística conjunta (Quadro 48), não se recorreu a qualquer transformação dos dados que tornasse realmente válido tal estudo, uma vez que as produções finais não diferiam fortemente de ano para ano. Na discriminação dos graus de liberdade para «Anos», adoptou-se, em face duma apreciação agronómica dos anos agrícolas, o seguinte esquema ortogonal de coeficientes:

g.l.	1959/60 (*)	1960/61 (**)	1961/62 (**)	1962/63 (**)
1	- 3	+ 1	+ 1	+ 1
1	0	- 1	- 1	+ 2
1	0	- 1	+ 1	0

No Quadro 48 figuram os resultados da análise de variância conjunta, no qual foram discriminados apenas os casos mais frisantes. Note-se que, para simplificar os cálculos, no ano de 1961-62 usaram-se apenas três repetições.

QUADRO 48

Análise de variância da produção total dos 4 ensaios realizados em 1959-63 na Tapada da Ajuda

(3 repetições)

Origem da variação	g.l.	Quadrados médios
Entre «Anos»	3	10 043,72
1/(2, 3, 4)	1	6 740,20 **
(2, 3)/4	1	2 233,14 **
2/3	1	1 070,38 **
Entre «Modalidades»	5	140,60
Test./Tratamentos	1	30,61
Fungicidas (F)	1	66,27
Epcas (E)	1	37,81
Interacção F×E	1	4,69
Testemunha	1	1,22

QUADRO 48 (Continuação)

Origem da variação	g.l.	Quadrados médios
Interação «Anos»×Modalid.	15	890,17
(Test./Trat.)/(1/2, 3, 4)	1	200,08 (b)
Fungicidas/(1/(2, 3, 4)	1	40,96
Restante	3	25,12
(Test./Trat.)/(2, 3)/4)	1	43,74
Fungicidas/(2, 3)/4)	1	29,65
Restante	3	45,07
(Test./Trat.)/(2/3)	1	1,68
Fungicidas/(2, 3)	1	74,91
Restante	3	96,19
Erro experimental	46 (a)	— 61,59 (b)

(a) — No ensaio de 1961/62 descontaram-se 2 g.l. para repetições.

(b) — Excluindo o caso da produção errática do 6.º corte, de 1959/60, esta comparação é significativa.

Como conclusão geral, infere-se imediatamente que os anos diferem entre si. Contudo, as modalidades — na média de todos os anos incluídos nos ensaios — não acusam diferenças significativas, o que era de prever, dado que apenas no 1.º ano (1959-60), a doença surgiu com carácter grave.

Na parte que mais interessa considerar, o do comportamento diferenciado, nota-se no Quadro 48 que quando se faz o confronto entre o ano de 1959-60 e os restantes, a comparação «Testemunhas/Tratamentos» é significativa, se excluirmos a produção do 6.º corte que, como já vimos, foi grandemente responsável pelo elevado erro experimental verificado. Atendendo a que foi justamente o ano de 1959-60 aquele em que verdadeiramente a doença assumiu aspectos gravíssimos, tal facto ainda atesta melhor a notável acção dos fungicidas aplicados, se considerarmos que os ensaios foram conduzidos em moldes pouco sensíveis.

Numa segunda fase, usou-se a transformação logarítmica dos dados individuais da produção total que conduziu à homogeneidade das variâncias dos erros experimentais dos ensaios repetidos anualmente. A respectiva análise de variância mostrou que as conclusões se mantinham sensivelmente as mesmas.

A₃) *Discussão dos resultados da análise estatística*

Conforme referimos por várias vezes, dos quatro ensaios, coube ao de 1959-60 a maior importância, em virtude de o *A. caulivorum* ter sido favorecido por excepcionais condições meteorológicas. Este facto levou a incidir a análise estatística mais detalhadamente sobre os dados correspondentes, embora se procurasse sempre estudar os aspectos dignos do maior interesse em todos os ensaios efectuados. Desta maneira, importa desde já salientar que para a referida experiência e não obstante se ter verificado um erro experimental um tanto elevado, o ensaio acusa diferença significativa quanto à produção de matéria verde, entre os tratamentos com fungicidas e as testemunhas. Por sua vez, estes não diferem entre si, quando se procura avaliar os seus efeitos relativamente ao grau de ataque de *A. caulivorum*, em face do número de plantas atacadas (classes 1 + 2), embora idênticas conclusões se tenham verificado com os dados correspondentes às plantas muito atacadas (3 + 4).

É evidente que se houve notável aumento de produção de forragem com os talhões tratados com fungicidas relativamente aos talhões testemunhas, tal facto nunca poderá ter outra explicação, a não ser a protecção conferida pelos tratamentos contra o parasita. Sendo assim, importa agora esclarecer as razões que não permitiram que a análise estatística tivesse sido, a este respeito, mais concludente. Para já, é fora de dúvida que houve um elevado erro experimental, como consequência de a amostragem ter constado apenas de duas unidades por talhão. Com efeito, na análise de variância feita após transformação angular, para o «3.º corte» do ensaio de 1959-60, por exemplo, os valores obtidos para os quadrados médios associados a erro experimental e erro de amostragem foram, respectivamente, 113,49 (12 g. l.) e 74,54 (18 g. l.). Representando por y a variância correspondente à discrepância experimental e por w a variância associada às $k = 2$ unidades de amostragem tomadas em cada talhão, tem-se (SNEDECOR, secção 10,14):

$$\begin{aligned}w &= 74,54 \\ky + w &= 113,49,\end{aligned}$$

donde resulta que $y = 19,48$; somando as duas partes da variância pelas quais foi distribuído o erro experimental: $y = 19,48$ e $w/k = 74,54 / 2 = 37,27$, obtém-se o valor de 56,75.

Se se passasse a usar 4 unidades de amostragem por talhão, as duas partes de variância seriam então: 19,48 e 18,64, dando por adição 38,12. Por conseguinte, o aumento de rigor a esperar com a duplicação do número de unidades será, em percentagem:

$$\frac{100 (56,75 - 38,12)}{56,75} = 33 \%$$

Quer dizer, uma das causas do elevado erro experimental pode ser associada ao grande erro de amostragem verificado, o que está perfeitamente de acordo com o facto de a doença surgir normalmente às manchas, conforme temos tido ocasião de referir. Por outro lado, teria sido vantajoso utilizar talhões de maior área e mais repetições por ensaio. Assim, no que se refere às repetições, vimos por exemplo, para a produção total (Quadro 47) que quando no ensaio de 1961-62, houve quatro e não três repetições, já foi possível eliminar do erro experimental, a variação associada à diferença entre repetições e, desta maneira, o ensaio já foi significativo.

As razões apontadas permitem também explicar a falta de significância relativamente aos efeitos dos tratamentos sobre o grau de ataque da doença, quando se fez a apreciação das experiências em cada ano. Porém e, uma vez mais, foi notória a acção dos tratamentos no ano agrícola de 1959-60 relativamente à produção total, quando se excluiu a produção do 6.º corte. Com efeito, verifica-se assim que as diferenças entre as modalidades Calda Bordalesa e Testemunhas e Calda Bordalesa e «Captane» estão muito próximas do nível de significância e, neste caso, é lícito admitir a maior eficácia da Calda Bordalesa. Note-se que aquela exclusão é perfeitamente válida, dado que o 5.º corte foi precedido do maior ataque da doença registado durante os quatro anos e o período que antecedeu o 6.º corte foi, por sua vez, caracterizado pela existência de desfavoráveis condições meteorológicas não só para o parasita, como também para a cultura. Pela mesma razão, se verifica que na análise conjunta da produção dos quatro anos de ensaio (1959-63), de novo houve diferença significativa quando se faz o confronto entre o ano de 1959-60 e os restantes, no que respeita à comparação Testemunhas/Tratamentos.

ESTAMPA IX

Figura 33 — *A colêmbola Sminthurus viridis vista lateral e dorsalmente. (Ampliada 20 ×).*

Figura 34 — *Aspecto de um talhão representativo da modalidade calda bordalesa a 1%, após o corte (B₁), quando se executou o 4.º corte, em 1960. Os traços na régua estão distanciados 5 cm uns dos outros e a altura do bersim, tomada desde o nível do corte, até à base da tabuleta, era de 42 cm.*

Figura 35 — *Idem, para a mesma calda na modalidade B, (2 semanas após o corte). O Bersim tinha 40 cm de altura.*

ESTAMPA X

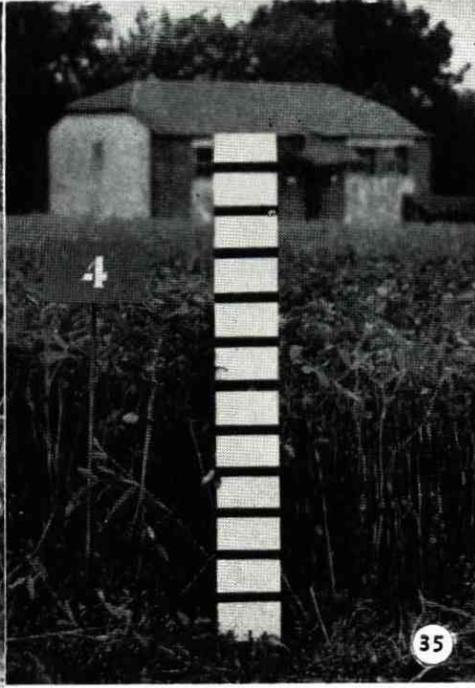
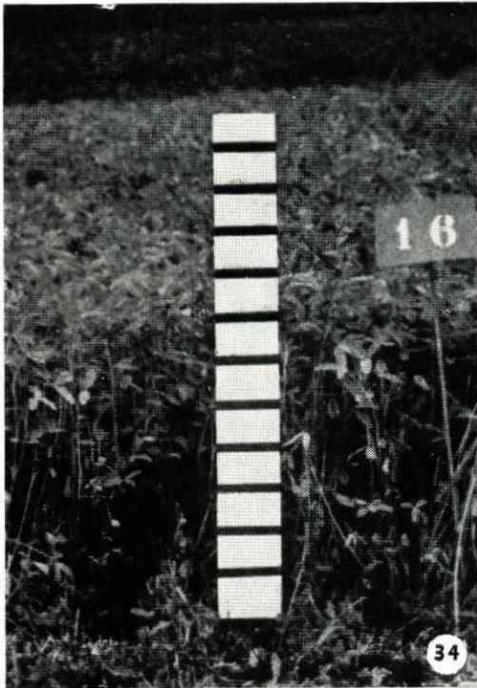
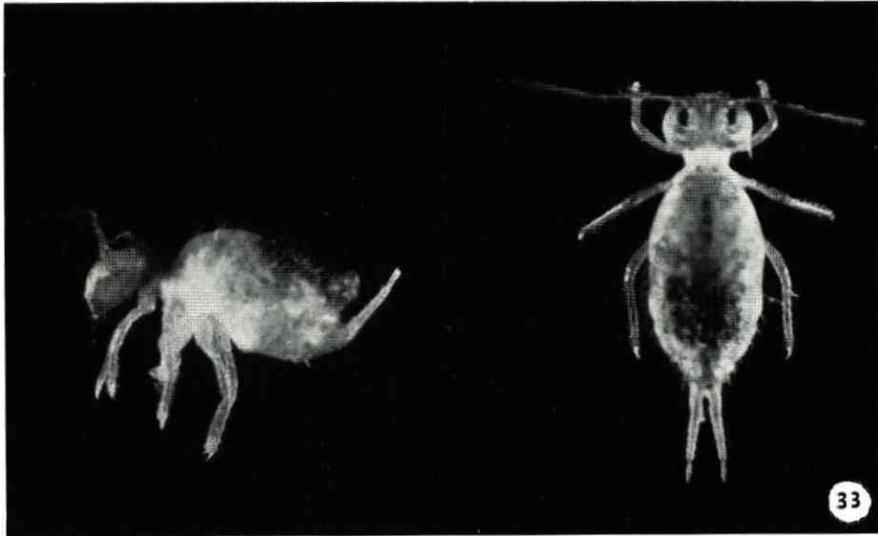
Figura 36 — *Aspecto de um talhão da modalidade C₁ («Captane» a 0,125% de M. A. após o corte). As plantas tinham 32 cm de altura.*

Figura 37 — *Idem, para a modalidade C₂ («Captane» a 0,125% de M. A., 2 semanas após o corte). O bersim tinha, praticamente, a altura anterior.*

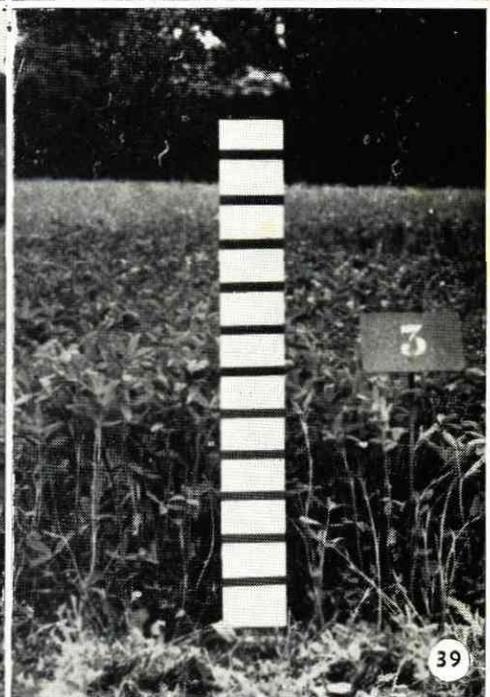
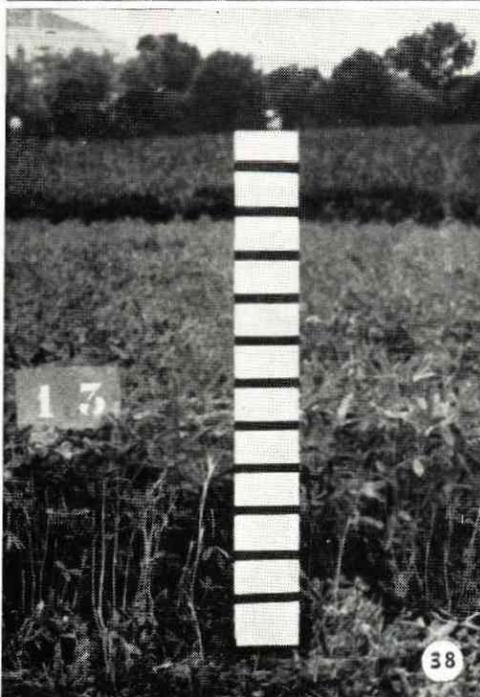
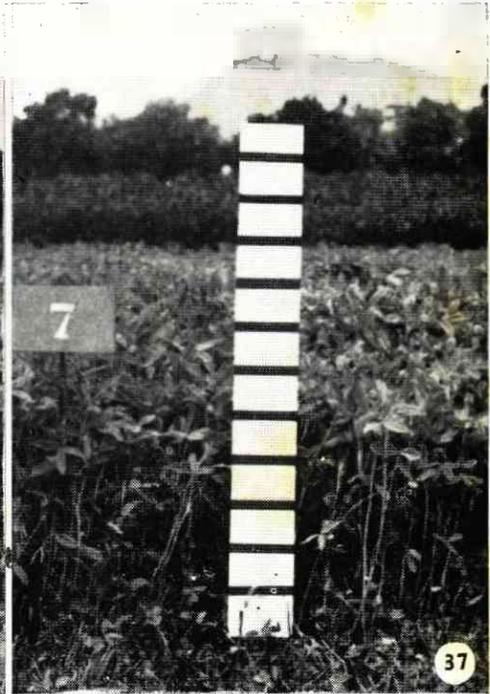
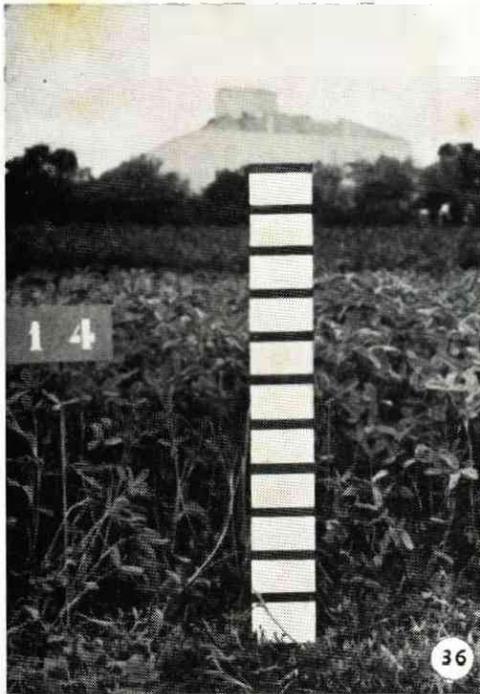
Figura 38 — *Idem, para a modalidade A₁ (pulverização com água após o corte). As plantas tinham cerca de 25 cm de altura.*

Figura 39 — *Idem, para a modalidade A₂ (pulverização com água 2 semanas após o corte). O bersim tinha 30 cm de altura.*

ESTAMPA IX



ESTAMPA X



QUADRO 49

Valores médios do «N.º de Plantas» e «Grau de ataque», por unidade de amostragem e da produção total, por talhão experimental

Modalidades		1959/60 (3 repet.)						1960/61 (3 repet.)					1961/62 (4 repet.)				1962/63 (3 repet.)				
		1.º corte	2.º corte	3.º corte	4.º corte	5.º corte	6.º corte	1.º corte	2.º corte	3.º corte	4.º corte	5.º corte	1.º corte	2.º corte	3.º corte	4.º corte	1.º corte	2.º corte	3.º corte	4.º corte	5.º corte
A ₁	N.º de plantas	32	47	51	44	55	50	33	32	50	51	68	44	40	49	46	40	40	44	38	40
	Ind. (1+2)	2 %	72 %	58 %	54 %	29 %	39 %	9 %	32 %	5 %	14 %	13 %	19 %	4 %	3 %	0 %	0 %	55 %	45 %	91 %	77 %
	Ind. (3+4)	0 %	22 %	41 %	7 %	70 %	0 %	0 %	5 %	0 %	1 %	1 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	0 %	1 %	5 %
	Produção	9,72	8,11	7,46	10,16	8,29	6,31	17,69	19,28	10,63	20,09	14,10	7,72	15,09	13,32	16,87	18,99	19,03	13,63	26,29	24,14
A ₂	N.º de plantas	35	52	49	44	59	50	43	32	48	49	63	43	44	45	43	38	35	53	38	38
	Ind. (1+2)	0 %	75 %	67 %	63 %	21 %	41 %	11 %	21 %	5 %	9 %	13 %	12 %	7 %	8 %	1 %	0 %	63 %	54 %	83 %	85 %
	Ind. (3+4)	0 %	19 %	29 %	8 %	79 %	0 %	0 %	3 %	0 %	0 %	2 %	0 %	0 %	1 %	0 %	0 %	0 %	4 %	8 %	13 %
	Produção	8,06	8,14	7,68	11,01	8,68	6,88	17,98	20,18	15,26	23,73	15,65	8,00	15,01	12,68	13,95	19,27	21,58	12,44	21,67	21,20
B ₁	N.º de plantas	32	48	47	42	62	64	36	32	46	56	67	44	46	53	42	32	35	41	30	42
	Ind. (1+2)	0 %	76 %	65 %	55 %	37 %	36 %	11 %	21 %	4 %	5 %	5 %	22 %	6 %	3 %	0 %	0 %	62 %	39 %	77 %	59 %
	Ind. (3+4)	0 %	9 %	20 %	6 %	64 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	3 %	4 %
	Produção	8,68	9,67	12,00	13,45	11,52	8,43	17,91	18,98	13,67	23,78	15,62	7,50	13,88	12,98	16,50	20,06	18,13	13,03	24,20	20,96
B ₂	N.º de plantas	26	51	55	43	63	59	30	30	47	56	72	44	40	33	46	34	37	43	35	44
	Ind. (1+2)	0 %	65 %	69 %	68 %	29 %	29 %	11 %	49 %	4 %	4 %	9 %	12 %	12 %	7 %	0 %	1 %	49 %	36 %	81 %	34 %
	Ind. (3+4)	0 %	7 %	22 %	6 %	71 %	0 %	0 %	8 %	0 %	0 %	1 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	1 %
	Produção	8,68	10,30	10,61	9,64	10,22	7,46	18,35	18,68	13,94	22,62	15,62	7,58	14,97	11,84	15,81	18,34	21,58	13,57	22,53	23,07
C ₁	N.º de plantas	32	41	45	44	64	53	31	34	46	55	67	42	42	46	44	38	40	46	37	36
	Ind. (1+2)	2 %	74 %	81 %	59 %	29 %	43 %	7 %	23 %	6 %	9 %	6 %	10 %	4 %	1 %	0 %	0 %	61 %	45 %	85 %	70 %
	Ind. (3+4)	0 %	18 %	12 %	6 %	71 %	0 %	0 %	4 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	1 %	5 %
	Produção	6,94	6,06	10,31	11,05	11,00	8,03	18,88	19,87	14,45	24,23	14,61	7,75	15,14	13,98	15,97	19,13	19,46	12,75	22,08	20,33
C ₂	N.º de plantas	37	42	55	39	55	52	31	35	49	66	62	44	42	46	41	37	41	56	43	41
	Ind. (1+2)	0 %	70 %	61 %	59 %	19 %	42 %	11 %	20 %	6 %	6 %	9 %	14 %	7 %	2 %	0 %	1 %	52 %	43 %	83 %	59 %
	Ind. (3+4)	0 %	9 %	34 %	9 %	81 %	0 %	0 %	5 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	0 %	3 %
	Produção	10,07	9,02	10,72	9,83	8,80	7,35	18,18	18,94	11,08	18,77	13,90	7,98	16,26	13,16	16,78	20,65	18,59	12,17	23,39	20,63
C ₁ +C ₂	«Captane»	34	42	50	42	60	52	31	35	48	61	64	43	42	46	42	37	41	51	40	39
	1 %	72 %	72 %	59 %	24 %	43 %	11 %	21 %	6 %	8 %	7 %	12 %	6 %	2 %	0 %	0 %	0 %	57 %	44 %	84 %	64 %
	0 %	13 %	23 %	7 %	76 %	0 %	0 %	4 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	1 %	4 %
	8,51	7,54	10,52	10,44	9,91	7,69	18,53	19,41	12,77	21,51	14,26	7,86	15,70	13,57	16,38	19,91	19,04	12,47	22,77	20,50	
B ₁ +B ₂	Calda Bordalesa	29	49	51	42	62	61	33	31	46	56	70	44	43	43	44	36	36	42	32	43
	0 %	71 %	67 %	62 %	33 %	32 %	9 %	35 %	4 %	4 %	7 %	17 %	9 %	5 %	0 %	1 %	56 %	38 %	79 %	47 %	
	0 %	8 %	21 %	6 %	67 %	0 %	0 %	4 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	2 %	3 %	
	8,68	9,98	11,31	11,54	10,87	7,95	18,14	18,84	13,81	23,21	15,62	7,54	14,43	12,41	16,15	19,22	19,87	13,32	23,39	22,04	
A ₁ +A ₂	Testemunhas	34	49	50	44	57	50	38	32	49	50	66	44	42	47	45	39	37	48	38	39
	1 %	73 %	63 %	58 %	25 %	38 %	10 %	27 %	5 %	12 %	13 %	11 %	5 %	5 %	1 %	0 %	59 %	49 %	87 %	81 %	
	0 %	21 %	35 %	8 %	75 %	0 %	0 %	4 %	0 %	1 %	1 %	0 %	0 %	1 %	0 %	0 %	1 %	2 %	5 %	9 %	
	8,89	8,12	7,58	10,58	8,48	6,60	17,84	19,74	12,95	21,92	14,88	7,86	15,05	13,00	15,41	19,15	20,33	13,05	24,01	22,69	
C ₁ +B ₁	1.ª Aplicação	32	44	46	43	63	58	33	33	46	56	67	43	44	49	43	38	38	44	33	39
	1 %	75 %	73 %	57 %	33 %	40 %	9 %	22 %	5 %	7 %	6 %	16 %	5 %	2 %	0 %	0 %	62 %	42 %	81 %	64 %	
	0 %	14 %	16 %	6 %	67 %	0 %	0 %	2 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	2 %	6 %	
	7,81	7,87	11,16	12,25	11,26	8,23	18,40	19,43	14,06	24,01	15,12	7,62	14,51	13,48	16,24	19,62	18,62	12,91	23,17	20,67	
C ₂ +B ₂	2.ª Aplicação	31	47	55	41	59	55	30	32	48	61	67	44	41	40	43	36	39	50	39	42
	0 %	67 %	65 %	64 %	24 %	36 %	11 %	34 %	5 %	5 %	9 %	13 %	10 %	5 %	0 %	1 %	51 %	40 %	82 %	47 %	
	0 %	8 %	28 %	7 %	76 %	0 %	0 %	6 %	0 %	0 %	1 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	1 %	2 %	
	9,38	9,66	10,66	9,73	9,51	7,41	18,27	18,52	12,51	20,70	14,76	7,78	15,62	12,50	16,29	19,52	20,11	12,88	22,99	21,87	

B) Ensaio em bersim de regadio

1. Na Tapada da Ajuda, com rega por alagamento

O ensaio foi conduzido na 5.^a Fiada da 10.^a secção, em 5 socalcos, onde depois de uma cava, se marcaram 4 talhões em cada, com as dimensões de 4 × 3 m. Seguidamente, o terreno foi nivelado, após o que se procedeu em 6 de Junho de 1960, à sementeira do bersim a lanço, à razão de 40 kg/ha, com sementes de exploração do I. S. A. A cobertura da semente foi feita a ancinho, seguida de alagamento suave, a fim de evitar que, junto às bocas de rega as sementes fossem arrastadas. Posteriormente, a cultura foi regada por alagamento sempre que tal se tornou necessário.

Modalidades — Neste ensaio seguimos exactamente os moldes dos anteriores, isto é, pulverização da Calda Bordalesa neutra a 1 % e de «Captane» a 0,15 % de um pó molhável com 83 % de m. a., aplicados após o corte e duas semanas depois deste e ainda as duas modalidades testemunhas com pulverização de água nas ocasiões já definidas. As seis modalidades foram distribuídas por 18 talhões à sorte, cabendo 3 talhões a cada uma.

Amostragem — Foi efectuada tal como referimos nos ensaios de sequeiro.

Em 21 de Julho, procedemos à 1.^a amostragem a qual revelou que a doença havia surgido com um carácter extremamente benigno. Na verdade, em amostras correspondentes a mais de 50 % dos talhões, não surgiram plantas doentes e as raras que apareceram nos restantes, manifestaram-se apenas por ligeiros «traços» e, portanto, sem qualquer valor económico.

O 1.^o corte foi executado no dia 23 de Julho e, após nova rega, procedeu-se no dia seguinte às modalidades A₁, B₁ e C₁; em 6 de Agosto, tiveram lugar as modalidades A₂, B₂ e C₂.

A 2.^a colheita de amostras efectuou-se em 23 de Agosto e teve apenas o mérito de indicar que, de uma maneira geral, o campo se encontrava praticamente isento de *A. caulivorum*, visto que somente

a amostragem em 4 talhões revelou a presença de 4 raras plantas doentes, com ligeiríssimos sintomas («traços») e, portanto, sem qualquer interesse. Em contra-partida, manifestava-se já um forte ataque de *Oidium erysiphoides* Fr. na cultura que, entretanto, havia entrado em floração.

O 2.º corte foi executado em 24 de Agosto e, após uma rega, procedemos no dia seguinte às modalidades A₁, B₁ e C₁, sendo as A₂, B₂ e C₂ efectuadas em 8 de Setembro.

A 3.ª amostragem teve lugar em 22 de Setembro e, embora surdissem agora amostras com algumas plantas doentes em maior número de talhões, elas continuaram a ser raras e, tal como anteriormente, sem consequências.

Mantinha-se o ataque generalizado de oídio, embora menos acentuado que por altura do corte anterior e, de novo, o bersim havia entrado em floração. Desta maneira, com a execução do 3.º corte em 22 de Setembro, considerámos o ensaio findo, com a convicção de que a cultura do bersim em regime de regadio por alagamento durante a época estival, não era propícia ao desenvolvimento do *A. caulivorum*.

Atendendo a que a doença foi praticamente inexistente, dispensamo-nos de apresentar os valores das produções em matéria verde correspondentes aos cortes efectuados.

III. ESTUDO DA INFLUENCIA DAS CONDIÇÕES METEOROLOGICAS NO APARECIMENTO E EXPANSÃO DO *A. CAULIVORUM*, NA TAPADA DA AJUDA (1959-63), EM CULTURA DE SEQUEIRO

Este estudo (*) incidiu, em cada ensaio, sobre a influência da temperatura do ar, humidade relativa e queda pluviométrica no aparecimento e na expansão da doença.

Em virtude de desejarmos averiguar até que ponto os tratamentos químicos ensaiados poderiam ocasionalmente contrariar uma acção favorável daqueles agentes climatéricos sobre o *A. caulivorum*, come-

(*) Agradecemos ao Ex.^{mo} Prof. Eng.º Agr.º Eduardo Mendes Frazão as facilidades e esclarecimentos dispensados neste estudo.

çámos por estudar os factores que condicionaram o aparecimento da micose e, seguidamente, as possíveis inter-acções desencadeadas entre cada corte e a amostragem seguinte.

Para os casos da temperatura e da humidade relativa do ar, tomámos apenas os valores assinalados diariamente às 9 horas, por serem os que melhor representam os valores da temperatura e da humidade relativa médias; em relação à queda pluviométrica, utilizámos os valores da precipitação em 24 horas do dia, medidos das 9 horas de um dia, até às 9 do seguinte.

Com os elementos obtidos, elaborámos para cada ensaio um gráfico representativo da evolução das condições meteorológicas ao longo do período que antecedeu ligeiramente o aparecimento da doença, sua expansão e declínio, considerado este no sentido de o parasita poder ainda surgir, mas sem qualquer reflexo económico sobre uma cultura prestes a encerrar o seu ciclo biológico.

1.º ENSAIO (Época de 1959-60)

O facto de a 1.ª colheita de amostras, realizada em 19 de Dezembro de 1959, ter revelado somente a presença de raras plantas atacadas (classe 1) em três talhões, induziu-nos a efectuar o nosso estudo a partir do início daquele mês, convencidos de que este período terá sido suficiente para que a doença se manifestasse. Desta maneira, e de acordo com o Gráf. VIII, reunimos no Quadro 50, os elementos mais salientes no intervalo considerado.

QUADRO 50

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
17,2	6,2	15,3	8,5	11,9	97,0	70,0	84,1	110,7	5,3

O período de 65 dias que decorreu entre o 1.º corte (21 de Dezembro) e a 2.ª amostragem (24 de Fevereiro) foi caracterizado pelos dados apurados no Quadro 51.

QUADRO 51

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
17,8	-0,5	15,2	8,1	11,7	100,0	48,0	86,3	230,7	3,5

Conforme já referimos atrás, a doença surgiu neste período com forte intensidade, sobretudo em relação a alguns talhões das modalidades testemunhas, o que parece evidenciar que, no conjunto, os factores meteorológicos decorrentes foram extremamente favoráveis à disseminação do parasita. Por outro lado, as temperaturas relativamente baixas que se fizeram sentir, retardaram apreciavelmente o desenvolvimento da cultura, o que teve como efeito que os tratamentos fungicidas não tivessem actuado da melhor maneira, dado o largo período que se seguiu à aplicação das duas modalidades. Contudo, não deixou de ser já sintomático que os talhões tratados com os fungicidas 15 dias após o 1.º corte tivessem apresentado melhor aspecto sanitário que os pulverizados logo 5 dias depois.

O período que decorreu entre o 2.º corte (25/2) e a 3.ª amostragem (21/3) foi agora apenas de 25 dias, para o que contribuíram as temperaturas mais elevadas que se fizeram sentir, relativamente ao período anterior, e que actuaram favoravelmente sobre o desenvolvimento da cultura. No Quadro 52 reunimos os elementos agora apurados.

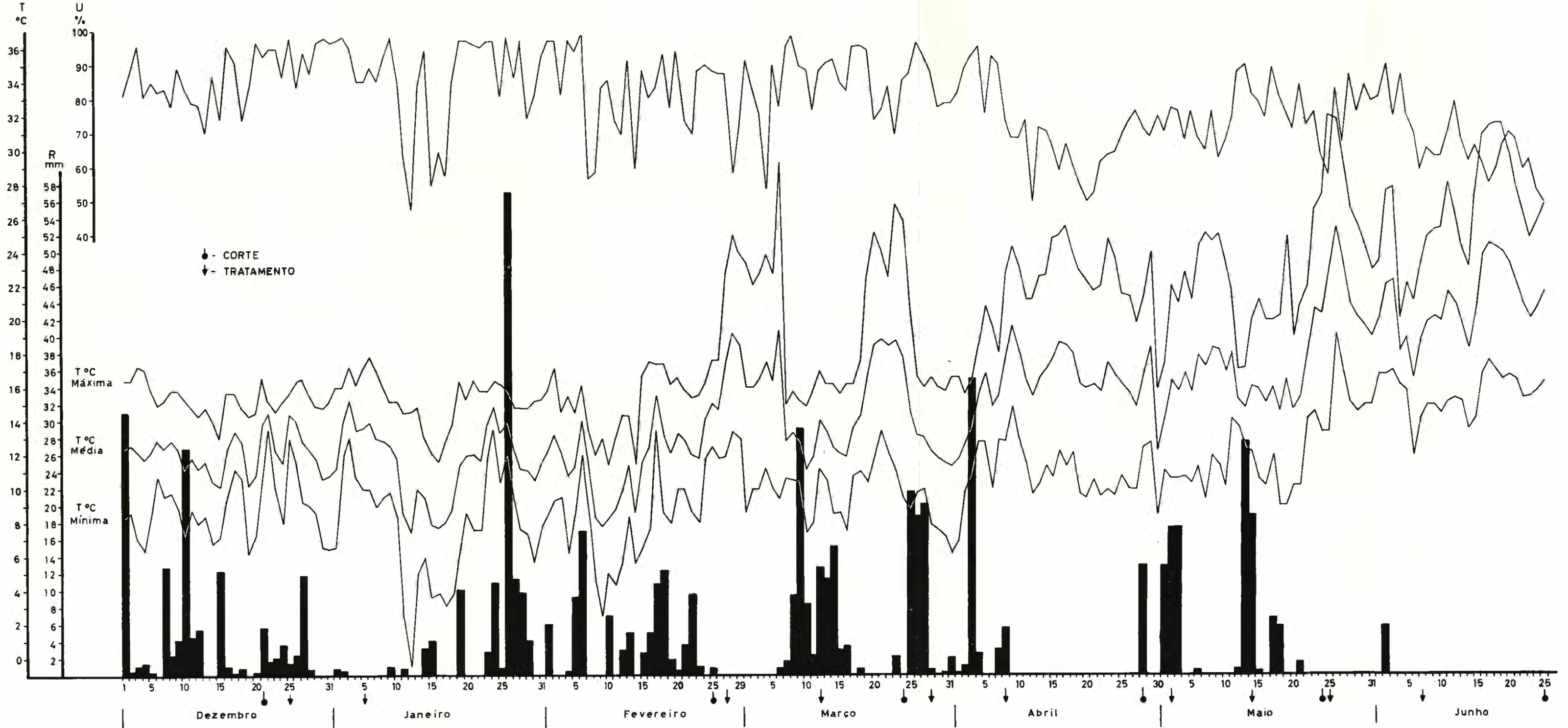
QUADRO 52

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
29,4	7,4	19,9	10,4	15,2	99,0	54,0	84,4	97,4	3,9

De salientar que, com excepção das temperaturas, os restantes factores apresentaram valores muito semelhantes aos registados no Quadro 51 que, como vimos, tinham favorecido consideravelmente a expansão da doença. Se desta vez notámos que as modalidades B, e C,

GRAFICO VIII

Condições meteorológicas que precederam ligeiramente o aparecimento do *A. caulivorum* e acompanharam a sua expansão e declínio, na campanha de 1959-60



(2 dias após o corte) haviam conferido melhor aspecto sanitário que as B₂ e C₂ (15 dias depois), não podemos evidentemente atribuir o facto à temperatura, dado que a média diária das temperaturas médias se situou muito aquém da óptima do *A. caulivorum* e que está próxima de 22° C. O exame do Gráfico VIII, permite-nos deduzir como se teria processado a melhor eficiência das modalidades B₁ e C₁ sobre as B₂ e C₂. Com efeito, as primeiras foram executadas sob bom tempo e durante uma semana não choveu; logo que as chuvas apareceram, prolongaram-se por 11 dias consecutivos e, certamente, que os tratamentos terão protegido a cultura durante os primeiros dias de chuva. As 2.^{as} modalidades foram aplicadas justamente a meio desse período chuvoso e, conforme referimos, passadas 6 horas choveu abundantemente. Desta maneira, tudo se teria passado como se os talhões das modalidades B₂ e C₂ tivessem ficado expostos a francas condições de humidade durante o dobro do tempo que os das modalidades B₁ e C₁ e daí, a maior susceptibilidade apresentada.

Entre o 3.º corte (24/3) e a 4.ª amostragem (26/4) decorreram 33 dias, tendo-se verificado, entretanto, as condições reunidas no Quadro 53.

QUADRO 53

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
25,5	6,2	20,6	10,4	15,5	96,0	50,0	75,1	110,6	3,4

No seu conjunto, estas condições são também muito semelhantes às registadas para o período anterior e se consultarmos o Gráf. VIII, compreenderemos a razão porque, neste período, as modalidades B₁ e C₁ vincaram ainda mais a sua supremacia sobre a B₂ e C₂. Na verdade, as primeiras tiveram lugar 4 dias após o corte e, praticamente, nos cinco dias que se seguiram, os quatro últimos caracterizaram-se por fracas quedas pluviométricas e só no 6.º houve uma forte precipitação (33 mm); até ao dia em que se realizaram as 2.^{as} modalidades, ainda houve 3 dias de fraca pluviosidade, embora favoráveis ao desenvolvimento da doença e, depois da sua aplicação, não mais surgiu mau tempo até à 4.ª amostragem. Sendo assim, os talhões das modalidades B₁ e C₁ estiveram praticamente defendidos durante

todo o período chuvoso, enquanto os das modalidades B₂ e C₂ se encontravam desprotegidos.

O período de 26 dias que decorreu entre o 4.º corte (28/4) e a 5.ª amostragem (24/5), caracterizou-se pelos valores apresentados no Quadro 54.

QUADRO 54

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
25,2	8,5	21,7	11,4	16,6	91,0	63,0	75,8	110,0	4,2

Conforme atrás referimos, foi neste intervalo que o *A. caulivorum* manifestou maior virulência e se confrontarmos este quadro com o anterior, notaremos que as temperaturas ocorridas foram apreciavelmente superiores, assim como a precipitação média diária. Deste modo, infere-se que tínhamos razão quando entre o 2.º corte e a 3.ª amostragem (Quadro 52) referimos que não poderíamos atribuir à ligeira subida de temperatura, mas sim aos tratamentos, o melhor estado sanitário então registado.

Em face do Gráf. VIII, vejamos agora como os tratamentos não conseguiram dar a protecção desejada, se bem que ainda tenha sido apreciável, conforme já tivemos ocasião de assinalar. Na verdade, tanto as modalidades B₁ e C₁ como a B₂ e C₂ foram efectuadas e seguidas de chuvas intensas. Assim, as primeiras foram acompanhadas de uma precipitação de 35 mm e as segundas de 19,2 mm e, desta maneira, os fungicidas aplicados terão sido, em grande parte, arrastados.

Entre o 5.º corte (24/5) e a 6.ª amostragem (24/6) decorreram 31 dias, período que se caracterizou pelos elementos contidos no Quadro 55.

QUADRO 55

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
32,2	12,2	26,7	15,8	21,2	91,0	54,0	70,6	5,6	0,18

Em face destas condições, a doença sofreu considerável regressão, conforme se pode observar no Quadro 49, facto que não pode deixar de imputar-se às temperaturas bastante elevadas que se fizeram sentir e ainda, sobretudo, à quase inexistente precipitação atmosférica.

Em nosso entender, este ensaio foi bastante fértil em valiosas e variadas indicações que proporcionou. Desta maneira e como balanço final, não podemos deixar de atribuir o maior relevo à queda pluviométrica e, logo a seguir, à temperatura do ar. No que respeita à humidade relativa do ar, parece não ter tão grande importância, pois em todos os períodos considerados, não se registaram diferenças sensíveis. Contudo, isto não quer dizer que a humidade relativa não tenha também um efeito preponderante. Simplesmente e, em nossa opinião, quando a cultura atinge um porte apreciável e grande densidade, pode permitir condições de excepcional humidade que devem superar consideravelmente os valores registados nos higrómetros de um posto meteorológico.

2.º ENSAIO (Época de 1960-61)

Em virtude de a sementeira ter sido efectuada só em 14 de Janeiro de 1961, resolvemos estudar apenas o período que decorreu desde o início de Fevereiro até à 1.ª amostragem (27/3), intervalo mais que suficiente para cobrir o aparecimento da doença pois, nesta altura, o ataque era ainda bastante benigno (Quadro 49). De acordo com o Gráf. IX), reunimos no Quadro 56 os elementos mais salientes ao longo dos 55 dias considerados.

QUADRO 56

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
25,1	4,6	20,3	9,5	14,9	98,0	52,0	75,3	84,8	1,5

Entre o 1.º corte (28/3) e a 2.ª amostragem (27/4) decorreram 30 dias, período que se caracterizou pelos elementos contidos no Quadro 57.

QUADRO 57

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
23,5	7,0	19,3	9,7	14,5	98,0	69,0	80,5	44,4	1,5

Foi neste intervalo que a doença se manifestou com maior intensidade e, se atendermos ao Quadro 56, dificilmente encontraremos explicação para o facto. Porém, o Gráf. IX mostra-nos que, embora a queda pluviométrica média diária tenha sido igual à do período anterior, a sua distribuição foi bastante regular, facto que não deixou de se reflectir sobre a humidade relativa média, pelo maior valor a que conduziu (80,5 %).

O período que decorreu entre o 2.º corte (27/4) e a 3.ª amostragem (18/5), foi apenas de 21 dias e caracterizou-se pelos valores do Quadro 58.

QUADRO 58

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
34,0	8,6	26,9	13,9	20,4	85,0	32,0	65,4	0	—

Como não poderia deixar de ser, a ausência de chuvas durante este intervalo conduziu a uma notável regressão da doença, tanto mais que os valores da temperatura subiram consideravelmente, ao mesmo tempo que se assistiu a uma baixa considerável da H. R. média.

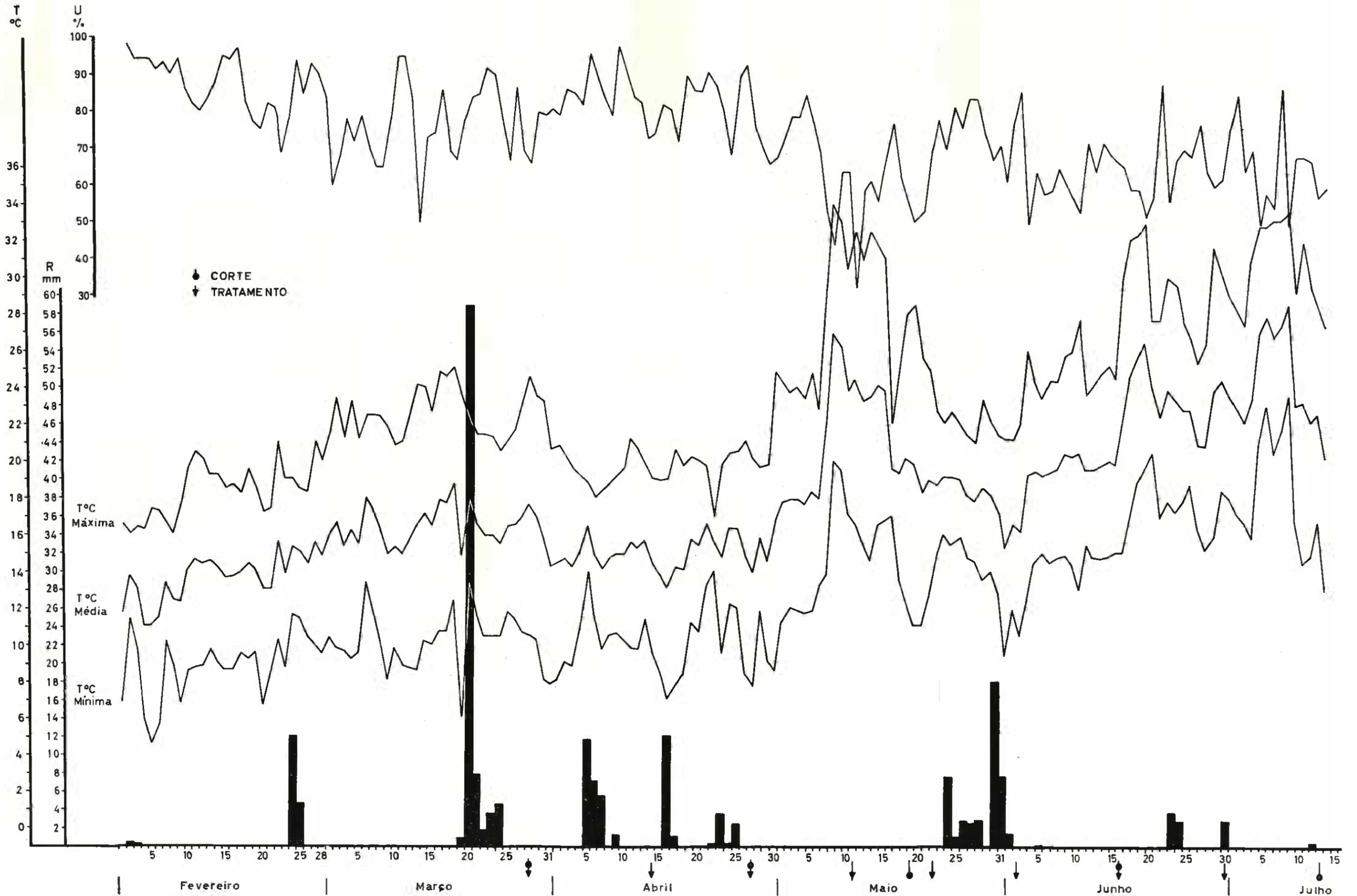
Entre o 3.º corte (19/5) e a 4.ª amostragem (16/6) decorreram 28 dias, período que se caracterizou pelos elementos contidos no Quadro 59.

QUADRO 59

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
27,8	9,4	24,2	13,9	19,1	86,0	53,0	68,1	43,9	1,6

GRÁFICO IX

Condições meteorológicas que precederam o aparecimento do *A. caulivorum* e acompanharam a sua expansão e declínio na campanha de 1960-61



Como consequência do aparecimento das chuvas e de temperaturas mais amenas, surgiu um apreciável incremento da doença que foi particularmente nítido nas modalidades testemunhas (Quadro 49). Desta maneira e conforme se pode observar no Gráf. IX, certamente que ao facto não foram estranhos os tratamentos aplicados com oportunidade. Assim, assistiu-se agora a uma ligeira melhoria das modalidades B₂ e C₂ sobre a B₁ e C₁ e, neste caso, somos forçados a admitir que a doença terá começado a manifestar-se mais, pouco depois da aplicação dos 2.^{os} tratamentos.

Não podemos ainda deixar de referir que aquelas condições climatéricas permitiram o aparecimento de *Oidium erysiphoides* Fr. e de da floração do bersim.

No período de 25 dias que decorreu entre o 4.^o corte (16/6) e a 5.^o amostragem (11/6), tiveram lugar as condições reunidas no Quadro 60.

QUADRO 60

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
33,6	14,5	30,1	18,1	24,1	88,0	50,0	65,4	9,4	0,4

Embora se tivesse manifestado um ligeiro incremento da doença, relativamente ao período anterior, desta vez os tratamentos B₁ e C₁ revelaram-se superiores ao B₂ e C₂ (Quadro 49), facto perfeitamente admissível perante a distribuição das chuvas que se pode observar no Gráf. IX. Quer dizer, desde que surjam condições favoráveis ao parasita ao longo das duas semanas que antecedem a execução das 2.^{as} modalidades, estas já não conseguem dar a desejada protecção.

As condições climatéricas referidas permitiram ainda que se intensificasse o ataque do oídio assinalado anteriormente e o aparecimento da ferrugem *Uromyces trifolii* (Hedw. f.) Lév., que se manifestou severamente.

3.^o ENSAIO (Época de 1961-62)

Atendendo ao carácter benigno com que a doença surgiu por altura da 1.^a amostragem (12 de Fevereiro) estudámos apenas o período com início no mês de Janeiro e que terminou naquela data.

Desta maneira, as condições meteorológicas que decorreram ao longo dos 43 dias considerados foram representadas no Gráf. X e no Quadro 61.

QUADRO 61

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
18,7	3,5	15,6	6,8	11,2	100,0	46,0	78,9	85,9	2,0

O período de 39 dias que decorreu entre o 1.º corte (12/2) e a 2.ª amostragem (23/3) foi caracterizada pelos elementos do Quadro 62.

QUADRO 62

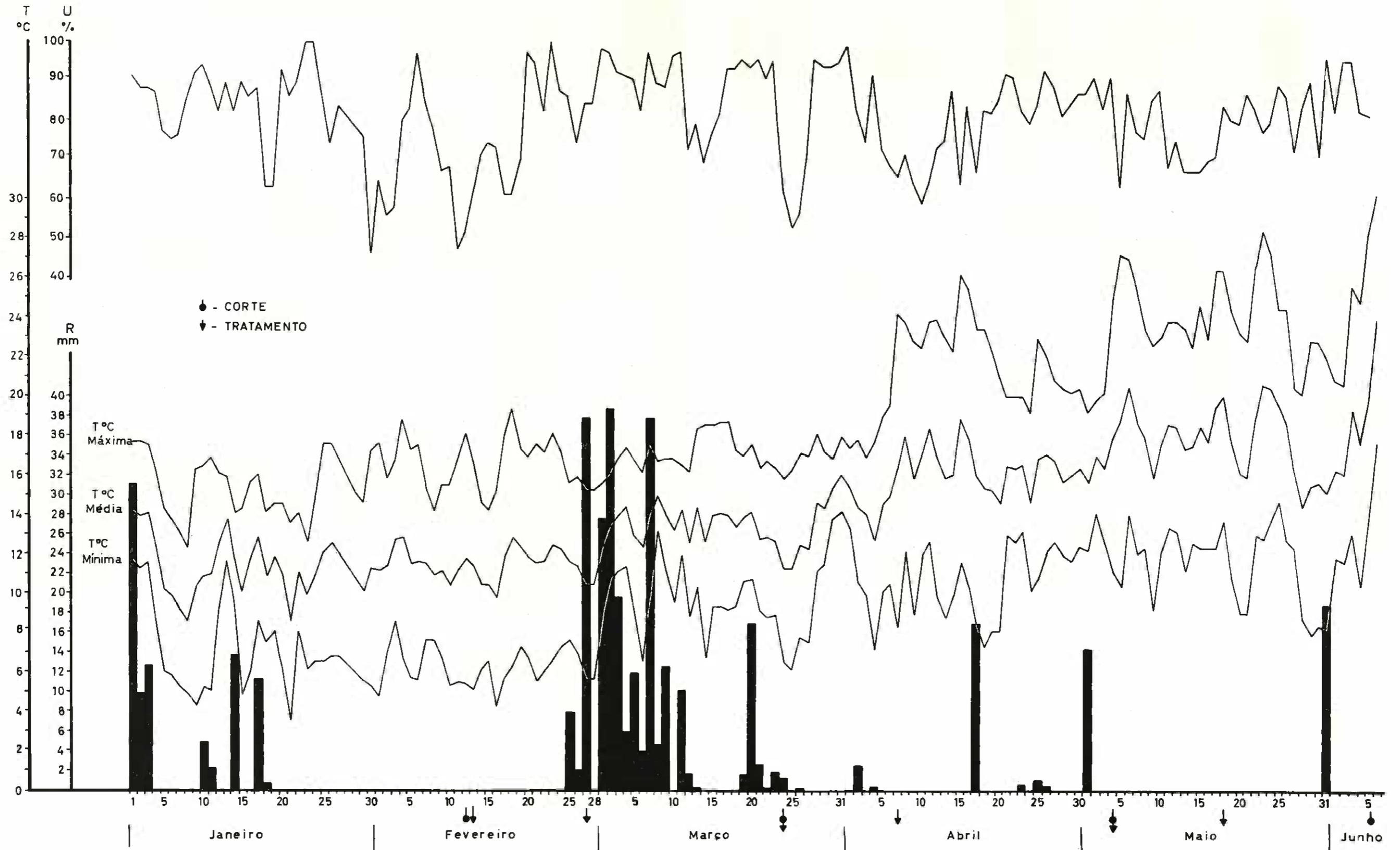
Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
19,2	4,2	16,8	8,2	12,5	100,0	61,0	84,8	242,7	6,2

O facto de o estado sanitário da cultura ter melhorado neste período, só poderá explicar-se pela prolongada estiagem que já se fazia sentir, mesmo antes do 1.º corte. Com efeito, no Gráf. X podemos observar que quando este teve lugar, já se tinham passado 25 dias sem qualquer precipitação, situação que se prolongou ainda por mais 12 dias. Desta maneira, o período de 37 dias que decorreu sem chover e que se caracterizou também por temperaturas relativamente baixas, teria comprometido seriamente o desenvolvimento da doença. Quando as chuvas surgiram, a cultura encontrar-se-ia pouco pujante em face também das condições já referidas e, desta maneira, o período de chuva intensivo que se seguiu, não teria sido suficiente para permitir ao parasita uma rápida recuperação.

Entre o 2.º corte (24/3) e a 3.ª amostragem (2/5) decorreram 39 dias, intervalo que se caracterizou pelos elementos contidos no Quadro 63.

GRAFICO X

Condições meteorológicas que precederam o aparecimento do *A. caulivorum* e acompanharam a sua expansão e declínio na campanha de 1961-62



QUADRO 63

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
26,0	6,0	20,9	10,7	15,8	98,0	63,0	79,8	37,2	0,9

De novo se assistiu à regressão da doença, facto que se explica pela fraca queda pluviométrica que ocorreu neste período.

Entre o 3.º corte (4/5) e a 4.ª amostragem (5/6) decorreram 32 dias, sendo este intervalo caracterizado pelos elementos do Quadro 64.

QUADRO 64

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
28,2	7,7	23,9	11,5	17,7	95,0	62,0	78,5	18,4	0,6

Conforme se pode verificar no Gráf. X, a circunstância de apenas ter chovido durante aquele período, conjugada com as temperaturas de certo modo elevadas que se faziam já sentir conduziram à quase inexistência da doença.

4.º ENSAIO (Época de 1962-63)

Dado o estado extremamente benigno com que o parasita se manifestou por altura da 1.ª amostragem (15/1/63), incluímos apenas no Quadro 65, os elementos apurados desde o princípio de Janeiro, até esta data.

QUADRO 65

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
17,0	5,5	15,3	9,3	12,3	100,0	71,0	88,7	169,8	11,3

O período de 44 dias que decorreu entre o 1.º corte (16/1) e a 2.ª amostragem (1/3), foi caracterizado pelos valores apresentados no Quadro 66.

QUADRO 66

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
16,2	3,4	14,8	6,1	10,5	98,0	61,0	81,5	295,5	6,7

Estas condições tinham permitido que o fungo se disseminasse bastante, para o que contribuiu de certo, a intensa e quase contínua precipitação (Gráf. XI). Contudo, o carácter benigno de que se revestiu só poderá ser explicado pelas temperaturas relativamente baixas que se fizeram sentir até desfavoravelmente sobre a cultura de bersim, visto que o 2.º corte tardou 45 dias a ser executado. Nas condições referidas, as modalidades B₂ e C₂ revelaram-se melhores do que a B₁ e C₁, o que não é de admirar, dado que aquelas temperaturas terão retardado o aparecimento da doença e, nestas circunstâncias, as chuvas prolongadas anularam, entretanto, as protecções derivadas das 1.ªs modalidades.

Entre o 2.º corte (2/3) e a 3.ª amostragem (29/3) decorreram apenas 27 dias, para o que contribuiu o aparecimento de temperaturas mais favoráveis ao bersim. No Quadro 67 figuram os elementos meteorológicos correspondentes ao período considerado.

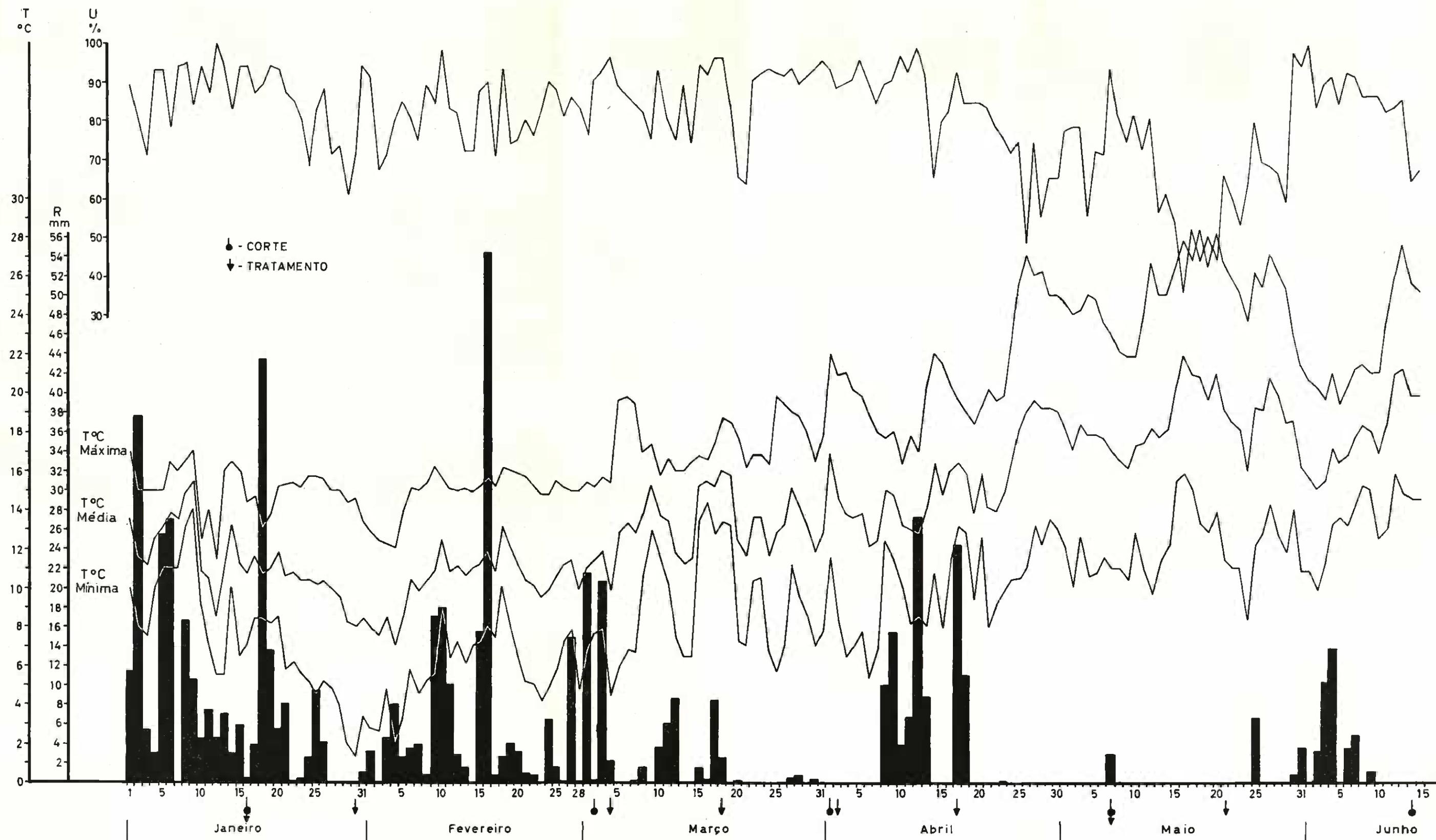
QUADRO 67

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
19,8	5,7	18,0	9,5	13,8	96,0	63,0	89,9	57,5	2,1

Desta vez, já não foi tão sensível a diferença entre as 2.ªs e as 1.ªs modalidades (Quadro 49), ao que certamente não foi estranha a fraca queda pluviométrica e a melhor colocação das modalidades B₁ e C₁,

GRAFICO XI

Condições meteorológicas que precederam ligeiramente o aparecimento do *A. caulivorum* e acompanharam a sua expansão e declínio, na campanha de 1962-63



conforme se pode observar no Gráf. XI. Foi ainda sob aquelas condições meteorológicas que surgiu um forte ataque de *Sminthurus viridis*.

O período de 36 dias que decorreu entre o 3.º corte (1/4) e a 4.ª amostragem (7/5), caracterizou-se pelos valores apresentados no Quadro 68.

QUADRO 68

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
27,0	8,0	21,5	10,2	15,9	98,0	48,0	78,7	112,6	3,1

Foram estas condições que proporcionaram o maior desenvolvimento da doença neste ensaio e não deixa de ser interessante salientar que são muito semelhantes às verificadas entre o 4.º corte e a 5.ª amostragem (Quadro 49) do 1.º ensaio conduzido na época de 1959-60 e que proporcionou a maior virulência ao parasita.

Em face deste Quadro, verifica-se que não houve grande diferença entre as 1.ª e as 2.ª modalidades, o que parece indicar que as infecções teriam ocorrido principalmente antes da execução das últimas, isto é, anteriormente aos 16 dias que se seguiram ao 3.º corte. Na verdade e conforme se pode observar no Gráf. XI, as condições meteorológicas que se seguiram à realização das modalidades A₂, B₂ e C₂ caracterizaram-se já por raras e reduzidas quedas pluviométricas, ao mesmo tempo que se assistiu a uma apreciável subida de temperatura. Paralelamente, o ataque de *S. viridis* declinou apreciavelmente.

Entre o 4.º corte (7/5) e a 5.ª amostragem (11/6) decorreram 35 dias, tempo que se caracterizou pelos valores que constam do Quadro 69.

QUADRO 69

Temperatura do ar (°C)					Humidade relativa (%)			Precipitação (mm)	
Máx.	Mín.	Média			Máx.	Mín.	Média	Total	Média
		Máx.	Mín.	Dia					
28,4	8,4	23,8	12,5	18,2	99,0	36,0	71,4	48,1	1,4

Estas condições permitiram que a doença ainda se manifestasse com certa intensidade, embora ligeiramente menos que no período anterior.

O Quadro 49 indica claramente que houve maior benefício com as modalidades B₂ e C₂ do que com as B₁ e C₁, facto que está de acordo com a distribuição das chuvas ocorridas durante o período considerado. Com efeito e conforme se pode observar no Gráf. XI, a queda pluviométrica total ocorreu só depois da aplicação das 2.^{as} modalidades. Quer dizer, nas condições assinaladas, as B₂ e C₂, sobretudo a B₂, protegeram eficazmente a cultura até 19 dias após a sua aplicação.

CONCLUSÕES

O autor aceita a designação de *Aureobasidium caulivorum* (Kirchn.) B. Cooke para a espécie estudada, antes considerada *Kabatella caulivora* (Kirchn.) Karak.

Os meios gelosados mais favoráveis ao crescimento do fungo foram, por ordem decrescente, os de batata glucosada a 2%, de cenoura e de malte. A esporulação foi mais favorecida nas geloses de bersim e de batata simples.

A temperatura óptima de crescimento do *A. caulivorum* está próxima de 22° C. Prefere para o seu desenvolvimento um meio fortemente ácido (pH 3) e não cresce, praticamente, em meio francamente alcalino (pH 9). Esporula satisfatoriamente entre pH 5 e pH 8,5 e ligeiramente menos a pH 9, sendo a pH 3 que a esporulação foi mais fraca.

A germinação dos esporos em água destilada à temperatura de 22° + 0,5° C. foi insignificante, mas a adição à suspensão de esporos de um filtrado proveniente de um macerado de folhas e caules de bersim permitiu uma franca germinação.

Revelou-se fortemente estimulante da germinação dos esporos o meio constituído por agar a 1% com extracto de bersim a 1%.

O estudo da germinação e esporulação do *A. caulivorum* em alguns meios gelosados permitiu observar gemulação, septação, alteração de cor nos esporos e a formação de radulasporos e clamidósporos.

Revelaram em laboratório boas possibilidades de serem utilizados em ensaios de campo contra o *A. caulivorum*, o sulfato de cobre

e oxicleto de cobre, no grupo dos fungicidas minerais e, nos orgânicos, o «Captane», o zirame e o tiocianato de dinitrofenilo; o óxido cuproso e o zinebe manifestaram fraco poder fungicida.

Os ensaios preliminares de inoculação experimental de plantas envasadas mostraram que a sua manutenção em câmara húmida por um período de 24 horas não favoreceu tanto a incubação da doença, nem tão pouco o grau de intensidade de ataque, como os períodos de 48 e 72 horas.

Nas condições dos ensaios efectuados para avaliação do grau de susceptibilidade de diversas forragens ao *A. caulivorum*, concluiu-se que:

- a) As inoculações foram positivas em todas as 30 cultivares pertencentes a 11 espécies de plantas.
- b) O *T. alexandrinum* foi, de longe, a forragem que manifestou maior susceptibilidade; a seguir e por ordem decrescente situaram-se: *T. resupinatum* ssp. *suaveolens*, *T. pratense*, *Trigonella foenum-graecum*, *T. incarnatum*, *T. repens*, *Melilotus alba*, *M. segetalis*, *M. indica*, *Medicago sativa* e *Melilotus officinalis*.
- c) As três seguintes leguminosas: *Melilotus officinalis* Lamb., *Melilotus segetalis* (Brot.) Serv. e *Trigonella foenum-graecum* L. são dadas pela primeira vez como susceptíveis ao *A. caulivorum* mediante inoculação artificial.
- d) Tanto as cultivares autotetraplóides de bersim como as de trevo violeta ensaiadas parecem manifestar uma susceptibilidade semelhante às diplóides.

Nos ensaios de campo com bersim em sequeiro efectuados no Ribatejo em solos do tipo Hidromórfico Para-Aluviossolo, a análise estatística mostrou existir heterogeneidade nas contagens, como consequência lógica de a doença aparecer às manchas. Sugere-se em relação a esta doença ou a qualquer outra do mesmo tipo, a utilização de rectângulos como unidade de amostragem em que a relação maior/menor dimensão seja, tanto quanto possível elevada, tendendo para a amostragem em linhas. Outro processo será colher maior número de amostras de dimensões mais reduzidas, mas sempre com disposição linear.

Quer no ensaio das Silveiras, quer no das Lezírias, não foi possível apurar qualquer responsabilidade na disseminação do fungo pelo instrumento de corte.

Em relação ao ensaio das Silveiras, o número de plantas por amostra não parece ter sido afectado pela desinfeção das sementes com *Arasan*. Contudo, em relação ao 1.º corte, parece ter existido uma tendência para ocorrerem mais focos de infecção nos talhões em que as sementes não foram tratadas, o que se continuou a verificar por altura do 2.º corte.

No que respeita ao ensaio das Lezírias, onde se procedeu à desinfeção das sementes com o fungicida organo-mercurial *Ceresan M*, a análise estatística permitiu concluir que até à altura do 2.º corte o tratamento das sementes diminuiu a proporção de plantas atacadas e a gravidade do ataque.

Tanto no ensaio das Silveiras como no das Lezírias, não foi possível apurar qualquer diferença significativa entre a produção das modalidades com tratamentos e a das testemunhas.

Dos ensaios de campo com bersim em sequeiro conduzidos na Tapada da Ajuda, em Lisboa, durante 4 anos, num solo argiloso (barro vermelho) com o objectivo de estudar o combate ao *A. caulivorum* com a aplicação da calda Bordalesa neutra a 1 % e de «Captane» a 0,125 de M. A., após o corte e duas semanas depois, apenas o realizado na época de 1959-60 foi caracterizado por excepcionais condições climáticas que favoreceram extraordinariamente o ataque do parasita. A análise estatística relativa aos dados para aquele ano agrícola permitiu concluir que:

- a) Houve diferença altamente significativa, quanto à produção de matéria verde (corte a corte) entre os tratamentos com os fungicidas e as testemunhas, os quais não diferiam entre si, assim como os restantes efeitos.
- b) Não existia diferença significativa entre os tratamentos e as testemunhas relativamente ao grau de ataque do fungo, em face do número de plantas infectadas, o que se explica como devido parcialmente ao pequeno número de amostras utilizado. Sugere-se para o efeito a utilização futura de maior número de amostras e de repetições, além de talhões com maiores dimensões.

- c) Foi notória a acção dos tratamentos no ano agrícola de 1959-60 relativamente à produção total, sendo lícito admitir a maior eficácia da calda Bordalesa.

O estudo da influência das condições meteorológicas no aparecimento e expansão do *A. caulivorum* ao longo dos 4 anos de ensaios em regime de sequeiro na Tapada da Ajuda, permitiu explicar a maior ou menor eficácia dos tratamentos fungicidas e a oportunidade dos mesmos e revelar que os factores mais importantes foram a queda pluviométrica (principalmente) e a temperatura do ar. A humidade relativa pareceu não denotar tanto interesse, embora se admita que os valores registados possam ser inferiores àqueles que na realidade devem existir numa cultura de bersim com certo porte e densidade.

O comportamento das modalidades de tratamento foi variável e influenciado pelas condições meteorológicas. De uma maneira geral, colheu-se a noção de que a melhor oportunidade para executar as pulverizações se situa à volta de uma semana após o corte, desde que o intervalo entre dois cortes não vá além de um mês.

Os ensaios efectuados com bersim em regime de regadio na primavera-verão de 1960, quer por rega de aspersão (nas Silveiras), quer por alagamento (na Tapada da Ajuda), permitiram concluir que tal regime não favorece o parasita perante as adversas condições meteorológicas da época. Em contrapartida, verificou-se que as mesmas são susceptíveis de permitirem o aparecimento e expansão de *Oidium erysiphoides* Fr. e *Uromyces trifolii* (Hedw. f.) Lév.



SUMARIO

O presente estudo incidiu sobre o deuteromiceta *Aureobasidium caulivorum* (Kirchn.) B. Cooke, da Família *Aureobasidiaceae*, anteriormente considerado *Melanconiaceae*. É apresentada a revisão bibliográfica sobre o parasita relativamente a questões de nomenclatura e aos seus hospedeiros naturais ou que se mostraram susceptíveis através de inoculações experimentais. Descreve-se, ainda, a sua actual distribuição geográfica e apontam-se os principais modos de sobrevivência e disseminação do fungo, assim como os mais importantes factores favoráveis à doença.

É descrito um novo método para a avaliação da esporulação de fungos em meios de cultura sólidos ou líquidos, que poderá também ter aplicação noutros casos.

Descreve-se a sintomatologia externa e interna da doença em bersim, a diagnose do fungo e as suas características culturais em diversos meios gelosados; é estudada ainda a influência de temperatura e do pH no seu crescimento e esporulação.

É apresentado um demorado e minucioso estudo da germinação dos esporos do *A. caulivorum* em meios gelosados, sem e com a aplicação de estimulantes.

A eficácia, *in vitro*, de alguns fungicidas minerais e orgânicos sobre os esporos do fungo é estudada, visando a possibilidade da sua utilização em ensaios de campo.

É avaliado o grau de susceptibilidade ao fungo, de 30 cultivares pertencentes a 11 espécies de plantas leguminosas, mediante inocula-

ções experimentais, conduzidas durante quatro épocas, em plantas envasadas.

Descrevem-se dois ensaios de campo, com bersim de sequeiro, efectuados no Ribatejo para estudo da influência de desinfecção das sementes e do instrumento de corte na disseminação da doença e apresentam-se os resultados da análise estatística, e a discussão dos mesmos. Ainda com aquele objectivo, refere-se também um ensaio conduzido no Ribatejo com bersim regado por aspersão.

Relatam-se os ensaios de campo em bersim de sequeiro efectuados na Tapada da Ajuda, durante 4 anos, para estudo do combate ao *A. caulivorum* com tratamentos químicos e apresentam-se os resultados de análise estatística e a respectiva discussão. Descreve-se ainda um ensaio realizado também no mesmo local, com aquele objectivo, em bersim regado por alagamento. É estudada a influência das condições meteorológicas no aparecimento e expansão da doença ocorridas ao longo dos ensaios de sequeiro, conduzidos na Tapada da Ajuda.

Assinala-se pela primeira vez em Portugal, a ocorrência da *Sminthurus viridis* (L.), (*Collembola*, *Sminthuridae*), como importante parasita de bersim, *Vicia* sp., luzerna e trevo da Pérsia e admite-se, sob reserva, que aquele insecto possa ser vector do *A. caulivorum*.

SUMMARY

The present study deals with the deuteromicete *Aureobasidium caulivorum* (Kirchner) B. Cooke of the Family *Aureobasidiaceae*, previously designated *Melanconiaceae*.

The bibliographic revision presented covers the question of the parasite's terminology and also its natural hosts and those which showed to be susceptible through inoculation tests. Its present geographic distribution is given as well as the most important means of survival and dissemination of the fungus and the main factors favouring the disease.

Various culture media were studied for promoting sporulation and a new method is described for counting fungal spores in solid or liquid materials.

The internal and external symptomatology of the disease in berseem and the diagnosis of the fungus are given.

Cultural characteristics in different agar media, influence of temperature and pH on growth and sporulation were also registered.

A detailed study was made of the germination of the spores of the fungus in different agar media.

The action, in *vitro*, of some mineral and organic fungicides on spores was tested having in view of their possible utilization in the field.

During four seasons, the susceptibility of 30 cultivars belonging to 11 species of leguminous plants was evaluated by experimental inoculation, made on potted plants.

Two field tests with non irrigated berseem were carried out in

Ribatejo, to study the influence of seed desinfection and of the forage cutter in disseminating the disease. Statistical analysis of the results and their discussion are given. A similar test was carried out with spray irrigated berseem in the same district.

Field tests with fungicides on unirrigated berseem were carried out during 4 years at Tapada da Ajuda, Lisbon, the results of which were analysed statistically and discussed. The same fungicides were tested with flood irrigated berseem. An attempt was made to correlate meteorological conditions with the appearance and expansion of the disease during the dry farming experiments at Tapada da Ajuda.

The occurrence of *Sminthurus viridis* (L.), (*Collembola*, *Sminthuridae*) is reported for the first time in Portugal, as an important pest of berseem, *Vicia* sp., lucerne and Persian clover and it is admitted as very probable that this insect may be a vector of *A. caulivorum*.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, J. LEAO FERREIRA DE

- 1957 Trevos autotetraplóides. I. O caso do *Trifolium resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (Willd.) Dinsm. *Agron. Lusit.*, 19:127-144.

ALMEIDA, J. LEAO FERREIRA DE e CARVALHO, H. PADUA DE
1960 Trevos autotetraplóides. II. A poliploidização e o melhoramento de *Trifolium resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (Willd.) Dinsm. *Agron. Lusit.*, 22:287-308.

- 1962 Trevos autotetraplóides. III. O caso de *Trifolium alexandrinum* L. *Agron. Lusit.*, 44:45-74.

AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY

- 1943 The slide-germination method of evaluating protectant fungicides. *Phytopathology*, 33:627-632.

ANONIMO

- 1952 Izvestaji poljoprivrednih i sumarskih naueno-istrazivackih ustanova FNRJ o radu na produkcju zastite bilja od 1945-1951 godine. *Zasht. Bilja*, 13-14, 193 pgs., 22 figs. (Cit. R. A. M., 34:134).

ATHOW, K. L.

- 1957 The effect of seed treatment on seedling stand and forage yield of Alfalfa and red clover. *Phytopathology*, 47, 8:504-506.

ATHOW, K. L. e RALPH, L. D.

- 1957 Inheritance studies on northern and southern anthracnose of red clover. *Phytopathology*, 47, 1:2.

BAUDYS, E.

- 1924 O spále ci anthracnose Jetele. *Ochrana Rostlin*, 5, 1. (Cit. R. A. M., 4, 351).

BONNEMAISON, L.

- 1961 *Les Ennemis Animaux des plantes cultivées et des Forêts*. Tome I; Editions Sep, Paris.

BRIEN, R. M. e DINGLEY, J. M.

- 1957 Third supplement to «A revised list of plant diseases recorded in New Zealand, 1955-1957». *N. Z. J. Sci. Tech.*, Sect. A, 38:777-781.

BUBAK, F.

- 1907 Kabatiella Bubak n.g. Mucedinearum Hyalosporarum. *Hedwigia*, 46:297.

BURGERJON, A.

- 1956 Pulvérisation et poudrage au laboratoire par des préparations pathogènes insecticides. *Ann. Epiphyt.*, 4:675-684.

BUTLER, E. J. e JONES, S. G.

- 1955 *Plant Pathology*. Mac Millan & C.^o, Ltd., New York and London

CABRAL, R. V. DE G. e PINTO-GANHÃO, J. F.

- 1959 Uma grave doença do bersim em Portugal. *Agros*, 42, 2.

CHANCOGNE, M. e VIEL, G.

- 1956 Méthodes d'évaluation des propriétés fongicides des substances diverses en vue de leur emploi agricole. *Ann. Epiphyt.*, 4:641-660.

CIFERRI, R., RIBALDI, M. e CORTE, A.

- 1956 *Atti. Ist. Bot. & Lab. Critt. Univ. Pavia*, 14, 3:15. (Cit. Cooke, 1959).

CIFERRI, R.

- 1958 *Manuale di Micologia Medica*. Pavia. (Cit. Cooke, 1962).

COCHRAN, W. G.

- 1954 Some methods for strengtenning the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10:417-451.

COLE, H. e COUCH, H. B.

- 1957 Etiology and epiphytology of northern anthracnose of red clover. *Phytopathology*, 47, 4:244.

- 1958 Etiology and epiphytology of northern anthracnose of red clover. *Phytopathology*, 48, 6:326-331.

- 1959 Cytological investigations of *Kabatiella caulivora*. *Amer. J. Bot.*, **46**, 1:12-16.
- COLOTELO, N. e GRINCHENCO, A. H. H.
1962 Growth of *Kabatiella caulivora* on different media. *Canad. J. Bot.*, **40**, 3:439-446 (cit. R. A. M., 41:605).
- COMSTOCK, J. H.
1940 *An Introduction to Entomology*. Comstock Publishing Company, Inc. Ithaca-New York.
- COOKE, W. B.
1959 An ecological life History of *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, **12**, 1:1-45.
1962 A taxonomic study in the «black yeasts». *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, **17**, 1:43, 1 fig.
- ELLIOTT, E. S.
1952 Diseases, insects, and others factors in relation to red clover failure in West Virginia. *Bull. W. Va. agric. Exp. Sta.* 351 T, 65 pgs. (Cit. R. A. M. **33**:676).
- ESSIG, E. O.
1942 *College Entomology*. The Mac-Millan Company — New York.
- FISCHER, R. A.
1954 *Statistical methods for Research Workers*. 12th edit. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- FRANDBSEN, K. J.
1956 Variations in resistance of *Trifolium pratense* to attacks of *Kabatiella caulivora* (Kirchn). *Karak. Friesia*, **5**, 3-5:231-233. (Cit. R. A. M. **36**:247).
- FREAR, D. E. H.
1959 *Pesticide Handbook*. College Science Publishers, State College, Pennsylvania.
- FULTON, H. R.
1910 An anthracnose of red clover caused by *Gloeosporium caulivorum* Kirch. *Science*, **N. S.** **31**:752.
- GAMA, M. M. da
1961 Nouvelle contribution pour l'étude des Collemboles du Portugal Continental. *Memórias e Estudos do Museu Zoológico da Universidade de Coimbra*, n.º 269.

GATTANI, M. L.

- 1954 The agar plate spore germination method for treating fungicides
Phytopathology, 44:113-115.

GOIDANICH, G.

- 1935 Osservazioni sopra una malattia del Trifoglio rara in Italia:
l'antracnosi de *Kabatiella caulivora* (Kirch.) Karak. *R. C. Accad.
Lincei*, 22, 7-8:354-358. (Cit. R. A. M. 15:158).

GOULDEN, C. H. e STEVENSON, T. M.

- 1949 Breeding for disease-resistance in Canada. *Emp. J. exp. Agric.* 17,
68:222-228. (Cit. R. A. M. 31:386).

GRAM, E., JORGENSEN, C. A. e ROSTRUP, S.

- 1928 Oversigt over sygdomme hos landbrugets og havebrugets kulturplan-
ter i 1927. *Tidsskr. for Planteavl*, 34, 5:778-836. (Cit. R. A. M. 8:151).

GRAM, E.

- 1932 Plantesygdomme i Dannark 1931. Oversigt, samlet ved statens plante
patologiske Forsog. *Tidsskr. for Planteavl*, 38, 3-349-390. (Cit. R.
A. M. 11:767).

GRINCHENKO, A. H. H. e COLOTELO, N.

- 1963 Methods for obtaining the perfect stage of *Kabatiella caulivora*.
Abst. in *Phytopathology*, 53, 8:876.

HANSON, E. W.

- 1957 Further studies on symptoms of northern anthracnose and host range
and physiologic specialization of *Kabatiella caulivora*. *Phytopathology*,
47, 1-14-15.

HARA, K.

- 1954 A list of japanese hitherto known fungi, four edition, 447 pgs. (Cit.
R. A. M. 33:563).

HEGYI, D.

- 1915 Über das dern wiesenklee in Ungarn schädliche *Gloeosporium cau-
livorum*. *Mezogazdasagi Szemle*, 33:55-58. (Cit. Sampson, 1928).

HELBLING, C. E.

- 1958/59 *Agricultura Geral*. Edições A. E. A. Lisboa.

HEY, A.

- 1945 Die wichtigsten krankheiten und Schädlinge im Samenban der
Kleeartigen Pflanzen.
Veröff. Gemeinsch Arb. Forsch-Dienst. Reichsverb. Pflzucht, 3, 8:139.
(Cit. R. A. M. 25:455).

HOLLOWEL, E. A.

- 1943 Registration of varieties and strains of red clover. *J. Amer. Soc. Agron.* 24, 9:830-833. (Cit. R. A. M. 23:22).
- 1961 Registration of varieties of red clover. *Agron. L.*, 53, 6:403. (Cit. R. A. M. 41:312).

JANKOWSKA, K.

- 1929 Spostrzezenia nad wystepowaniem chorob róslin uprawnychwwoj. Lubelskiem w latach 1927 i 1928. *Mém. Inst. National Polonais d'Economie Rurale à Putaway*, 9, 2:574-595. (Cit. R. A. M., 9:86).

JORSTAD, I.

- 1945 Parasitoppene pa Kultur-og nyttevekster i Norge. I. Sekksporesopper (Ascomycetes) og Konidiesopper (Fungi imperfecti). *Medd. plan-terpat. Inst., Oslo*, 1, 142 pgs. (Cit. R. A. M. 25:185).

KARAKULIN, B. P.

- 1923 On the question of the systematic position of fungi belonging to the type of *Exobasidiopsis mihi*. *Bot. Material Inst. Cryptog. Plants, Chief Bot. Garden, Russian Republic*, 2:101-108. (Cit. Sampson e Western, 1954).

KATTI, S. K. e GURLAND, J.

- 1961 The Poisson Pascal Distribution. *Biometrics*, 17:527-538.

KIRCHNER, O.

- 1902 *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten*, 12:10. (Cit. Stevens, 1921).

LEACH, C. M.

- 1962 *Kabatiella caulivora*, a seed-borne pathogen of *Trifolium incarnatum* in Oregon. *Phytopathology*, 52, 11:1184-1190, 3 figs.

MARCHAL, E.

- 1936 Observation et recherches effectuées à la Station de Phytopathologie de l'État, pendant l'année 1935. *Bull. Inst. Agron. Gembloux*, 5, 2:105-111.

MARTIN, J. P.

- 1959 Studies on northern anthracnose of red clover and its incitant, *Kabatiella caulivora*. *Diss. Abstr.*, 20, 3:862-863. (Cit. R. A. M. 39:232).

MIEGE, M. E.

- 1921 Note préliminaire sur les principales maladies cryptogamiques observées au Maroc. *Bull. Soc. de Patologie Vég. de France*, 8, 1:37-40. (Cit. R. A. M. 1:35).

- MILLER, H. J.
1949 Modifications of the slide-germination method of evaluating fungicides including the use of *Venturia inaequalis* and *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **39**:245-259.
- MILLER, P. R.
1955 Plant disease situation in the United States. *F. A. O. Pl. Prot. Bull.* **3**, 10:148-151.
- MINYAEVA, O. M.
1951 Dissemination of clover anthracnose with seeds. *Bull. Soc. Nat. Moscow*, N. S., **56**, 5:91-95. (Cit. R. A. M., **32**:318).
- MONTEITH, J.
1926 *Colletotrichum trifolii* and *Gloeosporium caulivorum* on clover. *Phytopathology*, **16**:71.
- MOOD, A. M.
1950 *An introduction to the theory of Statistics*. Mac Graw-Hill, New York.
- NUESCH, B.
1961 Red Clover scorch *K. caulivora*. *Mitt. Schweiz. Land.*, **9**, 12:185-188. (Cit. R. A. M., **41**:527).
- PAYEN, B. e BREBION, G.
1952 Examen de quelques méthodes d'essai préliminaire des produits destinés aux traitements anticryptogamiques. *3.^e Congr. Inter. Phytoph.*, 2:56-65.
- PERSECA, E.
1962(?) Aparitic ciupericii *Kabatiella caulivora* (Kirchn.) Karak. in culturile de Trifoi Rosu din Transylvania. *Lucr. Sti., Inst. Agron. Cluj*, **18**: 315-317. (Cit. R. A. M. **43**:197).
- PINTO-GANHÃO, J. F.
1957 Notas sobre a desinfecção de sementes. *Agros*, **40**:5.
- ROBERTS, D. A.
1957 Observations on the influence of weather conditions upon severity of some diseases of alfalfa and red clover. *Phytopathology*, **47**, 10:626-628.
- SAMPSON, K.
1928 Comparative studies of *Kabatiella caulivora* (Kirchn.) Karak. and *Colletotrichum Trifolii* Bain. and Essary, two fungi which cause Red Clover anthracnose. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **13**, 1-2:103-142.

- SAMPSON, K. e WESTERN, J. H.
1954 *Diseases of British Grasses & Herbage Legumes*. II edit., British Mycological Society by Cambridge University Press.
- SHARVELLE, E. G.
1961 *The Nature and Uses of Modern Fungicides*. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
- SIGRIANSKI, A. M. e POTAPOVA, T. J.
1937 (Summary of the scientific research work of the Institute of Plant Protection for the year 1936). (*Publ. Off. Pan-Sov. V. I. Lenin Acad. Agric. Sci. Leningrad*). (Cit. R. A. M. 17:441).
- SMARODS, J.
1930 Latvijā noverotās Kultūraugiem Kaitīgās senes. *Lauksaimniecības Menesraksts*, 10, 31. (Cit. R. A. M., 10:223).
- SNEDECOR, G. W.
1945 *Métodos estatísticos*. Tradução da 3.^a edição. Direcção-Geral dos Serviços Agrícolas, Lisboa.
- STEVENS, F. L.
1921 *The fungi which cause Plant Diseases*. The Mac Millan Company, New York.
- TOMAZ, I. L.
1958 *Características fitofarmacêuticas de alguns fungicidas*. Rel. Final do Curso de Engenheiro Agrônomo.
- TOMSON, R.
1934 Ristikuvahk ja teised Ristiku haigused Eestis. *Agronomia*, 819, 24 pgs. (Cit. R. A. M., 14:241).
- VIALA, P. e BOYER, G.
1851 *C. R. Acad. Sci. Paris*, 112, 1148. (Cit. Cooke, 1962).
- WALKER, J.
1956 The reaction of subterranean clover varieties to scorch caused by *Kabatiella caulivora* (Kirchn.) Karak. *J. Aust. Inst. Agri. Sci.*, 22, 4:288-291.
- WELTZIEN, H. C.
1958 Stengelbrenner (*Kabatiella caulivora* (Kirchn.) Karak.) an Alexandrinerkle. *Nach. Bl. d. tsch. Pfl. Sch — Dienst (Braunschweig)*, *Stuttgart*, 10, 5:72-74. (Cit. R. A. M., 37:731).

