

The results suggest that propagules produced on above-ground parts of the hosts contribute to the soil-borne inoculum. Spores would be deposited on or in the soil by wind and rain. Whether the propagules in the soil play a significant role in the occurrence and severity of common root rot in plants on which they were produced is not known. However, they may be very important in causing the disease in a subsequent crop. Since sporulation can occur on subterranean plant parts (Chinn, 1965), the magnitude of the contribution of the propagules produced above and below ground to the total soil population is also not known. Because of the large number of conidia on the foliar parts, it seems likely that following the cultivation and the incorporation of stubble, most of the soil inoculum would be derived from the conidia produced above ground.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ines Fatima Mandelli for laboratory and field assistance.

LITERATURE CITED

- CHINN, S. H. F. Changes in the spore population of *Cochliobolus sativus* in Saskatchewan wheat fields. *Can. J. Plant Sci.* 45: 288 - 291. 1965.
- CHINN, S. H. F. *Cochliobolus sativus* conidia populations in soils following various cereal crops. *Phytopathology* 66: 1082 - 1084. 1976.
- CHINN, S. H. F. Influence of fungicide sprays on sporulation of *Cochliobolus sativus* on cypress wheat and on conidial population in soil. *Phytopathology* 67: 133 - 138. 1977.
- CHINN, S. H. F. and TINLINE, R. D. Spore germinability in soil as an inherent character of *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 53: 1109 - 1112. 1963.
- CHINN, S. H. F. and TINLINE, R. D. Inherent germinability and survival of spores of *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 54: 349 - 352. 1964.
- CHINN, S. H. F., SALLANS, B. J. and LEDINGHAM, R. J. Spore population of *Helminthosporium sativum* in soils in relation to the occurrence of common root rot of wheat. *Can. J. Plant Sci.* 42: 720 - 727. 1962.
- DIEHL, J. A. Common root rot of wheat in Brazil. *Plant Dis. Repr.* 63: 1020 - 1022. 1979.
- DIEHL, J. A., TINLINE, R. D., KOCHHANN, R. A., SHIPTON, P. J. and ROVIRA, A. D. The effect of fallow periods on common root rot of wheat in Rio Grande do Sul, Brazil. *Phytopathology* 72: 1297 - 1301. 1982.
- DUCZEK, L. J. Number and viability of conidia of *Cochliobolus sativus* in soil profiles in summerfallow fields in Saskatchewan. *Can. J. Plant Pathol.* 3: 12 - 14. 1981.
- LEDINGHAM, R. J. Crop rotations and common root rot in wheat. *Can. J. Plant Sci.* 41: 479 - 486. 1961.
- LEDINGHAM, R. J., ATKINSON, T. G., HORRICKS, J. S., MILLS, J. T., PIENING, L. J. and TINLINE, R. D. Wheat losses due to common root rot in the prairie provinces of Canada, 1969-71. *Can. Plant Dis. Surv.* 53: 113 - 122. 1973.
- REIS, E. M. Selective medium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil. *Plant Dis.* 67: 68 - 70. 1983.
- REIS, E. M. and WÜNSCHE, W. A. Sporulation of *Cochliobolus sativus* on residues of winter crops and its relationship to the increase of inoculum density in soil. *Plant Dis.* 68: 411 - 412. 1984.

VARIABILIDADE ISOENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *MICROCYCLUS ULEI* COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIRULÊNCIA¹

NILTON T. V. JUNQUEIRA², ACELINO C. ALFENAS³, GERALDO M. CHAVES³, LAERCIO ZAMBOLIM³ & LUADIR GASPAROTTO²

²CNPDS/EMBRAPA, Caixa Postal, 319, 69.000 — Manaus — AM. ³Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36.570 — Viçosa MG.

(Aceito para publicação em 24/03/87)

RESUMO

JUNQUEIRA, N. T. V., ALFENAS, A. C., CHAVES, G. M., ZAMBOLIM, L. & GASPAROTTO, L. Variabilidade isoenzimática de isolados de *Microcyclus ulei* com diferentes níveis de virulência. *Fitopatol. bras.* (12):208-214. 1987.

Analisaram-se os padrões isoenzimáticos de sete isolados de *Microcyclus ulei*, com diferentes níveis de virulência, em gel de poliácridamida. Testaram-se as enzimas peroxidase, α β — esterase, malato desidrogenase, lactado desidrogenase, β — glicosidase, polifenoloxidase, álcool desidrogenase, fosfatase alcalina, tetrazolium oxidase e hexoquinase. Os resultados obtidos foram comparados com a virulência dos isolados a vários clones de seringueira. Os padrões de esterase, peroxidase e lactado desidrogenase diferenciaram respectivamente seis, quatro e cinco isolados. As enzimas malato desidrogenase e hexoquinase diferenciaram respectivamente dois e três isolados. As enzimas β — glicosidase, polifenoloxidase, álcool

desidrogenase e fosfatase alcalina apresentaram baixa resolução nos géis, mesmo após a imersão do gel corado em acetona. O isolado HM¹ foi avirulento e não esporulante, tendo apresentado padrões isoenzimáticos diferentes dos demais isolados para todas as enzimas analisadas. Estes resultados mostram a existência de uma correlação entre a virulência dos isolados de *M. ulei* e seus padrões isoenzimáticos. Ressalta-se, porém, que o número de enzimas testadas foi insuficiente para separar alguns isolados como UNA de BV e HM de ITB. Concluiu-se que a análise eletroforética de padrões isoenzimáticos pode auxiliar na caracterização e identificação de isolados de *M. ulei*, com diferentes níveis de virulência.

¹Parte da tese de doutorado de Nilton T. V. Junqueira, desenvolvida no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, sob apoios institucionais do CNPq, EMBRAPA e SUDHEVEA.

ABSTRACT

Isoenzyme patterns of *Microcyclus ulei* isolates differing in virulence

Protein and isoenzyme patterns of *Microcyclus ulei* isolates differing in virulence were analysed on polyacrilamide gel electrophoresis. Gels were stained for α and β esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH), lactate dehydrogenase (LDH), β glucosidase (GLU), poliphenoloxidase (PPO), alcohol dehydrogenase (ADH), alkaline phosphatase (AP), tetrazolium oxidase (TO), hexokinase (HK) and peroxidase (PO). Better visualization of bands of enzyme activity was obtained by treating the stained gels with acetone. Electrophoretic data were compared to the virulence of the isolates inoculated on several rubber tree clones. Isolates were classified into 3 groups according to their virulence. EST, LDH and PO pat-

terns differentiated 6, 5 and 4 isolates, respectively. On the other hand, MDH and HK differentiated only 2 and 3 isolates, respectively. GLU, PPO, ADH and AP showed very low enzyme activity; bands were almost undetectable. The HM¹ isolate was avirulent to all tested clones, nonsporulating, and displayed different isoenzyme patterns in comparison to the other isolates. A correlation was found between the virulence of *M. ulei* isolates and their isoenzyme patterns. Thus, it is concluded that the electrophoretic analysis of enzymes may be useful to identify and characterize isolates of *M. ulei* varying in their degrees of virulence.

INTRODUÇÃO

Nos programas de melhoramento visando à resistência à doenças, dentre outros fatores, é necessário que se conheça o germoplasma do hospedeiro e a variabilidade fisiológica do patógeno. A especialização fisiológica de *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx é admitida, desde 1946, por Langford (1960, 1961), citado por Chee e Wastie (1980). Esta observação foi confirmada experimentalmente por Langdon (1965), Miller (1966), BRASIL SUDHEVEA (1975), Chee (1983, 1984) e Junqueira (1985).

Entretanto, os estudos da variabilidade fisiológica de *M. ulei* têm-se limitado a estes trabalhos citados e as observações visuais em campo; portanto, o conhecimento destas características é de suma importância para os trabalhos de melhoramento visando à resistência a doença. A identificação de raças fisiológicas baseia-se em reações distintas dos isolados em uma série de variedades diferenciadoras, as quais apresentam um ou vários genes de resistência distintos a uma ou mais raças. Contudo, a utilização deste método exige grande espaço físico para montagem de ensaio, só permitindo a obtenção dos resultados após longo período de trabalho, e as vezes estes resultados são inconsistentes em virtude das variações ambientais. No caso da seringueira, o trabalho torna-se mais difícil por causa da desuniformidade dos lançamentos foliares e da necessidade de se utilizarem folhas novas para as inoculações; portanto, torna-se necessário desenvolverem-se técnicas rápidas, simples e de alta precisão para a caracterização de "raças fisiológicas" ou "isolados" de *M. ulei*, o que vem a tornar um importante suporte para o programa de melhoramento da seringueira visando resistência ao mal-das-folhas.

A análise de isoenzimas e proteínas tem sido preconizada por diversos pesquisadores (Burdon *et alii*, 1981; Stipes *et alii*, 1982; Bernier *et alii*, 1983; Jeng e Rubbes, 1983; Alfenas, 1983; Alfenas *et alii*, 1982, 1984) como um novo método simples e rápido para a identificação e caracterização da virulência de fitopatógenos, que poderá ser empregada como suporte aos resultados obtidos a partir de hospedeiros diferenciados.

Este trabalho teve como objetivo o estudo da variabilidade fisiológica de alguns isolados de *M. ulei* (*Fusicladium macrosporum*) provenientes de diversas regiões heveícolas do Brasil, através da análise dos padrões isoenzimáticos por meio da eletroforese em gel de poliácridamida e através de reações em diferentes clones de seringueira.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas, fungos e inoculações

Os clones de *Hevea* spp provenientes do Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê (CNPDS), Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA) e Empresa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), enxertados em

porta-enxertos geneticamente heterogêneos, foram cultivados em sacos de polietileno contendo 10 kg de substrato constituído de uma mistura de 70% de solo de 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, correspondentes aos estádios B¹ ou B², descritos por Hallé *et alii* (1978), com uma suspensão de 2×10^5 conídios/ml provenientes de culturas com idade de 12 dias, mantidas em meio contendo 6g de neopeptona, 10g de sacarose, 20g de ágar, 2g de KH₂PO₄, 1g de MgSO₄ · 7H₂O, 2ml de Panvit (Complexo de aminoácidos, vitaminas e sais minerais), 1.000 ml de água destilada, pH 5.0. Os isolamentos e cultivos dos isolados de *M. ulei* foram feitos conforme descrito por Junqueira *et alii* (1984). As etiquetas de identificação correspondentes a cada isolado foram distribuídas ao acaso em diferentes folhas de um mesmo lançamento (conjunto de folhas emitidas pelo mesmo terminal de um ramo, numa mesma época). Cada isolado foi inoculado pelo menos duas vezes em folhas diferentes do lançamento. Os conídios foram dispersos em água destilada. Utilizou-se um atomizador modelo H³ (Paashe air Brush, Chicago, EUA), acionado por um compressor elétrico calibrado entre 18 a 20 libras. A atomização foi efetuada até a cobertura completa da superfície foliar por gotículas, evitando-se a coalescência e o escorrimento destas.

Após a inoculação, as plantas foram colocadas em câmara úmida (97 + - 2% de umidade relativa), a 24°C, sob regime de luz alternada (12 horas de escuro e 12 horas de luz; 2.000 lux) durante 24 horas. Após este período, as plantas foram retiradas da câmara úmida e mantidas por oito 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 + - 4°C, e umidade relativa de 78 + - 5%.

A avaliação foi feita 15 dias após a inoculação, determinando-se o número de lesões por 8 cm² de superfície foliar, diâmetro médio das lesões e esporulação. A análise do tipo de reação foi baseada principalmente no diâmetro médio das lesões e na esporulação conforme escala proposta por Junqueira (1985) e Junqueira *et alii* (1986).

Os isolados utilizados e as respectivas procedências são apresentados na Tabela 1.

Cultivo de *Microcyclus ulei* para extração das proteínas

Discos de 1,5 cm de diâmetro foram retirados de culturas de *M. ulei* com 12 dias de idade e macerados em tubos de ensaio, com o auxílio de bastão de vidro flambado. Foram macerados cinco discos de cultura (contendo micélio, conídios e/ou conidióforos) isentos de fragmentos de meio de cultura, para cada 10 ml de água destilada esterilizada contendo 0,1% de sacarose e 50 ppm de cloranfenicol. Alíquotas de 0,5 ml desta suspensão foram adicionadas em erlenmeyers de 125 ml contendo 25 ml de meio de cultura sólido (6g de neopeptona,

TABELA 1 — Origem dos isolados de *Microcyclus ulei* utilizados. UFV, Viçosa, MG, 1985.

Isolados	Grupo*	Procedências	
		Município	Estado
UNA	I	Una	Bahia
ITB	III	Ituberá	Bahia
LAB	I	Lábrea	Amazonas
HM	III	Humaitá	Amazonas
HM ₁	**	Humaitá	Amazonas
EIR	II	Eirunepé	Amazonas
BV	I	Boa Vista	Roraima
GV	II	Governador Valadares	Minas Gerais

* Os isolados foram incluídos em grupos de acordo com a especificidade para os hospedeiros (Junqueira, 1985).

** Isolado não esporulante, não incluído em grupos.

10g de sacarose, 2g de KH₂PO₄, 1g de MgSO₄. 7H₂O, 20g de ágar, 10mg de cloridrato de lisina, 0,25 mg de treonina, 0,25 mg de triptofano, 1.000 ml de água destilada, pH 5,0). A suspensão foi distribuída uniformemente, sobre a superfície do meio e os frascos foram incubados a 24°C no escuro.

Extração das Proteínas

Após 12 dias de incubação, as placas miceliais formadas sobre o meio foram removidas com uma espátula tipo "desoperador" e transferidas para funil de Büchner, munido de papel de filtro Whatman n.º 1. A seguir, foram feitas 2-3 lavagens

com água destilada, a fim de se removerem os resíduos de meio aderidos ao micélio. Posteriormente, a massa micelial foi congelada a -20°C e liofilizada por 7 horas. A extração das proteínas foi feita diretamente em tampão Tris-HCl 0,062M, pH 6,8 a 3-5°C, na proporção de 70 mg de massa fúngica liofilizada para cada ml de tampão. A suspensão obtida foi homogeneizada com o auxílio de uma espátula e mantida a 5°C por 12 horas. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 18.000 g por 30 minutos e a concentração de proteínas nos sobrenadantes foi estimada pelo método de Bradford (1976), tendo-se albumina de soro bovino como proteína-padrão.

Análise das isoenzimas e proteínas solúveis totais

As amostras foram preparadas com 10% de glicerol + traços de azul-de-bromofenol. Uma alíquota de 100 µl de cada amostra foi aplicada em orifícios de 0,4 mm de comprimento, 0,15 mm de largura e 20 mm de altura formados na extremidade superior do gel, após a retirada do pente.

A eletroforese foi conduzida em gel de poliácridamida. A parte inferior do gel (aproximadamente 70% do gel) foi composta de poliácridamida a 10% e a parte superior restante foi composta de poliácridamida a 4%. Os géis de poliácridamida e os tampões eletrodios foram preparados conforme descrito por Alfenas (1983). A eletroforese foi conduzida sob voltagem constante de 200 V até que a zona frontal (azul-de-bromofenol), atingisse a extremidade final do gel. O gel foi então removido e submetido a coloração específica para cada enzima.

Foram testadas as seguintes enzimas: esterase (EST), hexoquinase (HK), lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH), peroxidase (PO), polifenol oxidase (PPO),

TABELA 2 — Reação de Clones de Seringueira à Infecção por diferentes isolados de *Microcyclus ulei* (*Fusicladium macrosporum*). UFV, Viçosa, MG, 1985.

Clones	Progenitores	Isolados							
		Grupo I			Grupo II		Grupo III		*** HM ₁ AM
		UNA BA	BV RR	LAB AM	EIR AM	GV MG	ITB BA	HM AM	
IAN 2880	F 516 (F 4542 x AVROS 363) x PB 86	AS****	AS	AS	R	R	R	AS	AR
IAN 3087	F 516 (F 4542 x AVROS 363) x PB 86	AS	AS	AS	S	AS	AS	AS	AR
IAN 6158	*	S	S	S	**	R	S	R	**
IAN 7002	Fx 625 (F 4542 x Tjir 1) x Tjir 1	AS	AS	AS	AS	**	AS	**	**
IAN 717	PB 86 x 4542	AS	AS	S	**	**	S	**	**
IAN 3193	Fx 516 X PB 86	AS	AS	AS	R	R	**	**	**
IAN 2909	F 516 (F 4542 x AVROS 363) x PB 86	AS	S	S	R	R	AS	S	**
IAN 3887	FX 4425 (F 4527 x PB 86) x PB 86	AS	**	AS	**	**	**	**	**
F 4542	<i>Hevea benthamiana</i>	S	S	S	R	**	S	**	**
Fx 3810	F 4542 x AVROS 363	AS	AS	AS	R	R	AS	AS	R
Fx 3899	F 4542 x AVROS 363	AS	AS	AS	R	R	AS	AS	AR
Fx 2804	F 4542 x Tjir 1	AS	AS	AS	R	R	R	AS	**
Fx 3703	F 4542 x PB 86	AS	AS	AS	**	AS	AS	AS	**
Fx 4098	PB 86 x FB 74	MR	R	R	S	**	R	**	**
Fx 3925	F 4542 x AVROS 363	AS	AS	AS	AS	S	AS	AS	**
Fx 985	F 315 x AVROS 183	R	R	R	AS	R	R	R	R
Fx 3864	PB 86 x FB 38	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AR
Fx 3844	AVROS 183 x FB 45	MR	R	AS	AS	AS	S	S	**
Fx 2261	F 1619 x AVROS 183	MR	MR	S	MR	MR	R	S	**
MDF 180	<i>Hevea brasiliensis</i>	R	R	R	AS	R	R	**	**
IAC 222	IAN 873 poliploidizado	R	S	S	AS	MR	AS	AS	**
CNSAM 7907	Clone primário	MR	MR	R	R	R	R	R	**
CNSAM 7745	Clone primário	R	R	R	**	MR	**	R	**
PA 31	<i>Hevea pauciflora</i>	R	**	R	R	**	**	R	**

* Fx 43-665 [Fx 213 (F 4542 x AVROS 183) x AVROS 183] x PB 86.

** Não concluído.

*** Não incluído em grupos.

**** AS = Altamente suscetível; S = Suscetível; MR = Moderadamente resistente; R = Resistente; AR = Altamente resistente.

álcool desidrogenase (ADH), fosfatase alcalina (AP), tetrazolium oxidase (TO) e β -glicosidase (GLU). Os métodos de coloração utilizados foram os descritos por Shaw e Prasad (1970), Siciliano e Shaw (1976) e Tanksley, citado por Vallejos (1983). Para a análise dos padrões de proteínas, os géis foram corados com uma solução a 0,1% de azul-de-coomassie (brilliant blue R-250) em fixativo PAGE (metanol: ácido acético: água = 45:20:35 v/v/v). Depois de 12 horas na solução corante, em temperatura ambiente, os géis foram fixados numa solução contendo 5% de metanol + 7% de ácido acético.

Para melhorar a visualização das bandas e facilitar as análises dos padrões isoenzimáticos, após coloração e fixação, os géis foram imersos em acetona (P.A.) e submetidos a agitação manual.

RESULTADOS

Reação de clones de seringueira à infecção por diferentes isolados de *Microcyclus ulei*.

Na Tabela 2 são apresentados os tipos de reações dos clones de seringueira aos isolados UNA, BV, LAB, ITB, HM, GV, EIR e HM¹. O isolado HM¹ foi avirulento a todos os clones testados, inclusive ao LCB 510, Tjir 1 e RRIM 600 (dados não mostrados). Os isolados UNA, BV e LAB (grupo I) atacaram e esporularam em todos os clones com genes de F 4542 (*Hevea benthamiana*) e na maioria dos clones de *Hevea brasiliensis*, mas não esporularam no Fx 985 e MDF 180, que também são clones de *H. brasiliensis*. Os isolados BV e LAB atacaram e esporularam em 77% e 75% dos clones, respectivamente. Os isolados ITB e HM (grupo III) atacaram e esporularam em proporções semelhantes, tanto os clones com genes de F 4542 quanto nos clones de *H. brasiliensis*. Estes isolados atacaram e esporularam em aproximadamente 70% dos clones apresentados na Tabela 2. Os isolados GV e EIR (grupo II) atacaram e esporularam em todos ou na maioria dos clones de *H. brasiliensis* e em alguns clones com genes de F 4542 (*H. benthamiana*) testados. O isolado GV atacou e esporulou em 44% dos clones enquanto que o EIR atacou e esporulou em 47%.

De acordo com os clones diferenciadores descritos por Miller (1966), os isolados BV e ITB aproximam-se bastante da raça 2; os isolados UNA e LAB aproximam-se da raça 3. De acordo com os clones diferenciadores propostos por BRASIL SUDHEVEA (1975) e Chee (1984), é possível que os isolados GV e EIR pertençam à raça 4a. O isolado HM não se enquadrou em nenhuma das raças já descritas. Finalmente, com base nos dados da Tabela 2, verifica-se que os sete isolados patogênicos diferem entre si quanto à virulência por um ou mais clones.

Padrões isoenzimáticos dos isolados de *M. ulei*

Os padrões isoenzimáticos para esterase, peroxidase, lactato desidrogenase, malato desidrogenase, tetrazolium oxidase e hexoquinase estão apresentados nas Figuras 1, 2, 3 e na Tabela 3. O isolado HM só foi testado para esterase. As variações na intensidade das bandas observadas nos géis não foram indicadas nos zimogramas.

As enzimas polifenoloxidase, álcool desidrogenase, fosfatase alcalina e β -glicosidase exibiram bandas com baixa atividade enzimática, quase não detectáveis, para todos os isolados testados, à exceção do isolado HM¹ e, por isso, não foram apresentadas nas Figuras 1 e 2.

Esterase

Os géis corados para esta enzima apresentaram 31 bandas (Figura 1). Os isolados UNA e BV (Grupo I) apresentaram bandas com os mesmos padrões de migração, mas diferentes dos demais isolados (Tabela 3.). O isolado LAB, também do Grupo I, apresentou bandas com padrão de migração diferente daquele dos demais isolados para essa enzima. Os isolados ITB e HM pertencem ao Grupo III e apresentaram bandas com os mesmos padrões de migração para esterase. Os isolados ITB e HM assim como os isolados UNA e BV diferem entre si em virulência (Tabela 2). Os isolados EIR e GV pertencem ao Grupo II, e apresentaram bandas com padrões de migração diferentes. Estes dois isolados também diferem em virulência (Tabela 2). O isolado HM¹ não foi incluído em grupos por

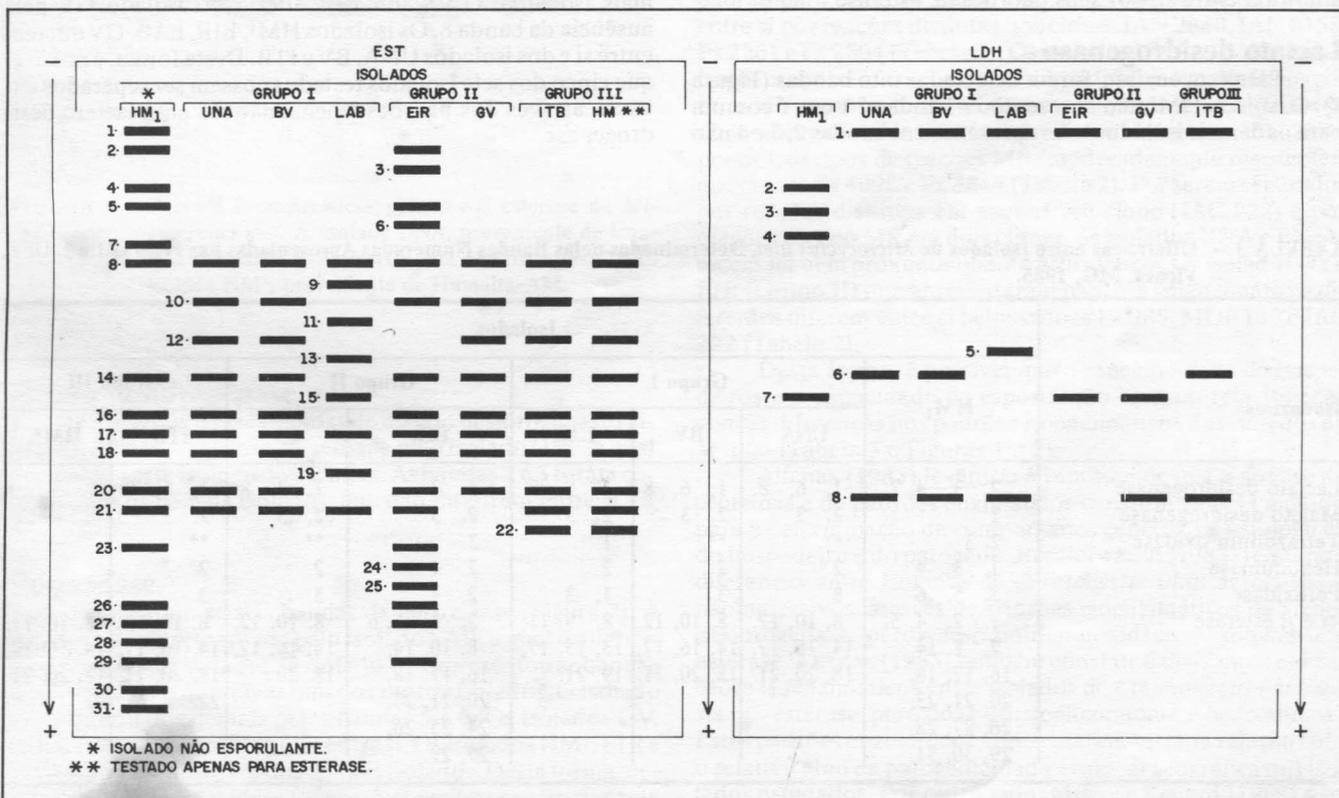


FIGURA 1 - Padrões isoenzimáticos para α e β Esterase (EST) e Lactato Desidrogenase (LDH), de *Microcyclus ulei*

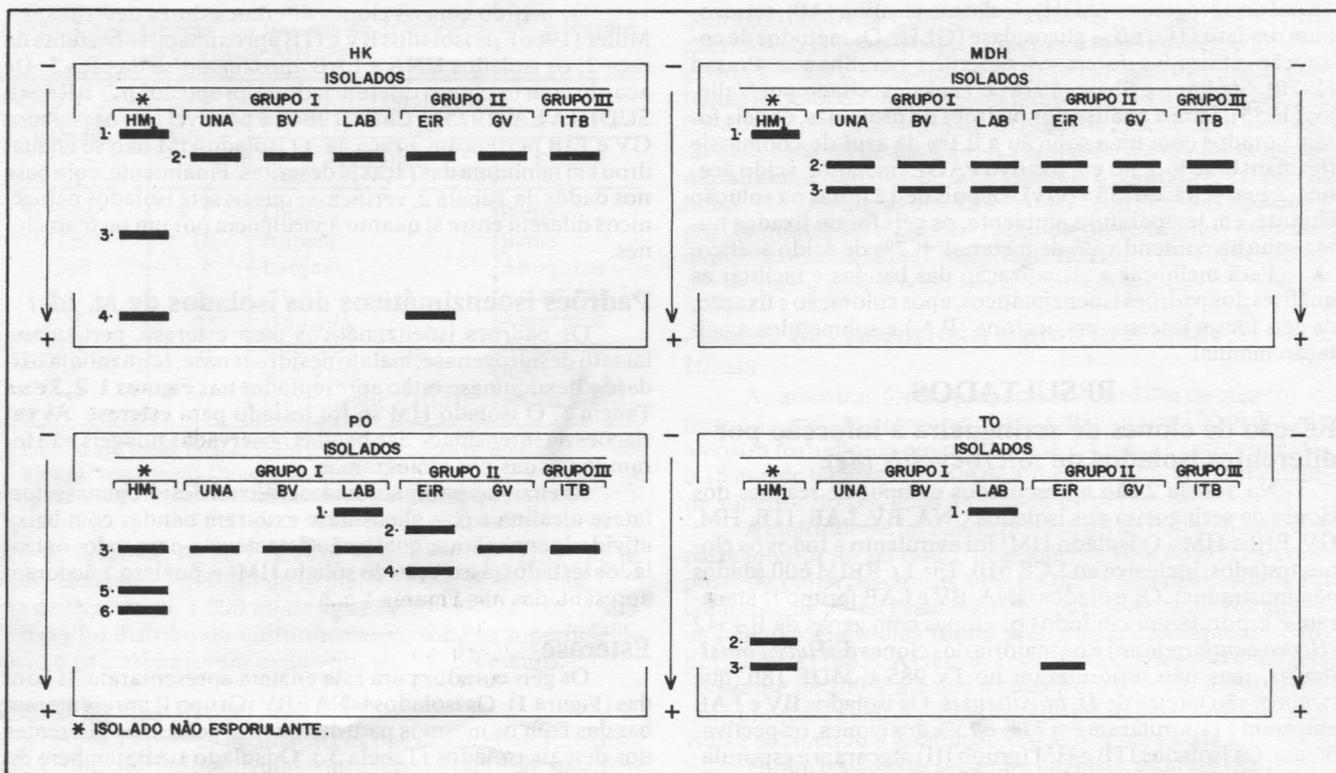


FIGURA 2 – Padrões isoenzimáticos para Hexoquinase (HK), Malata Desidrogenase (MDH), Peroxidase (PO) e Tetrazolium Oxidase (TO), de *Microcyclus ulei*.

apresentar esporulação muito baixa em relação aos demais isolados e por ser avirulento para os clones testados. Este isolado apresentou padrão isoenzimático diferente dos demais isolados (Figura 1). Através dos padrões de migração para α e β esterase, só não foi possível diferenciar os isolados UNA de BV e ITB de HM. Desta forma, seis dos oito isolados testados diferiram entre si, por seus padrões de esterase.

Lactato desidrogenase

Para esta enzima, foram detectadas oito bandas (Figura 1). O isolado HM¹ não apresentou a banda n° 1 que é comum para os demais isolados, mas apresentou as bandas 2, 3 e 4 não

detectadas nos outros isolados. Os isolados ITB (Grupo III) e UNA, BV (Grupo I) apresentaram um mesmo padrão isoenzimático (bandas 1, 6 e 8), diferentemente dos demais isolados. Os isolados UNA, BV e ITB diferiram dos demais isolados, mas não diferiram entre si (Tabela 3). A banda 5 só foi apresentada pelo isolado LAB, que também diferiu dos demais isolados. O isolado EIR diferiu do isolado GV pela ausência da banda 8. Os isolados HM¹, EIR, LAB, GV diferiram entre si e dos isolados UNA, BV e ITB. Desta forma, é possível que cinco dos sete isolados testados possam ser separados entre si, através dos padrões isoenzimáticos para lactato desidrogenase.

TABELA 3 – Diferenças entre Isolados de *Microcyclus ulei*, Determinadas pelas Bandas Numeradas Apresentadas nas Figuras 1 e 2. UFV, Viçosa, MG, 1985.

Isoenzimas	Isolados							
	HM ₁	Grupo I			Grupo II		Grupo III	
		UNA	BV	LAB	EIR	GV	ITB	HM*
Lactato desidrogenase	2, 3, 4, 7,	1, 6, 8	1, 6, 8	1, 5, 8	1, 7	1, 7, 8	1, 6, 8	—
Malato desidrogenase	1	2, 3	2, 3	2, 3	2, 3	2, 3	2, 3	—
Tetrazolium oxidase	2, 3	**	**	1	3	**	**	—
Hexoquinase	1, 3, 4	2	2	2	2, 4	2	2	—
Peroxidase	3, 5, 6	3	3	1, 3	2, 4	3	3	—
α e β esterase	1, 2, 4, 5, 7, 8, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 31.	8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21.	8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21.	8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21.	2, 3, 5, 6 8, 10, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29.	8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20.	8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22.	8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 22.

* Testado apenas para esterase.

** Não apresentou bandas visíveis.

Hexoquinase

Detectaram-se quatro bandas de hexoquinase (Figura 2). Os isolados UNA, BV, ITB e GV apresentaram bandas com baixa atividade enzimática, ao passo que os isolados LAB, EIR e HM¹ apresentaram bandas com alta atividade enzimática. O isolado HM¹ diferiu dos demais isolados pelas bandas 1 e 3. O isolado EIR diferiu dos isolados HM¹ pela ausência das bandas 1 e 3, e dos demais isolados pela presença da banda 4 (Figura 2 e Tabela 3). O isolado HM¹ não apresentou a banda 2, comum para os demais isolados. Os isolados GV, UNA, BV, LAB e ITB não diferiram entre si quanto ao padrão isoenzimático para hexoquinase. Desta forma, pelos padrões dessa enzima, foi possível separar o isolado HM¹ do EIR e ambos dos demais.

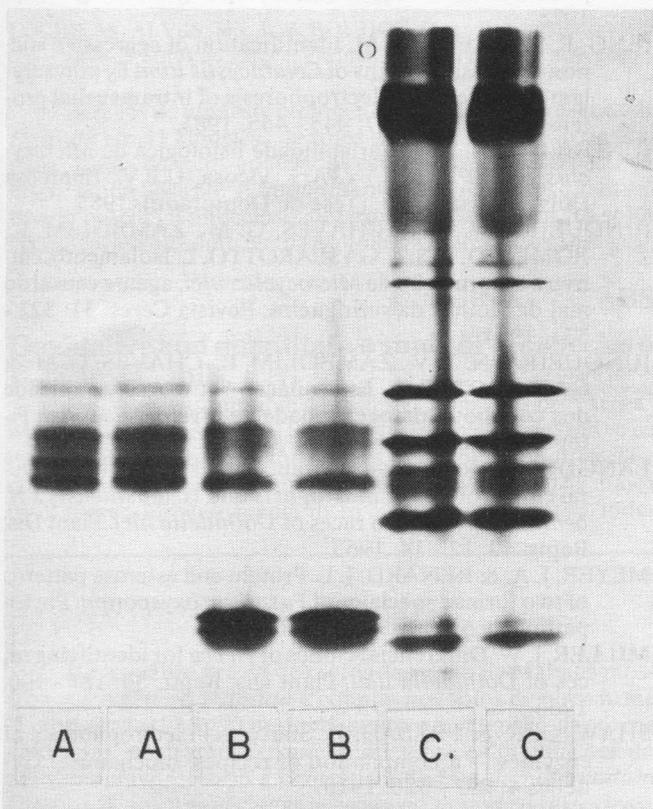


FIGURA 3 – Padrões isoenzimáticos para α e β esterase de *Microcyclus ulei*. A. isolado UNA, proveniente de Una-BA; B. isolado EIR, proveniente de Eirunepé-AM; C. isolado HM¹, proveniente de Humaitá-AM.

Malato desidrogenase

Detectaram-se três bandas de malato desidrogenase (Figura 2). A banda 1 só foi apresentada pelo isolado HM¹, a qual diferenciou este isolado dos demais. As bandas 2 e 3 foram comuns para os demais isolados, que não diferiram entre si.

Peroxidase

Detectaram-se seis bandas de peroxidase (Figura 2). A banda 1 só foi apresentada pelo isolado LAB, a qual o diferenciou dos demais isolados. O isolado EIR apresentou as bandas 2 e 4, as quais o diferenciaram dos outros isolados. O isolado HM¹ diferiu dos demais pelas bandas 5 e 6. Os isolados GV, UNA, BV e ITB não diferiram entre si. Os isolados HM¹, EIR e LAB diferiram entre si e dos demais isolados. Desta forma, pelos padrões de peroxidase foi possível separar quatro dos sete isolados testados (Tabela 3).

Tetrazolium oxidase

As bandas de tetrazolium oxidase foram detectadas nos géis corados para outras enzimas em que se utilizaram corantes contendo sais de tetrazolium. Detectaram-se três bandas para tetrazolium oxidase (Figura 2). Os isolados GV, UNA, BV e ITB não apresentaram bandas visíveis. O isolado LAB só apresentou a banda 1. O isolado HM¹ apresentou as bandas 2 e 3, ao passo que o isolado EIR só apresentou a banda 3. Os isolados HM¹, EIR e LAB diferiram entre si e dos demais isolados. Desta forma, foi possível separar quatro dos sete isolados (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que os isolados de *M. ulei*, que diferem em virulência, diferem também quanto aos padrões isoenzimáticos detectados para as enzimas testadas. Os padrões de isoperoxidasas, isoesterases e isolactato desidrogenases permitiram a separação de um número maior de isolados. Os isolados EIR e HM¹ diferiram entre si e dos demais através de cinco enzimas. Os isolados EIR e GV, ambos do Grupo II, atacaram um menor número de clones em relação aos demais, à exceção do HM¹ que foi avirulento a todos os clones testados. Os isolados EIR e GV diferem entre si quanto à virulência por dois ou mais clones (Tabela 2). Estes dois isolados atacaram e esporularam em todos ou na maioria dos clones de *H. brasiliensis* e atacaram e esporularam em alguns clones com genes de F 4542 (*H. benthamiana*). Os isolados UNA e BV não apresentaram diferenças entre si para as enzimas testadas, mas diferiram dos demais isolados, através das enzimas LDH e EST (Tabela 3 e Figuras 1, 2 e 3). Estes dois juntamente com o isolado LAB, fora altamente virulentos ou virulentos a todos os clones portadores de genes de F 4542 e à maioria dos clones de *H. brasiliensis*.

Os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3 e nas Figuras 1 e 2 mostram a existência de uma relação entre a virulência dos isolados com os padrões isoenzimáticos, principalmente, de esterase, peroxidase e lactato desidrogenase. Os isolados ITB e HM, ambos do Grupo III, apresentaram o mesmo padrão para esterase; entretanto, estes dois isolados diferem entre si por reações distintas nos clones IAN 2880, IAN 6158, Fx 2261 e Fx 2804 (Tabela 2). Os isolados UNA e BV (Grupo I) também apresentaram os mesmos padrões isoenzimáticos para as seis enzimas testadas. Entretanto, estes dois isolados só podem ser separados por reação distinta no clone IAC 222 e por outros tipos de reações MR (moderadamente resistentes) nos clones Fx 4098 e Fx 3844 (Tabela 2). Por serem separados por reações distintas em apenas um clone (IAC 222) e por reações do tipo MR em dois clones, os isolados UNA e BV parecem ser bem próximos quanto à virulência. Os isolados GV e EIR (Grupo II) que apresentaram padrões isoenzimáticos diferentes diferem entre si pelos clones Fx 985, MDF 180 e IAC 222 (Tabela 2).

Desta forma, é possível que a especificidade de hospedeiros e a capacidade de esporulação estejam relacionadas com as diferenças nos padrões isoenzimáticos dos isolados de *M. ulei* (Tabela 3 e Figuras 1 e 2).

Alfenas (1983) levantou a hipótese de que a análise de proteínas e de padrões enzimáticos constitui valioso método para a determinação de componentes genéticos e fisiológicos do hospedeiro e do patógeno. Bernier *et alii* (1983) relataram diferenças entre isolados de *Ceratocystis ulmi* agressivos e não-agressivos, através de padrões isoenzimáticos de álcool desidrogenase, peroxidase polifenoloxidase, hexoquinase e esterase. Alfenas (1983) também constatou diferenças em padrões isoenzimáticos entre isolados de *Cryphonectria cubensis* por esterase, peroxidase, fosfoglicomutase e hexoquinase. Estes padrões enzimáticos apresentaram estreita relação com o relativo grau de patogenicidade e origem geográfica dos isolados estudados. Por outro lado, Meyer e Renard (1969) não conseguiram relacionar os padrões proteicos e isoenzimáticos

com formas patogênicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* e *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis*. Burdon e Marshall (1981) detectaram diferenças nos padrões enzimáticos de esterase, leucina-aminopeptidase, dihidroreductase, fosfoglicomutase e dihidrolipamida entre *formae speciales* de *Puccinia graminis* patogênica a diferentes hospedeiros.

Entre os isolados de *M. ulei* testados, os isolados UNA e BV não diferiram entre si, através dos padrões isoenzimáticos de seis enzimas. Entretanto, estes isolados pertencem ao Grupo I e diferem em virulência quando inoculados em vários clones de seringueira. O isolado HM só foi testado para esterase, e não diferiu do isolado ITB. Estes dois isolados pertencem ao Grupo III e também diferem entre si quanto à virulência. No entanto, é possível que os isolados UNA e BV e também HM e ITB possam apresentar padrões isoenzimáticos ou protéicos diferentes, se forem testados em relação a um maior número de enzimas ou de proteínas nativas ou desnaturadas. Não houve uma relação entre os padrões isoenzimáticos e os grupos de isolados.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os padrões isoenzimáticos dos isolados de *M. ulei*, podem ser relacionados com o seu grau de virulência. Todos os isolados diferiram entre si por um ou mais clones. Embora as raças ainda não estejam definidas, o nível de virulência destes isolados variou de um clone para outro. Os padrões isoenzimáticos obtidos, principalmente para as enzimas esterase, peroxidase e lactato desidrogenase, mostraram diferenças entre os isolados, mas o número de enzimas testadas foi insuficiente para separá-los melhor, tendo indicado, contudo, que a análise eletroforética de padrões isoenzimáticos pode constituir um método rápido e eficiente para a caracterização de isolados e até mesmo de raças fisiológicas de *M. ulei*.

REFERÊNCIA

- ALFENAS, A. C. Virulence and isoenzyme patterns of *Cryphonectria cubensis* causal agent of the eucalyptus canker. Ph. D. Thesis, University of Toronto. 86p. 1983.
- ALFENAS, A. C., JENG, R. S. & HUBBES, M. Variation in pathogenicity and isoenzyme patterns among isolates of *Cryphonectria cubensis*. The 48th annual meeting of the Canadian Phytopathological Society, Ed. Monton, 20 - 23. June, p. 303 (Abstract). 1982.
- ALFENAS, A. C., JENG, R. S. & HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. Can. J. Bot. 62: 1756 - 1762. 1984.
- BERNIER, L., JENG, R. S. & RUBBES, M. Differentiation of aggressive and nonaggressive isolates of *Ceratocystis ulmi* by gel electrophoresis of intramycelial enzymes. Mycotaxon. 17: 456 - 472. 1983.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochemistry 72: 248 - 254. 1976.
- BRASIL SUDHEVEA. Plano Nacional da Borracha. Pesquisa Fitopatológicas. In: Pesquisas e experimentação realizadas com a seringueira. Rio de Janeiro, p. 36 - 107. (Anexo II). 1975.
- BURDON, J. J. & MARSHAL, D. R. Isoenzyme variation between species and formae speciales of the genus *Puccinia*. Can. J. Bot. 59: 2628 - 2634. 1981.
- BURDON, J. J., MARSHAL, D. R. & LUIG, N. H. Isoenzyme analysis indicates that a virulent cereal rust pathogen is a somatic hybrid. Nature 293: 565 - 566. 1981.
- CHEE, K. H. South American Leaf Blight. Report. s.1., s.ed., 8p. 1983.
- CHEE, K. H. Development on the study of physiologic races of *Microcyclus ulei* and clonal susceptibility. Report. S.1., S. ed., 9p. 1984.
- CHEE, K. H. & WASTIE, R. L. The status and future prospects of rubber diseases in tropical America. Rev. Plant Pathol. 59: 541 - 547. 1980.
- HALLÉ, F., OLDEMAN, R. A. A. & TOMLINSON, P. B. Tropical trees and forest. Berlin, Springer-Verlag. 441p. 1978.
- JENG, R. S. & RUBBES, M. Identification of aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* by polyacrylamid gradient gel electrophoresis of intramycelial proteins. Mycotaxon. 17: 445 - 455. 1983.
- JUNQUEIRA, N. T. V. Variabilidade fisiológica de *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. Viçosa, U.F.V., Imprensa Universitária, 135p. (Tese de Doutorado). 1985.
- JUNQUEIRA, N. T. V., CHAVES, G. M., ZAMBOLIM, L., ROMEIRO, R. S. & GASPAROTTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente causal do mal das folhas da seringueira. Revista Ceres. 31: 322 - 331. 1984.
- 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.
- 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. Repr. 49: 12 - 14. 1965.
- MEYER, J. A. & RENARD, J. L. Protein and esterase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 59: 1405 - 1411. 1969.
- MILLER, J. W. Differential clones of *Hevea* for identifying races of *Dothidella ulei*. Plant Dis. Repr. 30: 187 - 190. 1966.
- SHAW, G. R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes — a compilation of recipes. biochemical Genetics 4: 297 - 320. 1970.
- SICILIANO, M. J. & SHAW, C. R. Separation and visualization of enzymes on gels. In: I. SMITH (ed.). Chromatographic and electrophoretic techniques. Heinemann, London. p. 185 - 209. 1976.
- STIPES, R. J., EMERT, G. H. & BROWN, R. D. Differentiation of *Endothia gyrosa* and *Endothia parasitica* by disc electrophoresis of intramycelial enzymes and proteins. Mycologia 74: 138. 1982.
- VALLEJOS, E. C. Enzyme activity staining. In: S. D. TANKSLEY e T. J. ORTON (ed.). Isozymes in plant genetics and breeding, Part A. Elsevier, Amsterdam-Oxford, New York. p. 469 - 515. 1983.