

ESPORULAÇÃO "IN VITRO", VIABILIDADE DOS CONÍDIOS E PATOGENICIDADE DE *MICROCYCLUS ULEI*

N.T.V. JUNQUEIRA¹, L. ZAMBOLIM², G.M. CHAVES² & L. GASPAROTTO¹

¹CNPQ/EMBRAPA, Caixa Postal 319, 69.000 – Manaus, AM. ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36.570 – Viçosa-MG.

(Aceito para publicação em 30/05/86)

RESUMO

JUNQUEIRA, N.T.V., ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M., & GASPAROTTO, L. Esporulação "in vitro", viabilidade dos conídios e patogenicidade de *Microcyclus ulei*. Fitopatol. bras. 11: 667-682, 1986.

Estudaram-se os efeitos da luz, idade da cultura a ser repicada, densidade de inóculo, de repicagens sucessivas e idade da cultura, na esporulação e germinação "in vitro" e patogenicidade de *Microcyclus ulei*. A luz aumentou a produção de conídios, principalmente em culturas de isolados esporulantes, incubadas a 24°C sob regime de luz alternada de ciclos de uma hora de luz (seis lâmpadas "Osram", 40W, luz-do-dia, a 40 cm das culturas), três horas de escuro, uma hora de luz, três horas de escuro, uma hora de luz e 15 horas de escuro, diariamente. A idade da cultura a ser repicada afetou a produção de conídios da cultura subsequente. As repicagens devem ser feitas de culturas com menos de duas semanas de idade. A viabilidade dos conídios decresce com o aumento da idade da cultura, sendo maior em culturas com idade de 10 dias.

As repicagens sucessivas não afetaram a germinação dos conídios nem a patogenicidade, mas afetaram drasticamente a produção de conídios.

As concentrações elevadas de inóculo provocaram auto-inibição na germinação dos conídios e redução no diâmetro das lesões, sendo a concentração de aproximadamente 2×10^5 conídios/ml indicada para inoculações.

*Trabalho conduzido no Departamento de Fitopatologia da UFV, sob apoios institucionais da EMBRAPA, SUDHEVEA, FINEP e CNPq.

ABSTRACT

Sporulation "in vitro", viability of conidia and pathogenicity
of *Microcyclus ulei*

Studies were made on the effects of age of culture, culture media, light, sub-culturing, age of culture for sub-culturing and level of inoculum of *M. ulei*, sporulation and germination "in vitro", and pathogenicity and disease progress. The sub-culturing was made with a culture macerated in distilled-sterilized water containing mycelia and conidia. The sub-culturing of cultures more than days old induced a reduction in sporulation of the subsequent cultures. The successive sub-culturing did not affect the pathogenicity and germination of conidia, but drastically reduced their production. High concentration of conidia caused a reduction in the diameter of lesions. The ideal concentration established for inoculation was 2×10^5 conidia/ml with a 70-80% germination rate. Light also affected the sporulation of the cultures.

INTRODUÇÃO

O cultivo de fungos fitopatogênicos visando à produção de inóculo para estudos sobre a variabilidade fisiológica, melhoramento visando à resistência a doenças, epidemiologia e biologia, em geral pode ser influenciado por alguns fatores como repicagens sucessivas, idade da cultura a ser repicada, concentração e idade dos esporos e luminosidade. Tais fatores podem afetar a esporulação "in vitro", patogenicidade e/ou viabilidade do inóculo.

A perda da patogenicidade e/ou redução na esporulação ou na viabilidade do inóculo por repicagens sucessivas são fenômenos comuns em fungos fitopatogênicos.

A luminosidade, assim como exposições das culturas em luz próxima ao ultravioleta, pode afetar a produção de conídios de *Microcyclus ulei* (Holliday, 1970; Chee, 1978; Schrader, 1980; Lieberer et al., 1983). Por outro lado, a idade da cultura afeta a produção (Junqueira et al., 1984, Schrader, 1980; Lieberer et al., 1983) e a viabilidade dos conídios (Chee, 1978; Junqueira et al., 1984). As informações na literatura sobre a influência dos demais fatores sobre a viabilidade do inóculo, patogenicidade e produção de conídios "in vitro" de *M. ulei* são escassas. Portanto, torna-se necessários estudos mais detalhados sobre estes fatores, visando

facilitar outros trabalhos de pesquisas com este fitopatógeno.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de repicagens sucessivas, idade da cultura a ser repicada, concentração e idade dos conídios e diferentes regimes de luz, na patogenicidade, viabilidade dos conídios e esporulação "in vitro" de *Microcyclus ulei* (*Fusicladium macrosporium* Kuyper).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Técnicas de Repicagem

Os fragmentos retirados de culturas de *M. ulei* com 12 dias de idade mantidas no meio de cultura M.4 descrito por Junqueira et al., (1984) foram macerados em tubos de ensaio, utilizando-se bastão de vidro flambado, na proporção de 1 grama de cultura contendo micélio, conídios e/ou conidióforos para 10 ml de água destilada esterilizada acrescida de cloranfenicol (50 mg do p.a./1 ou 50 ppm). Uma alíquota de 0,5 ml dessa suspensão foi retirada, depositada em frascos (erlenmeyers) de 125 ml contendo 20 ml de meio de cultura sólido (item 2.) e espalhada por toda a superfície do meio. Quando se utilizaram tubos de ensaio, os fragmentos de culturas foram pressionados contra a parede do tubo, até a maceração completa,

e espalhados sobre superfície do meio de cultura contido no mesmo tubo. Os frascos ou tubos de ensaios foram incubados a 24°C sob luz alternada (ciclos de 1 hora de luz a 2.000 lux-seis lâmpadas fluorescentes "Osram", 40W, luz-do-dia), 3 horas de escuro, 1 hora de luz, 3 horas de escuro, 1 hora de luz e 15 horas de escuro, diariamente até a avaliação.

2. Técnica de Inoculação

Os clones de seringueira provenientes do Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê (CNPDS), Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA) e Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) foram cultivados em sacos de plástico contendo 10 kg de uma mistura de 70% de solo e 30% de esterco. Após o terceiro lançamento foliar iniciaram-se as inoculações.

As inoculações foram feitas na face abaxial dos folíolos com idade de 6 a 8 dias (correspondente aos estádios B₁ ou B₂, descritos por Hallé et al., 1978) com uma suspensão de 2×10^5 conídios/ml provenientes de culturas com idade de 12 dias, mantidas nos meios compostos de 6 g de neopeptona, 10 g de sacarose, 20 g de ágar, 2 g de KH₂PO₄, 1 g de MgSO₄.7H₂O, 1.000 ml de água destilada, 2 ml de Panvit (produto dietético produzido pelo laboratório Teuto-Brasileiro Ltda.) adicionado antes ou após a autoclavagem do meio a 120°C por 10 minutos, pH ajustado para $5 \pm 0,2$ antes da autoclavagem. O isolamento e o cultivo de *M. ulei* foi feito conforme descrito por Junqueira et al., (1984).

Os conídios foram dispersos em água destilada. Utilizou-se um atomizador modelo H₃ (Paashe air Brush, Chicago, EUA) acionado por um compressor elétrico calibrado a 18-20 libras. A atomização foi efetuada até a cobertura completa dos folíolos por pequenas gotículas, até antes de atingir o ponto de escurimento.

Imediatamente após a inoculação, as plantas foram submetidas a uma câmara úmida ($97 \pm 2\%$ de umidade relativa) a 24°C sob regime de luz alternada de 12 horas de escuro e 12 horas de luz a 2.000 lux (Lâmpadas fluorescentes-40w-luz-do-dia) durante 24 horas. Após este período, as plantas foram retiradas da câmara úmida e mantidas por 8 dias em câmaras de crescimento a 24°C, 80-85% de umidade relativa, sob o mesmo regime de luz. Posteriormente, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação a $26 \pm 4^\circ\text{C}$ e $78 \pm 5\%$ de umidade relativa.

3. Técnica de Avaliação dos Ensaios "In Vitro"

A avaliação foi feita aos 12 dias após a repicagem, determinando-se o peso do micélio seco e o número de conídios por miligrama de micélio seco. Para determinar o número de conídios adicionou-se aos frascos ou tubos de ensaio um volume conhecido de água destilada, contendo tween-80 a 0,05%. A seguir os conídios foram removidos por meio de um pincel nº 14, filtrados em gaze e quantificados através de câmara de Neubauer.

Para se determinar o peso do micélio seco, adicionou-se aos frascos ou tubos de ensaio, contendo as culturas, certo volume de água e esta mistura foi submetida a 90-100°C, por 10 minutos, até a fusão do ágar. O micélio foi recolhido após a filtragem do meio em gaze fina e mantido a 70°C por 24 horas, antes da pesagem.

4. Influência de Diferentes Regimes de Luz na Esporulação de *Microcyclus ulei*

As culturas dos isolados provenientes de Una-BA, Mazagão-AP e Rio Branco-AC, com 12 dias de idade, foram repicadas para erlenmeyers de 125 ml contendo 20 ml de meio de cultura composto de 10 g de saca-

rose, 2 g de KH_2PO_4 , 20 g de ágar, 1,5 ml de Panvit, 250 g de batata cozida por 35 minutos, completando-se até 1.000 ml com água destilada. O pH foi ajustado para 5,0 antes da autoclavagem. Os componentes do meio de cultura foram misturados e autoclavados (120°C, 1 Atm) por 10 minutos. Após a repicagem, os frascos foram incubados a 24°C sob os seguintes regimes de luz: 1) 24 horas de escuro; 2) 12 horas de luz a 2.000 lux, mais 12 horas de escuro; 3) 1 hora de luz, mais 24 horas de escuro; 4) ciclos de 0,5 hora de luz, 1,5 hora de escuro, 0,5 hora de luz, 1,5 hora de escuro, 0,5 hora de luz e 19,5 horas de escuro, diariamente; 5) ciclos de 1 hora de luz, 3 horas de escuro, 1 hora de luz 3 horas de escuro, 1 hora de luz e 15 horas de escuro, diariamente. Utilizaram-se 6 lâmpadas fluorescentes "Osram", 40W, luz-do-dia a 40 centímetros das culturas. As culturas permaneceram sob estes regimes de luz até a avaliação, feita 12 dias após a repicagem.

5. Influência da Idade da Cultura de *Microcylus ulei* a ser Repicada na Esporulação da cultura subsequente

As culturas do isolado proveniente de Rio Branco-AC com 12 dias de idade foram repicadas para Erlenmeyers de 125 ml contendo 30 ml do meio de cultura descrito no item 4 e incubadas a 24°C, sob regime de luz alternado (ciclos de 1 hora de luz a 2.000 lux com lâmpadas fluorescentes, 40W, luz-do-dia, 3 horas de escuro, 1 hora de luz, 3 horas de escuro, 1 hora de luz e 15 horas no escuro, diariamente) por 90, 60, 30, 20 e 10 dias. Após este período, as culturas foram novamente repicadas, incubadas a 24°C sob o mesmo regime de luz até a avaliação.

A avaliação foi feita 12 dias após a repicagem, determinando-se o peso do micélio seco e o número de conídios produzidos/mg de micélio seco.

6. Influência da Idade da Cultura na Germinação dos Conídios de *Microcylus ulei*

As culturas dos isolados provenientes dos municípios de Jucuruaba-ES, Governador Valadares-MG, Una-BA, Ituberá-BA, Registro-SP, Rosario Oeste-MT, Benevides-PA, Rio Branco-AC, Manaus-AM, Humaitá-AM, Lábrea-AM, Eirunepé-AM, Ariquemes-RO, Boa Vista-RR e Magazão-AP, foram repicadas para tubos de ensaios contendo 5 ml do meio da cultura descrito no item 4 e incubados a 24°C sob o regime de luz descrito no item 1.

A avaliação foi feita aos 10, 12, 14, 16 e 18 dias após a repicagem, determinando-se a percentagem de conídios germinados, em água-ágar a 1,5%. Para avaliar a percentagem de conídios germinados, utilizaram-se três tubos de ensaios de cada isolado, para cada época descrita acima. Adicionaram-se 2 ml de água destilada esterilizada em cada tubo de ensaio, removendo-se os conídios por meio de um pincel de pelo fino. Após a filtragem em gaze fina previamente esterilizada os conídios provenientes de cada isolado foram quantificados através de uma câmara de Neubauer, e as concentrações ajustadas para 100.000 conídios/ml. Uma alíquota de 0,5 ml de suspensão de conídios de cada tubo de ensaio foi distribuída uniformemente em placa de Petri contendo 15 ml de água-ágar a 1,5%. As placas de Petri foram incubadas a 24°C na ausência de luz, até a avaliação, feita 12 horas após.

7. Efeito da Densidade de Esporos no Progresso da Doença

Os conídios do isolado provenientes de Una-BA, foram retirados de culturas com 12 dias de idade mantidas em frascos de 125 ml com 20 ml do meio de cultura descrito no item 2. Após a filtragem em gaze fina, estabeleceram-se as concentrações de 2.400.000, 1.200.000, 600.000, 300.000, 150.000, 75.000 e 37.500 conídios/ml.

De cada suspensão correspondente às concentrações retirou-se uma alíquota de 0,5 ml, que foi distribuída uniformemente na superfície de placas de Petri contendo 15 ml de água-ágar a 1,5%. As placas foram incubadas a 24°C na ausência de luz, e após 12 horas procedeu-se à avaliação, determinando-se a percentagem de conídios germinados.

O volume restante de cada concentração foi inoculado conforme descrito no item 2, em clones Fx 3925 e F 4542.

A avaliação foi feita 15 dias após a inoculação, determinando-se o número de lesões/8 cm² de superfície foliar e o diâmetro médio das lesões, que foi determinado por um medidor portátil de área, modelo LI-3000.

8. Influência de Repicagens Sucessivas na Patogenicidade, Esporulação e Germinação de Conídios "In Vitro" de *Microcyclus ulei*

As culturas dos isolados provenientes de Humaitá-AM, Rio Branco-AC, Mazagão-AP e Lábrea-AM foram submetidas a 2, 10, 20 e 30 repicagens sucessivas para tubos de ensaios contendo 5 ml do meio de cultura descrito no item 4 a intervalos de oito dias. Após a 1ª, 9ª, 19ª e 29ª repicagem, as culturas foram mantidas por 12 dias e repicadas novamente para frascos de 125 ml contendo 20 ml do meio de cultura descrito no item 4, completando-se então 2, 10, 20 e 30 repicagens sucessivas. Os frascos foram incubados a 24°C sob o regime de luz descrito no item 1. As culturas repicadas na 1ª, 9ª e 19ª repicagens foram, anteriormente obtidas através de reisolamento para evitar a permanência destas por mais de 15 dias em meio de cultura, o que poderia provocar uma redução na esporulação da cultura subsequente.

A avaliação foi feita 12 dias após a repicagem, determinando-se o número de conídios produzidos/mg de micélio seco e per-

centagem de conídios germinados em água-ágar a 1,5%.

Para avaliar o efeito das repicagens sucessivas na patogenicidade, conídios dos isolados de Humaitá-AM e Rio Branco-Acre foram inoculados, conforme descrito no item 2, nos clones de seringueira Fx 3864, IAN 2880, Fx 985, Fx 2804, IAN 3087, Fx 3925, IAN 6323 e Fx 2261.

A avaliação foi feita 15 dias após a inoculação, determinando-se o número de lesões/8 cm² de superfície foliar, diâmetro médio das lesões e percentagem de lesões esporuladas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Influência de Diferentes Regimes de Luz na Esporulação de *Microcyclus ulei*

Os dados apresentados pela Tabela 1 indicam que a luminosidade pode aumentar a produção de conídios de *M. ulei*, principalmente pelos isolados "esporulantes". A luz não afetou a produção de conídios do isolado MZ "pouco esporulante". Para o isolado "EIR" (esporulante), maiores produções de conídios foram obtidas quando as culturas foram mantidas sob os regimes de luz 3, 4 e 5. Esta produção foi aproximadamente duas vezes maior do que a da cultura mantida no escuro. O regime 2 também aumentou a produção de conídios em relação à cultura mantida no escuro (regime 1). A produção de conídios pelas culturas do isolado RB (esporulante) foi maior nos regimes 4 e 5. A produção de conídios por este isolado também foi aumentada nos regimes 2 e 3 em relação ao regime 1 (escuro).

Holliday (1970) relatou aumento na produção de conídios de *M. ulei*, após a irradiação das culturas com mais de 14 dias de idade, por 30 a 40 minutos com luz de comprimento de onda próximo a ultravioleta (300-365 nm). Chee (1978) sugeriu 1 hora de luz diariamente.

Schrader (1980) relata que culturas de *M. ulei* com 14 a 16 dias de idade mantidas

Tabela 1 — Produção de conídios de *Microcyclus ulei* em diferentes regimes de luz. UFV, Viçosa, 1985.

Regime de Luz**	Conídios produzidos/mg de micélio seco		
	Isolados de <i>M. ulei</i>		
	EIR*	RB	MZ
1	132.157 ± 11,02	106.000 ± 8,02	33.223 ± 5,20
2	236.732 ± 13,20	178.323 ± 11,03	31.428 ± 4,20
3	248.000 ± 11,42	208.506 ± 12,03	33.530 ± 6,04
4	244.600 ± 15,01	220.000 ± 10,60	30.300 ± 7,06
5	247.370 ± 15,31	233.334 ± 13,60	32.938 ± 5,40

Os números representam a média de quatro repetições.

* EIR = Isolado de *M. ulei* proveniente de Eirunepé-AM; RB = Isolado de Rio Branco-AC; MZ = Isolado de Mazagão-AP.

** 1) 24 horas de escuro; 2) 12 horas de luz + 12 horas de escuro; 3) 1 hora de luz + 23 horas de escuro; 4) ciclos de 0,5 hora de luz, 1,5 hora de escuro, 0,5 hora de luz, 1,5 hora de escuro, 0,5 hora de luz e 19,5 horas de escuro, diariamente; 5) ciclos de 1 hora de luz, 3 horas de escuro, 1 hora de luz, 3 horas de escuro, 1 hora de luz e 15 horas de escuro, 1 hora diariamente.

em BSA-0,5% aumentaram significativamente a produção de conídios, quando iluminadas por um ou dois dias com ciclos de 0,5 hora de luz de uma lâmpada fluorescente 40W, a intervalos de 1,5 hora de escuro, 0,5 hora de luz, 1,5 hora de escuro, 0,5 hora de luz e 19,5 horas de escuro. Por outro lado, Lieberei et al., (1983) verificaram que culturas de *M. ulei* mantidas por 14 dias no escuro, quando expostas a 90 minutos de luz diariamente por um ou dois dias, aumentaram em 13 a 24 vezes a produção de conídios em relação a culturas iluminadas por 90 minutos diariamente e 45 a 82 vezes quando comparadas com a produção de conídios de culturas mantidas no escuro.

No presente trabalho, as culturas dos isolados "esporulantes" iluminadas por 12 dias produziram aproximadamente o dobro de conídios das culturas mantidas no escuro. Junqueira et al., (1984) analisaram a produção de conídios de *M. ulei* em culturas com diferentes idades mantidas em vários meios

de culturas, sob o regime de luz número 5, descrito no item 4. A maior produção de conídios ocorreu em culturas com 9 a 12 dias de idade mantidas em meios de culturas contendo os aminoácidos treonina, cloridrato de lisina e triptofano ou contendo um complexo de vitaminas, sais minerais e aminoácidos. As culturas mantidas no meio BDA-02% e BSA-05% (utilizado por Schrader, 1980) produziram mais conídios aos 15 dias de idade. Schrader (1980) relata que as culturas de *M. ulei* apresentam um período de fotossensibilidade entre o 14º e 17º dia após a repicagem. Neste período ocorre a maior produção de conídios. Estes resultados indicam que o meio de cultura provavelmente exerce alguma influência no período de fotossensibilidade e produção de conídios por *M. ulei*. Lieberei et al., (1983) não constataram efeito da luz no crescimento vegetativo de *M. ulei*, por outro lado, neste ensaio, verificou-se um ligeiro aumento no peso do micélio seco das culturas mantidas

no escuro. A produção de conídios pelo isolado "não esporulante" não foi afetada pela luz. Este fato pode ser devido ao período fotossensível deste isolado que pode estar antes ou após os 12 dias, ou devido à insensibilidade deste à luz. Lieberei et al., (1983) verificaram que culturas de *M. ulei* com 30 dias de idade não formaram conídios, mesmo quando expostas à luz. Junqueira et al., (1984) também verificaram que a produção de conídios de *M. ulei* decresceu em culturas com mais de 15 dias de idade.

2. Influência da Idade da Cultura de *Microcycclus ulei* a ser Repicada, na Esporulação da Cultura Subseqüente

Na Tabela 2 são apresentados os resultados referentes à produção de micélio seco e produção de conídios/mg de micélio seco, em culturas provenientes de repicagens de culturas de *M. ulei* com diferentes idades.

Os resultados mostram que as culturas provenientes de culturas mais velhas produzem menos conídios do que as provenientes de culturas novas. A maior produção de conídios foi obtida em culturas provenientes de culturas com idade de 10 e 20 dias. A produção de conídios na cultura subseqüente foi menor quando as repicagens foram feitas de culturas com mais de 30 dias de idade. Esta queda na produção de conídios na cultura subseqüente pode ser devida a um enfraquecimento do micélio e/ou redução na produção ou no potencial e germinação dos conídios.

Junqueira et al., (1984) observaram que os conídios liberados dos conidióforos germinam na própria cultura, às vezes originando um frágil crescimento micelial com conidióforos que produzem pouco e pequenos conídios elipsóides, sem septos, comuns em culturas com mais de 20 dias de idade.

Além da redução na produção e potencial, a viabilidade dos conídios também decresce em culturas com mais de 15 dias de idade, certamente por envelhecimento ou auto-inibição. Quando as culturas são repi-

cadadas para BDA ou para outros meios inadequados, após algum tempo é comum observar-se a formação de um estroma negro ausente de micélio fértil, que cresce lentamente sob a superfície do meio de cultura. Este estroma negro não produz conídios e quando transferido para outro meio de cultura adequado dificilmente volta a produzir micélio fértil. Na Tabela 2 observa-se que culturas com idade de 30 dias, mantidas em BDA, quando repicadas para um meio de cultura adequado, não produziram conídios, e sim alguns estromas negro e/ou micélios inférteis.

O não desenvolvimento do micélio fértil em culturas de *M. ulei* mantidas em meios de cultura inadequados, pode ser devido à autólise ou encerramento da produção destes por falta ou esgotamento de nutrientes no meio de cultura. A falta de um substrato adequado para a manutenção do estágio conidial do *M. ulei* pode induzir à formação do estágio picnidial e/ou ascógeno. Este fato pode ser observado em folhas de seringueira. As folhas com mais de 14 dias de idade são imunes ao *M. ulei*, ao passo que folhas com até oito dias de idade constituem substratos adequados para o patógeno. As folhas com idade de nove a 13 dias permitem a infecção, mas não ocorre o estágio conidial, e sim a forma picnidial e/ou ascógena. Em meios de culturas inadequados é possível que depois de algum tempo possa ocorrer um estímulo para a formação de picnídios e/ou pseudotécios, mas, em razão da falta de algum nutriente e/ou hormônio essencial, tais estruturas não são formadas, limitando-se apenas à produção dos estromas estéreis.

As culturas com idade de 90 dias foram submetidas a cinco repicagens sucessivas e verificou-se que a partir da terceira repicagem, a produção de conídios foi aproximadamente igual àquela obtida de culturas provenientes de repicagens das culturas com idade de 10 a 20 dias. Após a terceira repica-

Tabela 2 — Produção de conídios em culturas de *Microcyclus ulei****, repicadas de culturas com diferentes idades. UFV, Viçosa-MG, 1985.

Idade da cultura repicada (dias)	Peso do micélio seco/frasco (mg)	Conídios produzidos/mg de micélio seco
10	37,5	198,868
20	37,3	177,634
30	27,5	138,868
60	27,5	33,030
90	32,5	23,208
30*	8,3	0

Os números representam a média de quatro repetições.

* Culturas estromáticas (sem micélio fértil) mantidas em BDA.

** Isolado proveniente de Rio Branco-AC.

gem sucessiva já havia mais micélio fértil do que estroma estéril.

Quando os estromas estéreis, mantidos em BDA (meio inadequado), são repicados para um meio de cultura adequado, o estroma é mantido e raramente ocorre formação de micélio fértil e conídios. Esta observação indica que alguma “substância repressora” pode ter sido induzida pela falta de algum nutriente no meio. O excesso de sacarose ou glicose no meio de cultura parece induzir à produção de estromas estéreis. A maior ou menor quantidade desta substância, produzida ou acumulada no estroma, pode determinar a presença ou ausência de micélio fértil. A menor produção de conídios/mg de micélio seco em culturas provenientes de repicagens de culturas com mais de 30 dias de idade (Tabela 2) pode também ter sua razão de ser em uma “repressão parcial”.

As culturas com idade de 90 dias, mantidas no meio de cultura adequado, aparentemente não sofreram autólise no micélio, mas houve formação de algum estroma estéril sob a superfície do meio, e possivelmente, formação de alguma “substância repressora”, porque, após a repicagem desta cultura, observou-se pouca formação de micélio e conídios e maior formação de estromas.

Com as repicagens sucessivas, aumentou a produção de micélio fértil e conídios e reduziu-se a produção de estromas.

Com base nestes resultados e por observações visuais sugere-se que as repicagens de culturas de *M. ulei*, visando à produção de inóculo, devem ser feitas de culturas com menos de 15 dias de idade mantidas em meios adequados.

3. Influência da Idade da Cultura na Germinação dos Conídios Produzidos

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam que a idade da cultura afeta a germinação dos conídios de todos os isolados de *M. ulei* estudados. Os conídios obtidos de culturas com idade de 18 dias foram três a dez vezes menos viáveis do que aqueles obtidos de culturas com idade de 10 dias. A viabilidade dos conídios de todos os isolados de *M. ulei* apresentados na Tabela 3 foi inversamente proporcional à idade das culturas.

Em culturas com idade de 10 dias, as maiores percentagens de conídios germinados foram verificadas nos isolados JUC, ITB, CNP e RB e as menores percentagens foram verificadas nos isolados UNA e EIR.

Tabela 3 — Percentual de germinação de conídios de vários isolados de *Microcyclus ulei*, provenientes de culturas com diferentes idades. UFV, Viçosa-MG, 1985.

Isolados	Procedência	Idade das culturas (dias)				
		10	12	14	16	18
REG	Registro — SP	83,2	67,7	60,2	51,7	33,3
ROS	Rosário Oeste — MT	83,0	64,2	51,3	43,0	26,4
RB	Rio Branco — AC	88,2	84,6	72,4	66,4	28,7
RBa	Rio Branco — AC	83,0	79,5	53,0	25,6	14,7
BV	Boa Vista — RR	86,5	66,3	54,6	42,0	34,3
UNA	Una — BA	70,5	52,4	42,3	33,6	18,1
ITB	Ituberá — BA	93,5	89,0	70,6	48,0	22,6
JUC	Jucuruaba — ES	97,0	88,7	67,0	47,0	25,4
BEN	Benevides — PA	88,8	85,8	68,0	50,0	31,0
ARE	Ariquemes — RO	93,2	86,0	73,0	26,4	8,4
LAB	Lábrea — AM	79,8	38,6	26,7	18,1	6,7
HM	Humaitá — AM	80,0	70,4	50,6	48,7	18,9
EIR	Eirunepé — AM	78,5	71,3	52,3	45,4	26,3
CNP	Manaus — AM	92,3	84,2	68,0	50,6	30,2
CV	G. Valadares — MG	82,0	73,2	61,0	41,3	31,0
MZ	Mazagão — AP	85,0	69,0	57,0	40,0	22,0

Os números representam a média de quatro repetições.

Em culturas com idade de 18 dias as maiores percentagens de germinação foram verificadas nos isolados BV, REG, BEN, GV e CNP.

Entre os isolados estudados, a variação na viabilidade dos conídios foi evidente em todas as idades testadas. A queda na viabilidade de conídios de *M. ulei* com o aumento da idade da cultura foi também relatada por Chee (1978), que verificou que conídios de culturas com uma semana de idade apresentavam 55-65% de germinação, reduzindo para 15% em culturas com três semanas de idade. A queda na germinação de conídios obtidos de culturas mais velhas certamente se deve à auto-inibição (Holliday, 1970) ou ao próprio envelhecimento.

Nas culturas com idade de 18 dias observou-se, na maioria dos isolados, grande quantidade de conídios pequenos e monocelulares em relação aos conídios com duas ou mais células, ao passo que as culturas

com idade de 10 ou 12 dias apresentaram pequena quantidade de conídios monocelulares em relação aos conídios com duas ou mais células.

Os conídios com duas ou mais células obtidos de culturas da maioria dos isolados com mais de 18 dias de idade apresentaram baixo percentual de germinação, em relação aos conídios monocelulares. Os conídios monocelulares provavelmente são produzidos a partir de um frágil crescimento micelial com conidióforos velhos ou oriundos de micélio senescente ou enfraquecido em virtude do esgotamento do meio de cultura.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3, sugere-se que os conídios a serem utilizados em trabalhos, nos quais a sua viabilidade seja importante, devem ser retirados de culturas com 10 a 12 dias de idade. A viabilidade dos conídios obtidos de culturas com idade de 12 dias é menor do que a

dos conídios obtidos de culturas com menos de 10 dias de idade, mas, conforme relatado por Junqueira et al., (1984), a maior produção de conídios ocorre em culturas com 12 dias de idade. Este aumento na produção de conídios em culturas com 12 dias pode compensar a menor viabilidade desses conídios.

4. Efeito da Densidade do Inóculo no Progresso da Doença

Os resultados apresentados pela Tabela 4 mostram uma redução no percentual de conídios germinados com a elevação da concentração do inóculo. Nas concentrações acima de 600.000 conídios/ml de inóculo, a percentagem de conídios germinados é menor, em relação às concentrações abaixo de 300.000 conídios/ml. A germinação dos conídios nas concentrações de 37.500 a 300.000 conídios/ml não foi afetada. Estes resultados evidenciam a existência de auto-inibição na germinação dos conídios em concentrações acima de 300.000 conídios/ml. Holliday (1970) relata auto-inibição na germinação de conídios de

M. uliei em concentrações acima de 450.000 conídios/ml de inóculo.

O número de lesões/8 cm² de superfície foliar, apresentado pela Tabela 4, decresce gradualmente com a redução na concentração do inóculo. O decréscimo do número de lesões foi menos acentuado em concentrações acima de 300.000 conídios em ambos os clones, possivelmente em virtude da redução na germinação por auto-inibição. O número de lesões foi mais elevado no clone F 4542 (*H. benthamiana*) em todas as concentrações (Tabela 4). O maior número de lesões neste clone pode ser devido a uma maior quantidade de pêlos existentes nos folíolos jovens e/ou devido ao menor desenvolvimento foliar. Os folíolos do clone F 4542, além de apresentarem grande quantidade de pêlos, são menores do que os folíolos do Fx 3925 quando adultos. A presença de pêlos pode melhorar a retenção dos conídios na superfície foliar e a molhabilidade. O menor desenvolvimento do folíolo contribui para uma menor diluição do número de lesões.

Chee (1976) atomizou discos de folhas com 1,5 cm de diâmetro, de dois clones de

Tabela 4 — Efeito da densidade do inóculo no progresso da doença. UFV, Viçosa-MG, 1985.

Conídios/ml*	Germinação "In Vitro" (%)	Lesões/8 cm ² de superfície foliar		Diâmetro médio das lesões (mm)	
		Clones			
		Fx 3925	F 4542	Fx 3925	F 4542
2.400.000*	42,6	78,40	96,3	0,64	0,54
1.200.000	61,4	56,00	69,0	1,04	0,76
600.000	67,2	38,80	51,3	1,54	0,92
300.000	72,6	26,60	39,1	2,03	1,31
150.000	76,0	17,36	30,4	2,22	1,69
75.000	76,7	8,80	17,1	2,38	2,08
37.500	76,6	4,07	7,7	2,43	2,14

Os números representam a média de quatro repetições. Isolados de *M. uliei* proveniente de Una-Bahia.

seringueira nas concentrações de 10^6 , 10^5 , 4×10^4 , 8×10^3 e $1,6 \times 10^3$ confídios/ml de inóculo, constatando um decréscimo gradual no número de lesões com a redução concentração do inóculo. O número de lesões também diferiu de clone para clone.

Os resultados referentes ao efeito da densidade do inóculo sobre o diâmetro médio das lesões (Tabela 4) mostram que o diâmetro médio das lesões em ambos os clones decresceu com o aumento da concentração do inóculo. As concentrações abaixo de 150.000 confídios/ml não afetaram o diâmetro das lesões. O maior diâmetro de lesões para ambos os clones foi obtido das concentrações de 37.500 e 75.000 confídios/ml de inóculo. Chee (1976) constatou que o diâmetro médio das lesões não foi afetado pelo aumento na densidade de inóculo. Este autor verificou que o diâmetro da lesão no clone 4/5 obtido pela maior concentração de inóculo foi de 0,86 mm e pela menor concentração foi de 0,864 mm. Para o clone 270 o diâmetro obtido foi de 0,683 mm para a maior concentração e 0,663 mm para a menor concentração. A redução no diâmetro médio das lesões com o aumento da densidade do inóculo pode ser devida a substâncias tóxicas elaboradas na interação patógeno-hospedeiro, menor fluxo de nutrientes da célula do hospedeiro para o patógeno pela redução da área de tecido do hospedeiro disponível, ou em virtude da auto-inibição por substâncias tóxicas do próprio patógeno.

O diâmetro médio de lesões pode também ser afetado pela idade dos confídios. Confídios do isolado de Una retirados de culturas com idade de 9 e 25 dias, quando inoculados em folíolos diferentes da mesma folha do clone IAN 6323, apresentaram respectivamente lesões com diâmetro médio de 2,6 mm e 1,53 mm.

A redução no diâmetro das lesões iniciadas pelos confídios oriundos das culturas com idade de 25 dias pode ser devida ao potencial do próprio confídio. Os confídios provenientes de culturas com mais de 20

dias de idade são na maioria pequenos e unicelulares, com baixo potencial infectivo. Os confídios ao germinarem geralmente emitem um ou mais tubos germinativos. O tubo germinativo pode emitir ramificações com estruturas de penetração nas extremidades. O maior ou menor número de ramificações emitidas pelo tubo germinativo, juntamente com o potencial infectivo do confídio, determinará um maior ou menor diâmetro da lesão. Os confídios provenientes das culturas com idade de nove dias têm na maioria duas ou mais células e são vigorosos. Esses confídios, quase sempre, emitem dois ou mais tubos germinativos vigorosos que geralmente produzem várias estruturas de penetração, além de aumentarem a capacidade de colonização, e, conseqüentemente, incitarem lesões com diâmetro maior do que aquelas incitadas pelos confídios pequenos e unicelulares.

A redução do potencial dos confídios de *M. ulei* pode ocorrer "in vivo". Chee (1976) verificou que em lesões novas a proporção de confídios com duas células é maior do que lesões velhas. A ramificação do tubo germinativo também pode ser verificada em meio de cultura ou em água-ágar, a 1,5%, mas são mais alongadas do que "in vivo".

Pelos resultados apresentados na Tabela 4, sugere-se que a densidade de inóculo de *M. ulei* a ser utilizada em inoculações deve ser de aproximadamente 200.000 confídios/ml, com aproximadamente 70% de germinação.

5. Efeito de repicagens sucessivas na patogenicidade, esporulação e germinação "in Vitro" de confídios de *Microcyclus ulei*

Os resultados apresentados pela Tabela 5 mostram que as repicagens sucessivas não afetaram o percentual de confídios germinados dos quatro isolados de *M. ulei*, tendo havido, porém, diferença na germinação dos confídios entre os isolados.

A produção de confídios foi drasticamente afetada pelas repicagens sucessivas

Tabela 5 — Produção e germinação de conídios de *Microcyclus ulei* provenientes de culturas submetidas a 2, 10, 20 e 30 repicagens sucessivas. UFV, Viçosa-MG, 1985.

Isolados	Número de repicagens	Conídios produzidos/mg de micélio seco	Germinação dos conídios (%)
HM	2	105.055*	76,3*
	10	105.680	70,5
	20	96.186	76,4
	30	82.104	74,2
RB	2	98.020	82,5
	10	146.000	87,7
	20	262.300	80,8
	30	260.931	83,0
MZ	2	55.200	85,0
	10	43.571	87,8
	30	18.333	84,3
LAB	2	145.000	73,4
	10	143.700	70,5
	30	86.300	76,0

*Os números representam a média de três repetições.

HM = isolado de Humaitá-AM; RB = isolado de Rio Branco-AC; MZ = isolado de Mazagão-AP; LAB = isolado de Lábrea-AM.

(Tabela 5). Em todos os isolados, exceto com relação ao isolado RB, a produção de conídios decresceu com o aumento do número de repicagens sucessivas. A produção de conídios começou a cair a partir de 10 repicagens sucessivas, sendo mais acentuada após 20 repicagens sucessivas. Nas culturas do isolado MZ (pouco esporulante), 10 repicagens sucessivas foram suficientes para reduzir drasticamente a esporulação. As culturas deste isolado inicialmente apresentavam estromas escuros com pouco micélio, e baixa produção de conídios em relação aos demais isolados. A partir da sexta repicagem sucessiva, começaram a surgir pontos miceliais brancos, que se intensificaram a partir da oitava repicagem sucessiva. Após a 20ª repicagem sucessiva, as culturas

apresentavam-se totalmente cobertas por um micélio branco, pouco esporulante. Os estromas escuros só apareciam em culturas com mais de 30 dias de idade.

O crescimento micelial claro que surgiu nessas culturas pode ser uma variante (pouco esporulante) com maior capacidade de crescimento em meio de cultura do que o isolado original. As repicagens sucessivas possibilitaram o maior desenvolvimento dessa variante nas culturas, eliminando totalmente o isolado original.

Holliday (1970) relata que a esporulação e a patogenicidade de *M. ulei* provavelmente decrescem com o cultivo prolongado e que podem ocorrer variações morfológicas incluindo formas estéreis. Este autor relatou a presença de micélios não esporulantes em

isolados pouco pigmentados. Segundo Turian (1977), citado por Schrader (1980) e por Lieberei et al. (1983), para a formação de esporos é necessária a respiração dependente de citocromos; portanto, a ausência de esporulação indica defeitos na respiração dependente de citocromos. As culturas de *Neurospora crassa* com tais defeitos são denominadas de mutantes "poky" (enfezado). Conforme descrito por Schrader (1980) e Lieberei et al. (1983), os isolados de *M. ulei* não esporulantes podem apresentar defeitos na respiração dependente de citocromos, semelhantes ao mutante "poky" de *N. crassa*. A energia necessária para o crescimento dos isolados não esporulantes pode ser fornecida pelo metabolismo de fermentação.

Os conídios produzidos por essas culturas claras, quando inoculados em clones suscetíveis, produziram lesões com massa fúngica também clara e com poucos conídios. O reisolamento direto apresentou, em meios de cultura, crescimento micelial também claro e com pouca esporulação.

O isolado RB (Tabela 5) foi o único que teve a sua produção de conídios aumentada com as repicagens sucessivas. As culturas deste isolado apresentaram coloração marrom-oliva até a 5ª repicagem. A partir da 6ª repicagem, começaram a surgir as variantes claras, que progressivamente aumentaram com as repicagens sucessivas (Figura 1). A partir da 15ª repicagem sucessiva, as culturas pigmentadas já haviam desaparecido totalmente. O aumento na produção de conídios deste isolado com as repicagens sucessivas, pôde ser devido ao surgimento de uma variante mais esporulante do que o isolado original, com maior capacidade de desenvolvimento em meio de cultura. A patogenicidade deste isolado não foi afetada (Tabela 6) quando comparada com a patogenicidade do isolado original (ausente de variantes) com duas repicagens sucessivas. A patogenicidade da cultura repicada por 30 vezes (formada por variante ou

mutante) e da cultura original repicada por duas vezes (ausente de variante) foi semelhante, quando conídios (2×10^5 /ml) foram atomizados em folíolos de oito clones de seringueira. (Tabela 6).

Em se tratando de um mutante com maior capacidade de desenvolvimento em meio de cultura ou obtido por várias repicagens sucessivas, é possível que ambos possam diferir em virulência, se foram testados em um maior número de clones.

As culturas do isolado RB com mais de 15 repicagens sucessivas, formadas totalmente por variantes ou mutantes, produzem conídios deformados, alongados e com uma proporção mais elevada de conídios multiseptados (2-6 septos). O percentual de germinação desses conídios foi semelhante ao da cultura original (com duas repicagens sucessivas). Observou-se que alguns desses conídios podem emitir até quatro tubos germinativos. Tanto nas culturas deste isolado como do isolado MZ, após 20 repicagens, houve ligeira formação de estromas pigmentados.

As lesões formadas pela inoculação de culturas claras do isolado RB apresentaram massa fúngica clara, principalmente no clone Fx-2261 e IAN 6323.

O reisolamento direto apresentou em meio de cultura crescimento micelial claro, inicialmente com pouca esporulação. Esta esporulação foi aumentada a partir da 2ª repicagem. Com relação ao isolado MZ ocorreu o contrário. Estas observações indicam a ocorrência de duas variantes ou mutantes diferentes.

Os conídios do isolado RB retirado de lesões com massa fúngica clara incitada no clone Fx 2261 foram reinoculados no mesmo clone e reproduziram o mesmo tipo de lesão. Quando o reisolamento foi feito, o crescimento micelial claro foi mantido. Estas observações indicam que tais características podem ser irreversíveis.

A queda na produção de conídios pelo isolado HM também foi evidente. As varian-

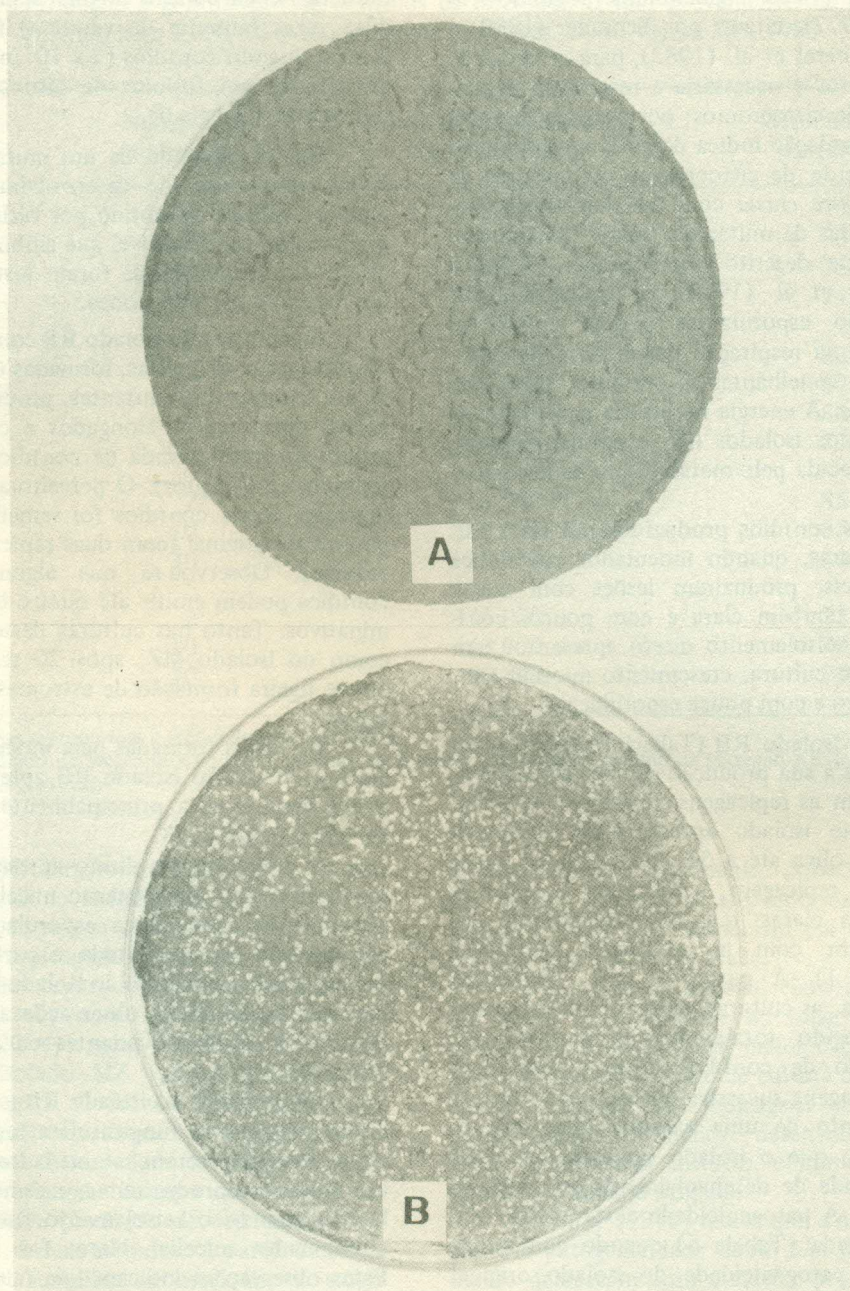


Fig. 1 - Culturas de *Microcyclus ulei* em meio de cultura M.4. A. Cultura normal; B. Cultura submetida a 15 repicagens sucessivas.

Tabela 6 - Patogenicidade de *Microcyclus ulei* após duas e trinta repicagens sucessivas. UFV, Viçosa-MG.

Clones	Número de lesões/9 cm ² de superfície foliar			Diâmetro médio das lesões (mm)						Lesões com esporos (%)		
	HM ₂	HM ₃₀	RB ₂	RB ₃₀	HM ₂	HM ₃₀	RB ₂	RB ₃₀	HM ₂	HM ₃₀	RB ₂	RB ₃₀
Fx 3864	16,30	13,30	12,00	13,7	2,10	2,30	2,00	1,80	95	100	92	85
IAN 2880	10,10	11,00	7,6	8,6	3,60	3,70	0,63	0,54	100	100	0	0
Fx 985	13,4	12,3	12,7	11,8	1,00	1,20	4,00	3,80	0	0	92	100
Fx 2804	16,0	16,3	10,2	9,7	1,25	1,30	1,20	0,86	95	100	0	0
IAN 3087	12,1	11,4	11,8	13,7	1,80	2,00	2,80	3,60	100	100	87,5	95
Fx 3925	12,6	11,4	9,6	12,1	2,20	2,20	2,80	3,20	100	100	0	0
IAN 6323	14,5	12,6	10,2	13,4	2,75	2,10	2,30	2,60	100	100	100	100
Fx 2261	10,5	11,2	10,7	8,3	2,30	1,87	1,71	2,75	56,2	50,6	59,3	67,5

Os números representam a média de três a seis repetições.

HM₂ e HM₃₀ = isolado de Humaitá-AM, submetido respectivamente a duas e trinta repicagens sucessivas.

RB₂ e RB₃₀ = isolado de Rio Branco-AC, submetido respectivamente a duas e trinta repicagens sucessivas.

tes claras começaram a surgir a partir da 10ª repicagem, mas foram pouco frequentes até a 30ª repicagem. A esporulação do isolado "Lab" também foi drasticamente reduzida em cultura com 30 repicagens, mas nenhuma forma ou variante clara foi observada. Observaram-se também algumas variantes pigmentadas (coloração escura) não esporulantes.

As culturas dos isolados de *M. ulei*, em sua maioria, podem estar associadas com bactérias que aparentemente não afetam as culturas repicadas por poucas vezes. Muitas repicagens sucessivas favorecem o desenvolvimento destas bactérias, que podem modificar as características morfológicas da cultura e afetar drasticamente a produção de conídios e ainda prejudicar as inoculações. Os tratamentos com antibióticos comuns e/ou culturas monospóricas não eliminaram esta bactéria das culturas. Um isolado proveniente de Jucuruaba-ES, com três repicagens sucessivas, era altamente esporulante, produzindo aproximadamente 450.000 conídios/mg de micélio seco (Junqueira, 1985). Após a 8ª repicagem, a produção de conídios reduziu-se drasticamente para 150.000 conídios/mg de micélio seco. A massa fúngica e os conídios deste isolado apresentavam-se com grande quantidade de bactérias.

Os resultados apresentados pela Tabela 6 mostram que a patogenicidade dos isolados de *M. ulei* "HM" e "RB" não foi afetada pelas repicagens sucessivas. O isolado HM não esporulou no clone Fx 985 e o isolado RB não esporulou nos clones Fx 3925, Fx 2804 e IAN 2880. Langdon (1965) relata perda da patogenicidade de *M. ulei* após um prolongado período de cultivo, ressaltando a necessidade de inoculações no hospedeiro, seguidas pelo reisolamento. Miller (1966) também verificou que a patogenicidade de *M. ulei* decresce após seis meses de cultivo e as culturas tomam-se avirulentas no final de 12 meses de cultivo. Por outro lado, Gonsalves (1970) obteve abundante esporulação em folhas inoculadas

com esporos de culturas submetidas a repicagens sucessivas por quase um ano.

Com base nos resultados apresentados pela Tabela 5, sugere-se que as culturas de *M. ulei* não devem ser repicadas por mais de

10 vezes, porque pode acarretar redução na esporulação, aparecimento de variantes, formas estéreis não esporulantes e aumento na população de bactérias, principalmente aquelas associadas ao patógeno.

LITERATURA CITADA

- CHEE, K.H. Assessing susceptibility of *Hevea* clones to *Microcyclus ulei*. Ann. Appl. Biol., 84: 135-145. 1976.
- CHEE, K.H. Factors affecting discharge, germination and viability of spores of *Microcyclus ulei*. Trans. Br. Mycol. Soc., 66: 499-504. 1986.
- CHEE, K.H. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: Culture of *Microcyclus ulei*. Trans. Br. Mycol. Soc., 70: 341-344. 1978.
- GONSALVES, J.R.C. Recentes pesquisas sobre doenças da seringueira. II. Resistência de clones de seringueira provenientes do Brasil e da America Central a "isolares" de *Dothidella ulei* sob condições de casa de vidro. Ser. Fitoec. Inst. Agron. N., Belém, 1: 24-43. 1970.
- HALLÉ, F.; OLDEMAN, R.A.A. E TOMLINSON, P.B. Tropical trees and forest. Berlin, springer-verlag, 1978. 441p.
- HOLLIDAY, P. South american leaf blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. Phytopathological papers, 12: 1-31. 1970.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L.; ROMEIRO, R.S. & GASPAROTTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas da seringueira. Revista Ceres, 31: 322-331. 1984.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L.; ALFENAS, A.C. & GASPAROTTO, L. Efeito do número de repicagens, idade da cultura armazenada e luminosidade sobre a esporulação e patogenicidade de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas da seringueira. Fito-patol. bras. 9: 328. 1984.
- LANGDON, K.R. Relative resistance or susceptibility of several clones of *Hevea brasiliensis* and *H. brasiliensis* x *H. benthamiana* to two races of *Dothidella ulei*. Plant. Dis. Reprt., 49: 12-14. 1965.
- LIBEREI, R.; SCHRADER, A.; BIEHL, B. & CHEE, K.H. Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* cultures. J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 31: 227-236. 1983.
- MILLER, J.W. Differential clones of *Hevea* for identifying races of *Dothidella ulei*. Plant. Dis. Reprt., 38: 187-190. 1966.
- SCHRADER, A. Cyanideinfluss auf sporenkeimung und mycelentwicklung bei *Microcyclus ulei*, dem Erreger der Sudamerikanische Blatt-Krankheit auf *Hevea*. Braunschweig, Botan. Inst. Tu, 1980 54p. (Diplomarbeit).