

MARIO BARRETO FIGUEIREDO
Engenheiro Agrônomo
Assessoria de Programação
Instituto Biológico - São Paulo

ESTUDOS FISIOLÓGICOS E SOROLÓGICOS SOBRE O FUNGO ASCOCHYTA
PHASEOLORUM SACC. E SOBRE A DOENÇA POR ELE CAUSADA EM BERIN-
JELA (SOLANUM MELONGENA L.) E EM OUTRAS PLANTAS CULTIVADAS .

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Univer
sidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Dr. FERDINANDO GALLI

PIRACICABA - ESTADO DE SÃO PAULO

1972

À memória dos meus queridos pais,
dedico.

A G R A D E C I M E N T O S

Nossos sinceros agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ferdinando Galli, Diretor da E.S.A.L.Q., pela orientação, sugestões e revisão dos originais.

Ao colega Takao Namekata, Assistente da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico, pelo auxílio prestado na execução dos trabalhos e pela orientação na parte de técnicas sorológicas.

A Dr^a. Victória Rossetti, Diretora da Divisão de Patologia Vegetal do Instituto Biológico pelas facilidades proporcionadas na execução dos trabalhos e pelo incentivo e estímulo.

Ao Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, Prof. Assistente do Departamento de Bioquímica da Universidade de Campinas, pelas sugestões, críticas e estímulo.

Ao Eng^o Agr^o Jorge Teranishi, Assistente da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico, pelo auxílio na execução dos trabalhos.

Ao Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, colega de Assessoria, pelas críticas e sugestões apresentadas.

Ao Dr. Darcy Martins da Silva, Prof. de Bioquímica da E.S.A.L.Q., pelas sugestões, críticas e estímulo.

Ao Dr. Marcílio Dias, do Departamento de Genética da E.S.A.L.Q., pelo fornecimento de sementes de variedades de berinjela.

A minha esposa Walkyria B.C.M. Figueiredo e a colega Elza Maria Frias Martins, pelo auxílio nos testes bioquímicos.

Ao Sr. Francisco Muniz, a Raquel D'Alessandro Pires e a Maria Cristina Seabra Corrêa, pelo auxílio no preparo de meios, execução dos trabalhos e datilografia.

Ao Dr. V.Arxx, Diretor do Central Bureau Voor Schimmelcultures, Barn - Holanda, pelo fornecimento de culturas do fungo P.vexans.

Ao Dr. Eric Balmer, pelas críticas, incentivo e estímulo.

Ao Prof. A.Sodrê Cardoso, Chefe da Seção de Fotomicrografia do Instituto Biológico, pela orientação nos trabalhos de impressão.

Ao Eng^o Agr^o Jorge Hori, pelo fornecimento de diversas cepas incluídas nos trabalhos.

Ao Dr. K. Silberschmidt, Chefe da Seção de Virologia Fitopatológica e Fisiopatologia do Instituto Biológico, e ao Dr. J. R. de Mattos do Instituto de Botânica de São Paulo pelo auxílio na identificação de plantas nativas.

A Dr^a. Marly Vicente B. de Oliveira pelo fornecimento de sementes de solanaceas nativas e auxílio na revisão dos originais.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas, pelo auxílio financeiro através de uma bolsa de pesquisador.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

I N D I C E

	pag.
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2. <u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	4
2.1. Considerações gerais sobre <u>A.phaseolorum</u> Sacc.	4
2.2. Considerações sobre sorologia aplicada à sis- temática dos fungos.....	7
3. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	20
3.1. Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de <u>A.phaseolorum</u>	20
3.1.1. Cultura do patógeno utilizada.....	20
3.1.2. Método para esporulação do fungo.....	20
3.1.3. Crescimento do fungo a diversas temperaturas.	21
3.1.4. Determinação da temperatura ideal para esporulação.....	22
3.1.5. Obtenção de suspensões de esporos.....	22
3.1.6. Determinação da temperatura ideal para germinação dos conídios.....	23
3.1.7. Determinação da idade ideal aproximada da cultura para seu emprego em testes de patogenicidade.....	23
3.1.8. Efeito da alternância de temperaturas.....	25
3.2. Estudo comparativo entre os sintomas induzi- dos em berinjela por <u>A.phaseolorum</u> e por <u>P.vexans</u>	26
3.2.1. Exames de material herborizado.....	26
3.2.2. Culturas utilizadas.....	27
3.2.3. Obtenção de suspensões de esporos.....	27
3.2.4. Inoculações experimentais.....	28

3.3.	Alguns aspectos da sintomatologia induzida por <u>A.phaseolorum</u> em outras plantas de importância econômica e determinação de novos hospedeiros.....	32
3.4.	Emprego da sorologia como método auxiliar para identificação de <u>A.phaseolorum</u> e especificação de fungos do gênero <u>Ascochyta</u>	34
3.4.1.	Isolamento das cepas.....	34
3.4.2.	Relação das culturas utilizadas nos ensaios sorológicos.....	38
3.4.3.	Manutenção de culturas.....	39
3.4.4.	Preparo e conservação dos anti-soros (AS)....	40
3.4.5.	Preparo de antígenos (AG) para as reações sorológicas.....	42
3.4.6.	Testes sorológicos.....	45
3.4.7.	Estudos sobre as reações antígeno-anticorpo, titulações.....	48
3.4.8.	Estudos preliminares sobre a natureza química do AG.....	49
4.	<u>RESULTADOS</u>	52
4.1.	Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de <u>A.phaseolorum</u>	52
4.1.1.	Método para esporulação do fungo.....	52
4.1.2.	Crescimento do fungo a diversas temperaturas.	53
4.1.3.	Determinação da temperatura ideal para esporulação.....	55
4.1.4.	Determinação da temperatura ideal para a germinação de conídios.....	56

4.1.5.	Determinação da idade ideal aproximada da cultura para seu emprego em testes de patogenicidade.....	58
4.1.6.	Efeito da alternância de temperaturas.....	60
4.2.	Estudo comparativo entre os sintomas induzidos em berinjela por <u>A.phaseolorum</u> e por <u>P.vexans</u>	61
4.2.1.	Exames de material herborizado.....	61
4.2.2.	Inoculações experimentais.....	63
4.3.	Alguns aspectos da sintomatologia induzida por <u>A.phaseolorum</u> em outras plantas de importância econômica e determinação de novos hospedeiros.....	71
4.4.	Emprego da sorologia como método auxiliar para a identificação de <u>A.phaseolorum</u> e especificação de fungos do gênero <i>Ascochyta</i> ..	81
4.4.1.	Isolamento das cepas.....	81
4.4.2.	Manutenção das culturas.....	81
4.4.3.	Preparo e conservação dos anti-soros.....	82
4.4.4.	Preparo de antígenos (AG) para as reações sorológicas.....	83
4.4.5.	Testes sorológicos.....	84
4.4.6.	Estudos sobre as reações antígeno-anticorpo, titulações.....	91
4.4.7.	Estudos preliminares sobre a natureza química do antígeno (AG).....	92
5.	<u>DISCUSSÃO</u>	95
5.1.	Alguns aspectos da fisiologia de <u>A.phaseolorum</u>	95

5.2.	Estudo comparativo entre os sintomas induzidos em berinjela por <u>A.phaseolorum</u> e por <u>P.vexans</u>	97
5.3.	Determinação de novos hospedeiros.....	100
5.4.	Emprego da sorologia como método para a identificação de <u>A.phaseolorum</u> e especificação de fungos do gênero <u>Ascochyta</u>	102
6.	<u>CONCLUSÕES</u>	116
7.	<u>RESUMO</u>	118
8.	<u>SUMMARY</u>	121
9.	<u>LITERATURA CITADA</u>	123

1. INTRODUÇÃO

Ascochyta phaseolorum Sacc. foi, primeiramente, identificado em nosso meio por BITANCOURT e col. (1935), que o constataram sobre folhas de fava de Belém (Phaseolus lunatus L.) no município de São Paulo.

Em 1968, o mesmo microrganismo foi identificado por TERANISHI e FIGUEIREDO (1968) sobre plantas de berinjela e responsabilizado por severos danos em culturas comerciais desenvolvidas durante o período de inverno.

Informações colhidas nos municípios de Campinas e Embu indicaram que a doença tem sido considerada como um dos principais fatores limitantes da produção de berinjela, principalmente nos períodos de inverno, época em que os frutos recebem melhor cotação no mercado.

A doença ocorre também com bastante intensidade na região de Mogi das Cruzes e, segundo IKUTA (1), chefe da Estação Experimental da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", constitui-se em um dos maiores problemas para a cultura da berinjela na referida região.

Segundo levantamento por nós realizado através do arquivo de consultas encaminhadas à Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, a doença tem ocorrido em quase todas as regiões onde se cultiva essa solanacea, inclusive na região do litoral Norte do Estado.

Outro aspecto importante do problema, é que a doença causada por A. phaseolorum em berinjela estaria sendo

(1) Dr. IROSHI IKUTA - informação pessoal

confundida com o "cancro das hastes" causado por Phomopsis vexans (Sacc. Syd.) Harter. Essa confusão seria decorrente da grande semelhança entre os quadros sintomatológicos apresentados pelas plantas de berinjela afetadas por Phomopsis e por Ascochyta.

Tratando-se de um fungo altamente polífago, A.phaseolorum ocorre freqüentemente sobre muitas outras plantas de importância econômica, principalmente aquelas pertencentes às famílias Leguminosae, Solanaceae e Malvaceae. De acordo com as condições ambientais predominantes e a suscetibilidade da planta hospedeira, o patógeno pode se constituir em problema grave, chegando muitas vezes a comprometer seriamente a produção.

O fungo ocorreria também sobre muitas das nossas plantas indígenas, que atuariam como fonte natural de inóculo. Entre essas, poderiam ser citadas várias espécies pertencentes aos gêneros Sida, Ipomea, Lantana, Datura, Physalis, Solanum e Asclepias.

Como uma decorrência dessa polifagia de A.phaseolorum, e do hábito que têm muitos micologistas de considerar válidas diferenças morfológicas pouco significativas, criando novas espécies e associando o nome específico ao hospedeiro sobre o qual o fungo foi constatado, sem proceder previamente a um estudo acurado sobre a sua fisiologia e patogenicidade, a sistemática de A.phaseolorum tornou-se bastante complexa e confusa, conforme foi demonstrado por CROSSAN (1953, 1958) ao reduzir seis diferentes espécies a sinônimo de A.phaseolorum. Também ALCORN (1968) considerou A.oró Viegas - descrito por VIEGAS (1945) - como sinônimo de A.phaseolorum.

Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de:

1. Contribuir para o melhor conhecimento de alguns aspectos da fisiologia de A.phaseolorum,

2. Estudar comparativamente os sintomas induzidos, em berinjela, por A.phaseolorum e por P.vexans, procurando estabelecer diferenças entre os mesmos,

3. Estudar alguns aspectos da sintomatologia de A.phaseolorum em outras plantas de importância econômica e procurar a determinação de novos hospedeiros nessas e nas plantas nativas,

4. Estudar o emprego da sorologia, com a finalidade de estabelecer métodos auxiliares, para a especificação de A.phaseolorum e de outros fungos pertencentes ao gênero Ascochyta.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Considerações gerais sobre *A. phaseolorum* Sacc.

Segundo SUTTON e WATERSTON (1966), o fungo *Ascochyta phaseolorum* foi descrito pela primeira vez por SACCARDO em 1878 sobre feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Posteriormente, SACCARDO e outros autores constataram o mesmo fungo sobre outras plantas, considerando-o como espécies diferentes. Assim apareceram as espécies *A. althaeina* Sacc. & Bizz., *A. nicotinae* Pass., *A. lycopersici* Brum., conforme se verifica nos trabalhos de SACCARDO (1884, 1892).

Constatado por SYDOW e BUTLER (1916) sobre plantas de algodoeiro, na Índia, recebeu o nome de *A. gossypii* Syd. e, ainda, os nomes de *A. abelmoschi* Harter e *A. capsici* Bond. Mont. quando identificado respectivamente sobre quiabeiro por HARTER (1918) e sobre pimentão por BONDATZEVA=MONTEVERDE (1923)

Quem primeiro chamou a atenção sobre a semelhança existente entre algumas dessas espécies foi WEIMER (1951) que responsabilizou *Ascochyta gossypii* por uma doença do lúpulo (*Lupulus* sp.), na Georgia. HOLDEMAN e GRAHAN (1952), na Carolina do Sul, atribuíram manchas em folhas de fumo a *A. gossypii*, referindo-se às dificuldades encontradas em distinguir, morfológicamente, esta espécie, de *A. nicotinae*. ELLIS (1952) demonstrou através de inoculações cruzadas que *A. abelmoschi* isolado de quiabeiro era patogênico para diferentes espécies de feijoeiro, como *Phaseolus vulgaris* e *P. lunatus* L. e que *A. phaseolorum*, isolado desses dois últimos

hospedeiros, além de ser morfológicamente idêntico a A.abelmoschi, era igualmente patogênico para o quiabeiro. Baseado nesses dados, ELLIS sugeriu que, provavelmente, um único fungo fosse responsável por ambas as doenças. THOMPSON (1953) citou a semelhança morfológica existente entre A.abelmoschi e A.gossypii, demonstrando que essas duas espécies apresentaram o mesmo comportamento, tanto em inoculações cruzadas sobre quiabeiro e algodoeiro como em experimentos "in vitro", no tocante ao seu desenvolvimento, a diferentes temperaturas, apresentando um ótimo de crescimento ao redor de 25°C.

Mais tarde, CROSSAN (1953, 1958) trabalhando com mais de 200 isolamentos de Ascochyta provenientes de diversas regiões dos Estados Unidos e incluindo culturas de Ascochyta de procedência européia, obtidas em Baarn, Holanda (Central Bureau voor Schimmellcultures), ampliou esses estudos. Por meio de comparações morfológicas, culturais e fisiológicas "in vitro" e realizando ensaios de patogenicidade, através de inoculações cruzadas, ele reduziu as espécies A.altaeina, A.nicotianae, A.lycopersici, A.gossypii, A.capsici, A.abelmoschi a sinônimos de A.phaseolorum, que tem prioridade, como nome mais antigo. Este nome tem sido aceito pela maioria dos autores.

SCHIEBER (1964), em trabalho publicado sobre as principais doenças de feijoeiro, na Guatemala, relatou que os sintomas causados, nesta planta, por A.phaseolorum podem ser confundidos com os de "antracnose", (Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. e Magn.) Scrib.) e que este seria, provavelmente, o motivo porque a doença tem passado despercebida naquele País. O mesmo autor, teceu ainda diversas considerações sobre a importância da doença e da necessidade de

maiores estudos sobre sua sintomatologia e distribuição fazendo considerações sobre o problema de plantas nativas nos pedreiros, sobre as quais o patógeno sobreviveria, passando depois para as culturas comerciais.

ALCORN (1968), em Queensland - Australia - fez estudos sobre A. phaseolorum, como patógeno para o feijoeiro e para outras plantas de importância econômica, verificando que o fungo, sob aquelas condições, afeta um grande número de hospedeiros, inclusive plantas hortícolas, de pastagens, ervas daninhas e espécies indígenas. O mesmo autor relatou a ocorrência de infecção natural de 48 hospedeiros pertencentes a 14 famílias diferentes. Além disto, constatou que 12 espécies, nas quais não foram encontradas infecções naturais, eram afetadas por inoculações artificiais. Nesse trabalho, a berinjela foi incluída como planta suscetível ao patógeno.

Em nosso meio, com base no hospedeiro sobre o qual foi identificado, A. phaseolorum foi assinalado em São Paulo por BITANCOURT (1935), sob o nome de A. gossypii e na baixada fluminense por DESLANDES (1945) sob o nome de A. lycopersici. Neste último trabalho o autor fez referência à provável ocorrência do fungo sobre plantas nativas, citando entre estas, espécies dos gêneros Physalis, Sida, Solanum e Capsicum.

MULLER (1934) e BITANCOURT (1937) assinalaram Ascochyta abelmoschi, respectivamente em Minas Gerais e São Paulo. Sob o nome de A. phaseolorum, sua presença foi registrada por BITANCOURT e outros (1935), sobre folhas de fava de Belém (Phaseolus lunatus L.).

Segundo NAGAI (1961), o patógeno (A.abelmoschi) tem sido responsabilizado por graves prejuízos em culturas de quiabeiro na região da baixada fluminense - R.J. - principalmente em períodos de tempo frio e úmido.

TERANISHI e FIGUEIREDO (1968) relataram um severo ataque de A.phaseolorum em culturas comerciais de berinjela, nos municípios de Embu e Campinas, referindo-se à semelhança existente entre os sintomas causados, nessa planta, por A.phaseolorum e por Phomopsis vexans. FIGUEIREDO e TERANISHI (1968) procurando provar a identidade do fungo, estudaram alguns aspectos fisiológicos de A.phaseolorum e verificaram que os resultados foram comparáveis aos obtidos por CROSSAN (1958). Observaram, também, que o grau de patogenicidade variou de acordo com o hospedeiro sobre o qual o fungo era inoculado.

2.2. Considerações sobre sorologia aplicada à sistemática dos fungos

Desde o início deste século, os processos imunológicos vêm sendo desenvolvidos em diversos ramos da biologia e da microbiologia. O maior desenvolvimento desses estudos foi, sem dúvida, no campo da medicina humana e veterinária, na parte terapêutica e na identificação dos patógenos. Posteriormente, a sorologia foi estendida à virologia vegetal, à classificação taxonômica das plantas superiores, das bactérias, dos fungos e finalmente dos fungos fitopatogênicos.

Seria interessante salientar a opinião de SHATTOCK (1955), quando depois de muitos anos de experiência em estudos sobre sorologia de bactérias, afirmou estar convencido de que as técnicas sorológicas poderiam, com grandes vantagens, ser mais genericamente usadas no estudo sistemático de todos os grupos de microrganismos. A alta especificidade das reações sorológicas é determinada pela natureza química do antígeno, sendo possível detectar diferenças entre moléculas complexas, particularmente proteínas e polissacáridos, as quais não podem ainda ser distinguidas por análises químicas. A sorologia seria um delicado instrumento que permitiria comparar e separar componentes antigênicos da célula microbiana, fornecendo informações de grande utilidade para a classificação e identificação.

Na micologia relacionada com a medicina humana, a imunologia tem atualmente larga aplicação. O mesmo entretanto, não acontece no âmbito da fitopatologia, onde o problema se torna mais difícil, uma vez que poucos estudos foram até agora realizados. O que dificulta ainda mais sua utilização, é serem bastante complexos os métodos para determinação das características antigênicas específicas de cada microrganismo em estudo. Além disso, a experiência adquirida na micologia médica raramente pode ser estendida aos fungos fitopatogênicos, dadas as diferenças morfológicas e fisiológicas existentes entre os microrganismos estudados. Os fungos patogênicos para o homem, são, na maioria das vezes, leveduriformes e a metodologia sorológica, a eles aplicada, dificilmente se adapta aos fungos fitopatogênicos. Há, portanto, necessidade de muitos estudos e pesquisas para o desenvolvimento de métodos adequados, que permitam o conhecimento e a purificação dos fatores antigênicos específicos.

Quanto às perspectivas da sorologia, a simples possibilidade de separação genérica, através de tais métodos, já seria um dado de alto valor para a micologia fitopatológica, principalmente em estudos relativos aos deuteromicetos, onde, dada a artificialidade dos taxons, a posição sistemática de um determinado fungo, não significa qualquer relação de parentesco com os demais participantes do grupo em que o mesmo se situa. Neste caso, uma semelhança ou diferença sorológica entre dois gêneros próximos - ou distantes - poderia ser de grande significação para a filogenia.

Segundo SEELIGUER (1968), as primeiras tentativas sobre a aplicação de métodos sorológicos em micologia, datam do início deste século (1901) e foram dirigidas para a identificação de leveduras de interesse industrial. Mais tarde, diversos aspectos da candidíase oral e da esporotricose foram investigados por pesquisadores franceses. Contribuições fundamentais para o conhecimento dos efeitos imunológicos provenientes de infecções por dermatófitos, foram feitas por BLOCH e sua escola. Ao mesmo tempo MOSES, no Brasil, em 1916, estudava os aspectos sorológicos da blastomicose humana. A esse tempo, as muitas dificuldades técnicas e resultados decepcionantes levaram a uma idéia geral, expressa por muitos autores, de que os testes sorológicos pareciam ter pequeno interesse para a micologia, salvo para a micologia médica, na diagnose de algumas infecções micóticas profundas. Apesar desse aparente pessimismo, numerosos estudos foram desenvolvidos durante a década 1920-1930, fornecendo novas bases para a sorologia micológica, o que permitiu, mais recentemente, a elaboração de projetos para classificação sorológica. Posteriormente, ao lado de muita pesquisa individual, alguns gru-

pos de pesquisadores iniciaram estudos sistematizados - e a longo prazo - que resultaram na maioria dos conceitos que se tem hoje, sobre sorologia fúngica.

Em flagrante contraste com a riqueza da literatura no campo da micologia médica, e apesar da consagração de tais métodos para o estudo dos fungos, pouco ou quase nada existe na área da fitopatologia.

Os primeiros trabalhos sobre sorologia de fungos fitopatogênicos parecem datar da segunda década deste século. Assim é que, COONS e STRONG (1928) e NELSON (1933) tentaram a aplicação de métodos sorológicos para a diagnose de espécies do gênero Fusarium, não conseguindo, todavia, títulos suficientemente altos que fossem adequados para testes de precipitinas. O mesmo gênero foi também estudado por LINK e col. (1932) e LINK e WILCOX (1933) que estabeleceram uma metodologia para ser aplicada em testes sorológicos de reação em anel. Esses autores não puderam, entretanto, diferenciar espécies por testes de precipitinas em tubos.

MATSUMOTO (1929) preparou anti-soros para seis diferentes espécies de Aspergillus, empregando como antígeno imunizante esporos obtidos por centrifugação de suspensões preparadas a partir de culturas puras. Os esporos decantados eram ressuspensos em solução fisiológica salina. Essa era depois aquecida por 45 minutos a 65°C e então, injetada em coelhos por via endovenosa. Os anti-soros obtidos foram empregados em reações homólogas e heterólogas, contra antígenos de vinte e três espécies de Aspergillus e duas espécies de outros gêneros. Nessas experiências, foram usados testes sorológicos de aglutinação, precipitação e fixação de complemento. Segundo o autor, não foram conseguidos resulta-

dos satisfatórios nos testes de aglutinação, devido à dificuldades técnicas em se preparar suspensões estáveis de esporos. Mesmo nos tubos que continham soro normal, após 30 a 35 minutos, houve precipitação espontânea, havendo a formação de uma camada uniforme de esporos no fundo dos tubos. Dessa forma, não foi possível a leitura dos títulos. Entretanto, foi possível ao autor perceber que o soro anti-A.amsterlodami Millani, em reações homólogas, provocava ligeira - mas distinta - agregação de esporos, até a diluição de 1:80 após a incubação de 1 hora a 57°C. O soro normal, nas mesmas condições, provocava apenas tênue agregação até o título de 1: 20 e 1:40. Em vista desses resultados, o autor tentou melhorar o método, modificando a técnica de imunização. Para isso, utilizando como antígeno A.amsterlodami, foram imunizados dois coelhos, para os quais se empregaram duas técnicas diferentes. Numa das modificações, as suspensões de esporos foram previamente aquecidas à mesma temperatura anteriormente utilizada, e depois centrifugadas. Os esporos, separados do sobrenadante, foram triturados em almofariz e novamente misturados ao sobrenadante, procedendo-se então, à inoculação por via endovenosa. Na outra modificação, a suspensão de esporos foi previamente fervida por vinte minutos ao invés de ser aquecida a 65°C. A seguir, a metodologia usada foi idêntica a primeira modificação. Como resultado, os anti-soros obtidos pela primeira modificação não diferenciaram dos originalmente preparados, enquanto que aqueles obtidos pela segunda modificação deram reações iguais às do soro normal.

Nos testes de precipitação, segundo MATSUMOTO, os resultados foram mais satisfatórios. Neste caso, foram usados como antígenos os filtrados de culturas dos diversos fungos desenvolvidas em meio líquido. Pretendendo melhorar

os resultados dos testes de precipitação, MATSUMOTO tentou, sem sucesso, extrair antígenos específicos dos esporos, empregando como solvente o álcool absoluto, conforme sugerido por EAGLES em 1927, ou uma solução a 0,1% de etileno-diamina, segundo proposto por CITRON em 1925 (in MATSUMOTO 1929).

Os resultados dos testes de fixação de complemento foram comparáveis aos obtidos pelo método de precipitação.

BECK, (1934), trabalhando com alguns membros da família Ustilaginaceae, considerou encorajadores os resultados obtidos com o teste de precipitinas (prova do anel). O mesmo autor (1938) conseguiu diferenciar, ao nível de espécie, diversos membros da família Ustilaginaceae, somente falhando na separação de um mutante do fungo Ustilago hordei (Ders) K. & S. Utilizou como antígeno imunizante culturas desenvolvidas em meio líquido, as quais eram secadas a 45°C e depois trituradas em almofariz até ficarem reduzidas a pó. Este pó era depois ressuspensão em solução de cloreto de sódio a 0,85% e mantido por 18 a 24 horas em refrigerador. A seguir, o material era centrifugado, o sobrenadante injetado por via endovenosa e o sedimento ressuspensão em 10ml de solução fisiológica, para ser inoculado por via intraperitoneal. Para as reações do teste do anel foi usado, com antígeno, o sobrenadante obtido da primeira centrifugação.

Resultados interessantes foram obtidos mais tarde por CUNLEY e GOLDSMITH (1940). Estes autores trabalharam com o fungo Phymatotrichum omnivorum Shear., que na América do Norte é um patógeno importante, causador de podridão de raízes de algodoeiro. Baseando-se também em LINK e WILCOX (1933), eles empregaram as técnicas sorológicas da prova do

anel e de fixação de complemento, procurando esclarecer aspectos da biologia do fungo, no que se refere ao seu possível estágio sexuado. O anti-soro obtido para P.omnivorum foi comparado com antígenos de 14 gêneros diferentes, tendo os autores concluído que esse fungo apresenta grande afinidade sorológica com Gasteromicetos do gênero Lycoperdon, Secotium e Calvatia.

TEMPEL (1959) tentou diferenciar formas especiais e raças fisiológicas de Fusarium oxysporum (Schl.) Sn. & Hn. Inoculou coelhos por via intraperitoneal, endovenosa, subcutânea e intramuscular, utilizando diferentes preparações do fungo. Empregou testes de microaglutinação, microprecipitação e de dupla difusão em ágar. Verificou nos testes de aglutinação que os microconídios aglutinavam muito facilmente em tubo, mesmo com o soro normal, dificultando as leituras e impossibilitando o uso do método. Nos testes de precipitina as reações apareceram nos anti-soros e não nos soros normais havendo, todavia, muitas reações cruzadas. Segundo TEMPEL, o método mais adequado para diferenciar formas especiais, foi o de dupla difusão em ágar. A maioria dos anti-soros não diferenciaram as formas especiais, mas um anti-soro preparado com cultura líquida de F.oxysporum f.pisi (Schl.) Sn. & Hn. e outro com F.oxysporum f. lupini (Linf) Sn, & Hn. foram específicos. O mesmo autor fez alguns estudos sobre a caracterização dos antígenos, verificando que haviam antígenos ter-lábeis e termoestáveis, e que, estes reagiam somente contra o anti-soro obtido para microconídios. Verificou, ainda, a presença de proteínas em baixa concentração e que o antígeno termoestável, presente em culturas líquidas e extratos, reagia positivamente com o α naftol e que poderia ser precipita

do com álcool. Após outros estudos, concluiu que essas substâncias termoestáveis e redutoras consistiam em polissacáridos que continham em sua composição glucose e galactose. Estas, provavelmente, estariam presentes na parede celular dos microconídios.

BUXTON e col. (1961) também procuraram separar formas especiais e raças fisiológicas de Fusarium oxysporum por métodos sorológicos. Para isso imunizaram coelhos com esporos de F. oxysporum f. cubense E. F. Sm. e F. oxysporum f. pisi desintegrados por processo de alternância de temperaturas (congelamento e aquecimento sucessivos). Os anti-soros obtidos foram estudados contra antígenos de 23 formas e raças fisiológicas. Usando diversas diluições de antígenos foi possível caracterizar raças de Fusarium oxysporum f. cubense e Fusarium oxysporum f. pisi.

GOODING e POWERS (1964) estudaram as reações sorológicas entre Cronartium fusiforme Hedge & Hunt, C. cerebrum Hedge & Long e C. ribicola J.C. Fischer, injetando coelhos com homogenizados obtidos de aeciosporos não germinados e adjuvante completo de Freund. Os autores usaram o método de dupla difusão em ágar e verificaram, pelas diversas reações cruzadas, que os fungos são, sob o aspecto sorológico, intimamente relacionados. Empregando testes de absorção, verificaram que C. fusiforme e C. cerebrum continham todos os componentes antigênicos de C. ribicola e um ou mais componentes não absorvidos que C. cerebrum não possui. Neste trabalho são omitidos os detalhes do método utilizado.

MADHOSINGH (1964) fazendo comentários sobre as dificuldades taxonômicas existentes dentro do gênero, quando se emprega a morfologia como único método para a classificação, comparou sorologicamente três espécies de Fusarium:

F. oxysporum, F. moniliforme (Schl) Sn. & Hn. e F. solani (Mart) App. & Wr. em Sn. & Hn. Os fungos foram, separadamente, cultivados em meio líquido sintético e o micélio, proveniente de cada cultura, separado por filtração. A seguir, foi preparado um extrato, triturado-se o micélio em almofariz, o qual, depois de concentrado e misturado com adjuvante incompleto de Freund, foi empregado na imunização de coelhos. Os títulos do soro-imune, determinados pelo teste do anel, foram de 1:1.280. As comparações das reações antígeno-anticorpo, entre os três microrganismos, foram feitas aplicando-se o processo de dupla difusão em ágar. Comparando as diversas linhas de precipitação, o autor concluiu que havia uma nítida escala entre as relações sorológicas das tres espécies - estudadas - muito mais próximas entre F. oxysporum e F. moniliforme do que entre estas duas espécies e F. solani. Esses dados estão de acordo com os obtidos pelos morfologistas, Embora se refira à possibilidade de se conseguir soros específicos para cada uma das tres espécies, através de técnicas de absorção, o autor não aplicou essa técnica, restringindo-se a comentar o significado filogenético dos dados obtidos e o valor dos testes sorológicos para as pesquisas na identificação e taxonomia dos fungos.

MADHOSINGH (1964 b), usando processo semelhante ao anteriormente citado, fez estudos sorológicos comparativos entre Fomes roseus (Alb. & Schw.) Karst e Fomes subroseus (Weir) Overh. em suas fases haplóide e diploide. Verificou que esses fungos apresentam um sistema complicado de reações de precipitinas, indicando uma grande semelhança sorológica entre as duas espécies. Apesar dessa semelhança, o autor concluiu ser possível distinguir sorologicamente os dois fungos

estudados, mesmo que estes estejam em estágio haplóide, bem como dentro dos dois gêneros, distinguir o estágio haplóide do diplóide. Neste trabalho, também não foi empregada a técnica de absorção.

GOODING (1966), trabalhando com o fungo Fomes annosus (Fr.) Karst, procurou aperfeiçoar uma técnica para o isolamento de antígenos macromoleculares. Para isso o referido autor empregou culturas do fungo desenvolvidas em meio de cultura líquido sintético, que foram homogenizadas e injetadas em coelhos a razão de 15ml por animal, sendo 5ml em cada coxa e 5ml por via subcutânea. Obtidos os anti-soros, o autor procurou estudar o efeito de diversos processos de purificação, visando melhorar as características do antígeno para as reações sorológicas em testes de dupla difusão em ágar. Empregando processos químicos e centrifugação diferencial, conseguiu diminuir o número de linhas de precipitação nas reações dos antígenos purificados, quando comparadas com as obtidas com antígeno constituído pelo extrato bruto. Nesse trabalho o autor teceu comentários sobre a conveniência de se trabalhar com antígenos purificados quando são comparados diferentes biotipos, como também dificuldades, senão impossibilidade, de se interpretar reações sorológicas quando estas são constituídas por múltiplas linhas de precipitação.

AMOS e BURREL (1966) procuraram separar diversas espécies de fungos do gênero Ceratocystis, empregando técnicas de aglutinação, gel-difusão e imunoeletroforese. Para isso inocularam dois coelhos com suspensões de esporos de C. pluriannulata (Hedge) C. Moreau e C. fagacearum (Bertz) Hunt, as quais eram previamente tratadas por 24 horas com formalina a 0,9%. O anti-soro obtido foi comparado em reações homó-

logas e heterólogas com antígenos de C. fagacearum, C. pluriannulata; C. varispora (Davids.) C. Moreau; C. radiculicola (Bliss) C. Moreau; C. pitifera (Fries) C. Moreau; C. adiposa (Butl) C. Moreau; C. ulmi (Buism.) C. Moreau e C. ips (Romb) C. Moreau. Os autores verificaram que quando os esporos de C. fagacearum e C. pluriannulata eram submetidos a tratamento ultra-sônico, para em seguida serem usados como antígeno nas reações sorológicas de gel-difusão, havia a liberação de substâncias que difundiam no ágar fazendo com que as reações fossem mais nítidas. Nesse trabalho, depois de diversos ensaios, nos quais foram empregadas reações diretas e com absorção, os autores concluíram que, pelos resultados obtidos com oito espécies de Ceratocystis, as técnicas sorológicas podem servir como um meio excelente para identificação e separação de espécies morfológicamente muito semelhantes. E, finalmente, que para Ceratocystis, a sorologia mostrou-se promissora, com métodos, não somente mais rápidos, como também mais acurados do que os atualmente empregados.

MORTON e DUKES (1966), aplicando o método adotado por MADHOSINGH (1964), conseguiram separar a raça 1 da raça 2 de Fusarium oxysporum f. lycopersici empregando métodos diretos e de absorção em gel-difusão.

MADHOSINGH e WALLEN (1967) estudaram a diferenciação sorológica para espécies de Ascochyta, fazendo diversos comentários sobre as dificuldades em separá-las através de métodos morfológicos ou patológicos. Os organismos estudados foram: Ascochyta nisi Lib.; Ascochyta pinodella Jones e Ascochyta pinodes Jones. Aplicaram a técnica de dupla difusão em ágar, e de absorção, para as reações heterólogas, e concluíram, pelo estudo das linhas de precipitação, haver relações sorológicas distintas entre as tres espécies. Notaram

ainda, haver mais afinidade entre A.pinodella e A.pinodes que entre estas duas e A.pisi, e que estes resultados estariam de acordo com o comportamento dos fungos quanto a sua patogenicidade e outras características fisiológicas. A utilização da sorologia na identificação de fungos, tão intimamente relacionados quer sob o ponto de vista morfológico ou fisiológico, foi desenvolvida pela preparação de um soro-imune para A.pisi, através do emprego do processo de absorção com antígenos heterólogos (de A.pinodella e de A.pinodes).

GILL e POWELL (1969), usando extrato de micélio e métodos de imunodifusão, não lograram resultados satisfatórios na separação de oito raças fisiológicas de Phytophthora fragariae Hick.

Além de alguns trabalhos, nos quais MATSUMOTO (1929), TEMPEL (1959), GOODING (1966) demonstraram alguma preocupação com o esclarecimento da natureza química das substâncias fúngicas, que tem capacidade antigênica; mais recentemente, e principalmente no campo de micologia médica, muitos autores tiveram a sua atenção despertada para esse importante aspecto da sorologia, isso porque, com base nesses estudos, será possível selecionar antígenos altamente específicos.

Dentro desse campo de estudo diversos pesquisadores tem reconhecido a importância dos polissacáridos como antígenos de fungos.

WILCOX e LINK (1935) verificaram que polissacáridos isolados de "strains" de Neurospora tetrasperma Shear & Dodge reagiram positivamente, em testes de precipitinas, com anti-soros obtidos de coelhos imunizados contra tais "strains" e que o mesmo fenômeno sucedia com carboidratos específicos e solúveis isolados de oito "strains" de N.sitophila Shear & Dodge, quando em reações com os respectivos anti-soros.

BISHOP e col. (1960) investigaram a estrutura de polissacáridos existentes nas paredes celulares de leveduras, visando elucidar o seu contexto sorológico. Além destes, muitos outros autores (BISHOP e col. 1962; KWAPINSKI 1963 ; SUMMERS e col. 1963) têm estudado os polissacáridos e outras frações antigênicas, procurando determinar suas estruturas químicas, relações sorológicas e especificidade.

Segundo PEPYS e LONGBOTTON (1967), que reuniram boa parte da literatura neste campo de estudo, a importância imunológica dos polissacáridos como antígenos específicos de fungos e bactérias é tão grande, que tem estimulado diversos autores, a obter polissacáridos purificados e livres de proteínas. Ainda de acordo com esses autores, investigações recentes, com polissacáridos de fungos, tem demonstrado que eles contêm uma série de reagentes úteis para a produção de reações antígeno-anticorpo altamente específicas.

Na literatura nacional, nada pudemos encontrar sobre a aplicação de métodos sorológicos em estudos sobre os fungos de interesse fitopatológico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de A.phaseolorum

3.1.1. Cultura do patógeno utilizada

Para esses ensaios foi empregada a cepa de A.phaseolorum n^o IB 731 G, isolada em 1968, de plantas de berinjela da variedade Nacional, provenientes do Município de Embu, e que, em ensaios já realizados anteriormente (TERANISHI e FIGUEIREDO 1968) mostrou ser altamente patogênica para a berinjela e para outras plantas de interesse econômico.

3.1.2. Método para esporulação do fungo

Após a utilização preliminar de diversos meios de cultura naturais e sintéticos, os melhores resultados foram obtidos empregando-se, como substrato, grãos inteiros de feijão esterilizados. Nestes testes, foram empregadas as espécies Phaseolus vulgaris L. das variedades roxinho, jalo, mu_latino, chumbinho e Phaseolus angularis Kaw. comumente conhecido pelo nome de Azuki.

O método foi o seguinte: a quantidade de feijão necessária para o preparo do inóculo era lavada para a eliminação dos resíduos de terra e detritos e depois colocada para embebição em água, por um período de 24 horas. Em seguida, era feita nova lavagem eliminando-se o excesso de água, e os grãos embebidos distribuídos em Erlenmeyers de 125 ml, a razão de 20g por frasco. Estes eram então autoclavados por um período de 30 minutos a 120°C. O fungo era depois repicado para os Erlenmeyers contendo o meio e incubado à tem

peratura adequada (21°C). Muitas vezes, foram empregados em vez de Erlenmeyers, tubos de ensaio contendo 5g de feijão. O método foi posteriormente aplicado para todas as cepas de Ascochyta, estudadas nos ensaios subsequentes e que constam do ítem 3.4.2.1.

3.1.3. Crescimento do fungo a diversas temperaturas

Para estudar os efeitos da temperatura sobre o crescimento vegetativo do fungo A.phaseolorum foi realizado um ensaio em meio de Czapeck sólido.

Após a esterilização, em autoclave, o meio foi distribuído em placas de Petri de fundo chato, medindo 10cm de diâmetro por 2cm de altura, a razão de 20ml por placa. A repicagem foi feita no centro da placa empregando-se, para isso, pequenos cilindros de 5mm de diâmetro de meio de cultura contendo o fungo, retirados por meio de um furador de rolhas, da parte periférica de culturas puras, com 6 dias de idade e desenvolvidas em placas de Petri contendo meio de batata, ã-gar e dextrose (B.A.D). As placas assim preparadas, foram en tão colocadas em câmaras de temperatura controlada para 3;9; 12; 15; 18; 21; 24; 27; 30 e 33 graus centígrados, empregan-do-se 6 repetições para cada nível de temperatura.

A leitura foi realizada após 7 dias, pela medida do diâmetro médio das culturas para cada uma das repeti ções. Segundo BROWN (in HAWKER 1950), esse método em que se mede o diâmetro médio de culturas em meio sólido, é bastante adequado para o estudo do crescimento de fungos a diferentes temperaturas e o melhor par ser aplicado em estudos explora tórios.

3.1.4. Determinação da temperatura ideal para esporulação

Para a determinação da temperatura mais adequada para esporulação, o meio empregado foi o de feijão, preparado como em 3.1.2. Após a repicagem do fungo (cepa IB 731G) os frascos (Erlenmeyers) foram incubados por 10 dias sob condições de temperatura controlada, empregando-se um frasco para cada temperatura. As temperaturas utilizadas foram 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27 e 30 graus centígrados. Para efeito de documentação, a experiência foi também realizada utilizando-se em lugar de Erlenmeyers, tubos de ensaio contendo 5g de feijão. Depois do período de incubação, os frascos foram abertos e deles retirados separadamente 1,5g de meio contendo o fungo. À cada amostra de 1,5g foi juntada 50ml de água destilada, submetendo-se a trituração em liquidificador por um período de 5 minutos. Os produtos da trituração foram peneirados por 3 vezes, empregando-se 2 peneiras tipo Granutest, acopladas e com malhas de 0,149 e 0,044mm, para eliminar detritos de feijão. Dessa maneira foram obtidas suspensões de conídios, de forma padronizada, e cujas concentrações de esporos por ml foram calculadas ao microscópio empregando-se um hematocitômetro (Improved Neubauer 1/400 SQ.MM 1/10mm deep ultraplane).

3.1.5. Obtenção de suspensões de esporos

As suspensões de esporos foram obtidas acrescentando-se água estéril às culturas esporuladas em meio de feijão, contidas em Erlenmeyers ou tubos de ensaio e submetendo-as a agitação moderada para facilitar a liberação dos conídios. Para separação de impurezas a suspensão era posteriormente submetida a uma peneiragem pelo mesmo processo descrito em 3.1.4.

3.1.6. Determinação da temperatura ideal para germinação dos conídios

Para determinação da temperatura mais adequada para germinação dos conídios procedeu-se da maneira que se segue:

Lâminas de vidro para microscopia foram recobertas com 2ml de meio de ágar água (20g de ágar/1 litro de água) previamente fundido em banho-maria. Após a solidificação do meio sobre as lâminas, foi aspergida de maneira uniforme uma suspensão de $2,8 \times 10^6$ esporos/ml, obtida a partir de cultura pura com 18 dias de idade. A aspensão foi feita como auxílio de um aspersor de vidro, acionado a ar comprimido. As lâminas assim tratadas foram então colocadas dentro de placas de Petri estéreis, com dimensões de 12cm de diâmetro por 2cm de altura, a razão de tres lâminas por placa. No interior das placas foi colocado um chumaço de algodão embebido em água, para evitar a desidratação do meio. As placas assim preparadas foram então colocadas em câmaras de temperatura controlada. As temperaturas experimentadas foram: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 e 36 graus centigrados, colocando-se uma placa a cada temperatura. As leituras foram realizadas, ao microscópio, após 6 e 12 horas de incubação contando-se 200 esporos de cada lâmina e anotando-se a porcentagem de germinação.

3.1.7. Determinação da idade ideal aproximada da cultura para seu emprego em testes de patogenicidade

Para determinação da idade mais adequada para a utilização dos conídios no preparo de inóculo, empregou-se o método seguinte:

Após a embebição dos grãos de Azuki, estes foram distribuídos em 40 tubos de ensaio a razão de 5g por tubo, que foram fechados com tampas de algodão e autoclavados. Após a autoclavagem e resfriamento, os tubos foram vedados com rolhas de borracha, também estéreis, empurrando-se um pouco a tampa de algodão para dentro do tubo e armazenados em refrigerador. Na ocasião da repicagem a tampa de borracha era retirada conservando-se apenas a de algodão. O emprego da vedação dos tubos com rolhas de borracha teve por finalidade evitar a perda de água e consequente desidratação do meio de cultura, antes da sua utilização. As repicagens, foram feitas diariamente, retirando-se a rolha e transferindo-se o fungo A. phaseolorum para dois dos tubos, que eram posteriormente colocados em estufa de temperatura controlada para 21°C. Dessa forma foram obtidas culturas com um gradiente de idade variando de um dia, de uma para outra. O material dos tubos foi utilizado quando a cultura do último tubo atingiu a idade de 7 dias. Foram assim obtidas e testadas culturas esporulantes cuja idade variava de 7 a 27 dias. Tomou-se como idade mínima para o teste, culturas de 7 dias porque apenas após esse período a esporulação se torna perceptível, pelo aparecimento dos primeiros picnídios. Quando os tubos foram abertos o conteúdo dos dois tubos de mesma idade foi colocado em Erlenmeyers de 125ml aos quais se juntavam 50ml de água estéril. Depois de um período de 15 minutos de repouso, para permitir a embebição do material, os frascos eram periodicamente agitados vigorosamente, para permitir a liberação dos esporos, até completar 30 minutos. As suspensões de esporos assim preparadas foram então peneiradas, para separação de detritos do meio de cultura e fragmentos do micélio.

A seguir, de cada amostra foi determinada a concentração de esporos por ml com auxílio do hematocitômetro e com os dados obtidos foi determinado o gráfico 2. Em seguida, de cada amostra foi testada a viabilidade dos esporos a 21°C pelo mesmo método empregado no item 3.1.6. A leitura das lâminas foi feita 6 horas após, anotando-se a porcentagem de germinação. Com os dados obtidos foi construído o gráfico 3. A superposição dos gráficos 2 e 3 forneceu a área correspondente a ida de ideal aproximada das culturas para ensaios de patogenicidade.

3.1.8. Efeito da alternância de temperaturas

Teve por finalidade estudar o efeito de período dos curtos de temperaturas altas e baixas sobre o fungo. Para isso foi montado um experimento da maneira que segue:

54 frascos Erlenmeyers de 125ml, contendo 40ml de meio líquido de Czapeck estéril, foram inoculados com 3 gotas de uma suspensão de esporos em água destilada estéril numa concentração de 10^6 /ml e colocados em uma câmara de temperatura controlada para 24°C.

Após 24 horas foram retirados grupos de 6 frascos e transferidos para câmaras de temperaturas ajustadas para 12, 15, 18, 21, 27, 30, 33 e 36 graus centígrados aí permanecendo por um período de 4 horas para depois retornarem à temperatura base (24°C). Um grupo de seis frascos foi mantido permanentemente a 24°C como controle. Essa operação foi repetida diariamente por todo o período de duração do ensaio.

A coleta dos dados foi realizada após 10 dias de incubação pela pesagem do micélio. Para isso o micélio contido em cada frasco foi colhido separadamente, por filtração

ção das culturas, em discos de papel de filtro previamente pesados. A filtração foi feita com o auxílio de um funil de Buckner e de um Kitasato, cuja operação era acelerada pelo emprego de uma trompa de vácuo. Os discos de papel contendo o micélio foram então colocados para secar em forno Pasteur a 60°C, até peso constante. O peso do micélio seco foi depois obtido, pela diferença em relação a primeira pesagem.

Após a obtenção do peso do micélio de todos os frascos, foi calculada a média para cada temperatura.

3.2. Estudo comparativo entre os sintomas induzidos em berinjela por A.phaseolorum e por P.vexans

3.2.1. Exames de material herborizado

Como parte inicial dos estudos comparativos entre A.phaseolorum e P.vexans procedeu-se ao reexame microscópico de todos os materiais de berinjela, constantes do herbário da Seção de Micologia Fitopatológica em que o fungo P.vexans figurasse como agente responsável. Assim foram examinadas as seguintes exicatas:

Nº	ESPECIMEM	DATA COLETA	LOCALIDADE
4825	Frutos	23-08-1944	Itariri - SP
4865	Folhas	30-12-1944	Itararé - SP
6651	Hastes e folhas	23-07-1956	Jaú - SP
9135	Caules	29-07-1957	Terra Roxa- SP

3.2.2. Culturas utilizadas

Para o estudo comparativo, os sintomas foram obtidos através de inoculações experimentais e para isso foi empregada a cultura de A.phaseolorum IB 731 G já referida no item 3.1.1. e duas cepas de Phomopsis vexans, a cultura IB 827 G isolada em 16-05-68 de hastes e frutos de plantas de berinjela provenientes do município de Bebedouro, S.P., e a cepa IB 932 G que corresponde a cultura nº 127.14 C.B.S.do Central Bureau voor Schimmelcultures - Baarn, Holanda, gentilmente cedida pelo Dr. J.A. von Arx.

Nos ensaios de inoculações preliminares realizados, a cepa IB 932 G mostrou-se pouco patogênica, com desenvolvimento muito lento dos sintomas. Diante desse fato, a cepa foi abandonada passando-se a empregar apenas a cepa IB 827 G.

3.2.3. Obtenção de suspensões de esporos

O método seguido para obtenção de suspensão de esporos de A.phaseolorum foi o mesmo descrito no item 3.1.5.

Para P.vexans as suspensões foram obtidas a partir de culturas puras, desenvolvidas em tubos contendo meio de B.A.D. (2% de ágar e 2% de dextrose) com aproximadamente 25 a 30 dias de idade. Aos tubos de cultura contendo as frutificações de P.vexans era acrescentada certa quantidade de água destilada estéril promovendo-se posteriormente a raspagem da superfície do meio com uma agulha estéril para facilitar a liberação dos esporos. Depois a suspensão obtida era peneirada em duas peneira tipo Granutest, já descritas anteriormente

3.2.4. Inoculações experimentais

3.2.4.1. Variedades de berinjela utilizadas

As seguintes variedades foram estudadas comparativamente quanto aos sintomas causados por A.phaseolorum e P.vexans:

Santa Genebra ou Campinas (I 3015); Gigante (I 3340); Giant White (I 3743); Pitangueiras (I 2201); Forth Myers Market (I 506); Florida Market (I 2104); Early Long Purple (I 1793); Nacional ou Embu e Híbrida de Piracicaba (F 100). As 7 primeiras variedades foram obtidas da coleção do Instituto Agrônômico; a variedade Embu ou Nacional, na Cooperativa Agrícola de Cotia e o Híbrido da coleção do Departamento de Genética da E.S.A.L.Q.

3.2.4.2. Ensaio em laboratório

3.2.4.2.1. Inoculações de folhas - As inoculações foram realizadas empregando-se o 3º ou 4º par de folhas de plantas jovens (± ou - 3 meses de idade) de cada uma das 9 variedades, cultivadas em condições de estufa.

As folhas foram retiradas das plantas cortando-se o pecíolo junto da haste, de maneira que o mesmo ficasse o mais longo possível. Após essa operação as folhas foram levadas ao laboratório e com o auxílio de um aspersor de vidro, acionado a ar comprimido, foram inoculadas nas duas faces, com suspensões de esporos do fungo preparado como descrito nos itens 3.1.5. e 3.2.3.

As suspensões de esporos foram sempre acrescidas de um espalhante adesivo (Esapon) para melhorar a distribuição.

buição do inóculo empregando-se 1 gota para cada 100ml da suspensão. Na operação de aspersão houve sempre o cuidado de se colocar as folhas a certa distância do aspersor, de maneira que a cobertura das folhas fosse o mais homogênea possível, sem que houvesse escorrimento do excesso de suspensão.

Nos ensaios preliminares foram empregadas suspensões com as concentrações acertadas para: 10^7 ; 10^6 ; 10^5 e 10^4 conídios por ml. Posteriormente o método foi padronizado, passando-se a empregar apenas a concentração de 10^6 conídios por ml, que permite melhor leitura dos resultados. No caso de P.vexans os estilosporos não foram computados para efeito da concentração de esporos.

Após as inoculações, as folhas foram colocadas em câmaras úmidas constituídas por caixas plásticas de 30 x 22 x 10cm, transparentes e com tampa, do tipo normalmente utilizado para refrigeradores caseiros.

As caixas foram previamente desinfetados e para evitar o contato das folhas com o fundo das caixas plásticas, fator esse que poderia alterar a homogeneidade na distribuição e intensidade dos sintomas, foi preparada uma armação construída com papel de filtro grosso dobrado e perfurado de modo que as folhas ficassem ligeiramente apoiadas na armação pela face inferior e os pecíolos, passando através da perfuração do papel, apenas tocassem o fundo da caixa. A estas se juntava certa quantidade de água que fosse suficiente para que as extremidades dos pecíolos ficassem submersas. Foram usadas 6 caixas: 3 contendo folhas inoculadas com A.phaseolorum e 3 com P.vexans. Cada caixa continha 15 folhas sendo 5 para cada variedade. Dessa maneira obteve-se 45 folhas inoculadas com cada fungo. As caixas eram depois fecha-

das e colocadas em câmaras com temperatura controlada para 21°C onde as condições ambientais são adequadas para o crescimento dos fungos e as folhas permanecem em boas condições por um período de tempo mais longo. As folhas controle, num total de 15, foram aspergidas com água estéril e submetidas ao mesmo tratamento. Segundo NAMEKATA (2), processo semelhante a esse tem sido usado no Japão para inoculação de folhas de citros em estudos sobre Xanthomonas citri (Hasse) Dow.

As leituras foram realizadas 4 dias após as inoculações e a documentação fotográfica depois de 6 dias.

3.2.4.2.2. Inoculação de frutos - Para comparar os sintomas induzidos por A.phaseolorum e P.vexans foram empregados frutos de tamanho médio e adquiridos no mercado. Portanto não foi possível a determinação da variedade utilizada. Os frutos foram previamente lavados com água e sabão depois com água destilada esteril e secos com toalha, também estéril.

As inoculações foram realizadas adotando-se duas técnicas diferentes. Uma delas foi injetando-se 0,5ml de suspensões de esporos sob a casca dos frutos com o auxílio de uma seringa hipodérmica. Outra técnica adotada foi perfurar os frutos com o auxílio de uma agulha estéril e em seguida introduzir pela perfuração corpos de frutificação. No caso de P.vexans as frutificações foram obtidas em meio de B.A.D. e para A.phaseolorum a partir de culturas desenvolvidas sobre meio de Azuki.

Após as inoculações, as perfurações foram cobertas com pequena peça de esparadrapo, os frutos colocados dentro de caixas plásticas do tipo utilizado no ítem 3.2.4.2.1. e a seguir deixados para incubação no laboratório à tempera

(2) TAKAO NAMEKATA - informação pessoal

tura ambiente. Ensaio preliminares demonstraram ser preferível deixar as caixas plásticas parcialmente descobertas evitando a formação de câmara excessivamente úmida pois, apesar da assepsia inicial, é bastante difícil a eliminação de agentes secundários de podridões instalados junto ao pedúnculo dos frutos ou entre as brácteas do cálice persistente. Essas podridões, muitas vezes de origem bacteriana, se generalizam dificultando a leitura dos resultados.

3.2.4.3. Ensaio em casa de vegetação

3.2.4.3.1. Inoculações por aspersão - Nestes ensaios foram empregadas plantas com tres a quatro meses de idade. Para as inoculações foram utilizadas oito plantas de cada variedade, sendo quatro inoculadas com A.phaseolorum e quatro com P.vexans.

Foram aplicadas sobre as folhas e hastes suspensões de conídios em concentrações iguais as utilizadas nos ensaios "in vitro" ou seja 10^6 esporos por ml.

A aspersão foi feita com um aspersor de vidro, acionado a ar comprimido, de maneira a se obter uma cobertura completa das plantas atingindo as faces superiores e inferiores das folhas. Também neste caso, foi empregada uma pequena quantidade de espalhante adesivo (Esapon) para assegurar sucesso na inoculação. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 48 horas em condições de câmara úmida. Isso foi conseguido colocando-se as plantas no interior de um compartimento envidraçado da casa de vegetação, com dimensões de 2,4m de comprimento ; 0,80m de largura e 1,10m de altura, contendo no seu interior um bico para tomada de água e outro

para ar comprimido e construindo-se um aparelho pelo qual se obtinha a aspersão de água dentro da câmara a cada 10 minutos. Dessa maneira foi possível manter as plantas sempre umedecidas sem que houvesse escoamento de água e conseqüente lavagem das folhas. As leituras foram realizadas após seis dias e a documentação fotográfica após 10 e 14 dias.

3.2.4.3.2. Inoculações por injeção - Para estes ensaios foram empregadas plantas de quatro a cinco meses de idade, plantadas em vasos e desenvolvidas em condições de casa de vegetação. As inoculações de A.phaseolorum e P.vexans foram feitas usando-se tres a quatro plantas de cada variedade. A agulha hipodérmica era inserida na haste principal de baixo para cima e depois ligeiramente recuada de modo a propiciar pequeno espaço onde era injetada pequena quantidade das suspensões de esporos a uma concentração aproximada de 10^6 esporos por ml. As plantas controle foram inoculadas com água destilada. Por injeção foram também inoculados alguns frutos das variedades Giant White e Sta. Genebra, desenvolvidos em casa de vegetação. Neste caso, as inoculações foram feitas injetando-se 0,5ml das suspensões, sem destacar os frutos das plantas.

3.3. Alguns aspectos da sintomatologia induzida por A. phaseolorum em outras plantas de importância econômica e determinação de novos hospedeiros

Com a finalidade de esclarecer alguns aspectos da doença causada por A.phaseolorum em outras plantas de interesse econômico procurou-se, na medida do possível, cole

tar dados de campo e de laboratório e reunir documentação fotográfica que pudesse contribuir para o reconhecimento da doença. Uma parte do material empregado para documentação foi proveniente de infecções naturais e coletada em culturas de diferentes municípios. Outra parte, foi obtida através de inoculações em condições de estufa, as quais, foram sempre realizadas empregando-se a técnica descrita em 3.2.4.3.1.

Os sintomas de Ascochyta phaseolorum foram estudados, principalmente, para as plantas de: algodão, feijão, vagem, pimentão, quiabeiro e tomate, em cujas culturas a doença costuma aparecer com maior frequência ou gravidade.

Para determinação de hospedeiros naturais, inicialmente procurou-se identificar e isolar o patógeno a partir da coleta de plantas nativas que apresentassem lesões semelhantes causadas pelo fungo A. phaseolorum. Essa coleta era realizada, preferencialmente, ao redor de culturas econômicas tais como: berinjela, vagem, feijão, etc., que estivessem atacadas pelo patógeno, aumentando assim a probabilidade de sucesso. Entretanto, embora o fungo tivesse sido isolado muitas vezes, as dificuldades encontradas para identificação das plantas nativas obrigou o abandono do método. Diante desse fato, e visando contornar essa dificuldade procedeu-se de maneira inversa, ou seja, foram relacionadas diversas plantas nativas que após identificação eram transplantadas para serem inoculadas por aspersão, em condições de estufa. O critério de seleção baseou-se, em parte, no trabalho realizado por ALCORN (1968) que em Queensland - Austrália - relacionou 48 hospedeiros naturais de A. phaseolorum pertencentes a 14 diferentes famílias botânicas. Dessa forma foram inoculadas, segundo a técnica descrita em 3.2.4.3.1. as diversas

plantas constantes da tabela I. Nessa relação, foram incluídas algumas poucas plantas de interesse econômico. As leituras dos resultados foram feitas seis dias depois da inoculação. De acordo com a presença e intensidade dos sintomas apresentados, as plantas foram classificadas como: imunes ou não suscetíveis (-), suscetíveis (+) e altamente suscetíveis (++) . Após a leitura foram coletadas amostras das plantas para exames de laboratório e reisolamento do patógeno.

3.4. Emprego da sorologia como método auxiliar para identificação de A.phaseolorum e especificação de fungos do gênero Ascochyta

Para os estudos sorológicos foram empregadas diversas culturas de Ascochyta. Algumas supostamente de A.phaseolorum, em virtude dos hospedeiros de onde tinham sido isoladas. Outras, provavelmente, pertencentes a outras espécies e isoladas de plantas sobre as quais A.phaseolorum não tem sido identificado. Muitas culturas foram especialmente isoladas para emprego nos diversos testes, outras, selecionadas da coleção do Instituto Biológico. Além de fungos do gênero Ascochyta, outros gêneros entraram nos ensaios com a finalidade de testar a especificidade do método. Como cepa padrão de A.phaseolorum foi empregada a cultura IB 731 G.

3.4.1. Isolamento das cepas

O material vegetal utilizado para os isolamentos de diversas cepas empregadas no presente trabalho constituiu de hastes, frutos e folhas das diversas plantas coletadas no campo e apresentando lesões características de fungos do gênero Ascochyta.

TABELA I - Relação de plantas inoculadas com *A. phaseolorum*

NOMES CIENTÍFICOS	FAMÍLIA	NOMES VULGARES
<u>Ageratum conyzoides</u> L.	Compositae	catanga de bode
<u>Amarantus hybridus</u> L.	Amarantaceae	caruru; caruru bravo; caruru de folha larga
<u>Amarantus viridis</u> L.	Amarantaceae	caruru; caruru manso; caruru de folha estreita
<u>Asclepias curassavica</u> L.	Asclepiadaceae	oficial de sala; paina de sapo; falsa erva de rato
<u>Bidens pilosa</u> L.	Compositae	picão; picão preto
<u>Brassica</u> sp	Cruciferae	nabo selvagem; nabo bravo
<u>Chenopodium ambrosioides</u> L.	Chenopodiaceae	erva de Sta. Maria; erva do bicho
<u>Chenopodium</u> sp	Chenopodiaceae	quenopodio
<u>Cynara scolymus</u> L. *	Compositae	alcachofra
<u>Datura stramonium</u> L.	Solanaceae	estramonio; figueira do inferno
<u>Euphorbia prunifolia</u> Jacq	Euphorbiaceae	amendoim bravo
<u>Galinsoga parviflora</u> Cav.	Compositae	picão branco; fazendeiro
<u>Ipomea batatas</u> (L.) Lamb. *	Convolvulaceae	batata doce
<u>Ipomea cairica</u> Sweet	Convolvulaceae	campinha
<u>Ipomea longicuspis</u> Meisso	Convolvulaceae	campinha
<u>Lantana camara</u> L.	Verbenaceae	camará miúdo, erva de grilo
<u>Leonotis</u> sp	Labiatae	-----
<u>Leonurus sibiricus</u> L.	Labiatae	mato ximango; erva do Santos Filho; rubi
<u>Malva parviflora</u> L.	Malvaceae	malva
<u>Nicandra physaloides</u> L.	Solanaceae	joá de capote; quintilho
<u>Physalis</u> sp	Solanaceae	joá de capote
<u>Plantago media</u> L.	Plantaginaceae	língua de vaca
<u>Polygonum</u> sp	Polygonaceae	erva de bicho
<u>Richardsonia brasiliensis</u> Hayne	Rubiaceae	poalha; poalha branca
<u>Rumex obtusifolius</u> L.	Polygonaceae	azeda graúda; azedinha do brejo
<u>Siegesbeckia</u> sp	Compositae	-----
<u>Sida rhombifolia</u> L.	Malvaceae	vassoura; guaxuma; guaxumba; mata pasto
<u>Sida</u> sp	Malvaceae	vassoura; guaxuma; guaxumba; mata pasto
<u>Solanum aculeatissimum</u> Moench	Solanaceae	joá
<u>Solanum americanum</u> Mill.	Solanaceae	erva moura; maria preta; maria pretinha
<u>Solanum ciliatum</u> Lam.	Solanaceae	joá bravo; mata cavalo
<u>Solanum viarum</u> Dunal	Solanaceae	joá bravo, joá amarelo
<u>Sonchus oleraceus</u> L.	Compositae	serralha
<u>Taraxacum officinale</u> Weber	Compositae	dente de leão; almeirão bravo

* plantas de interesse econômico

Para os isolamentos foram empregados os seguintes processos:

3.4.1.1. Isolamento direto

Com o auxílio de uma lupa e uma agulha histológica, eram retirados diversos picnídios ou os esporos extrudados os quais eram semeados em placas de ágar água (A.A.). Após o crescimento era feita repicagem para tubos de B.A.D. Este processo foi empregado somente quando sobre as lesões era observada farta frutificação do fungo.

3.4.1.2. Isolamento direto com flambagem

As partes vegetais contendo as lesões eram mergulhadas rapidamente em álcool 95°GL, flambadas em bico de Bunsen, procedendo-se posteriormente ao isolamento. Este processo foi empregado principalmente, quando o material era constituído de frutos ou hastes e não eram observadas frutificações do fungo.

3.4.1.3. Isolamento com desinfecção

As partes lesadas eram cortadas em pedaços, de 2 ou 3cm, mergulhadas durante 1 minuto em álcool a 95°GL, retiradas e novamente mergulhadas pelo mesmo espaço de tempo em solução de sublimado corrosivo a 1:1.000. Posteriormente

o material era lavado por diversas vezes em água estéril e colocado em placas de Petri também estéreis, contendo papel absorvente para eliminar o excesso da água de lavagem. A seguir, era cortado e fragmentado assépticamente com o auxílio de um bisturi e semeado em placas de Petri contendo meio de A.A. ou B.A.D., colocando-se 4 a 5 fragmentos por placa. Após o crescimento, as culturas eram repicadas para tubos contendo B.A.D. e guardadas para uso posterior.

3.4.1.4. Isolamento por câmara úmida

Como medida de garantia para isolamento dos fungos, uma parte dos materiais, nos quais o fungo não frutificava e para os quais se empregou os processos de isolamento com flambagem e desinfecção, foi separada e colocada no interior de cubas de vidro, em condições de câmara úmida, para induzir a esporulação do fungo. Quando havia esporulação, os isolamentos eram realizados pelo processo já descrito em 3.4.1.1.

3.4.2. Relação das culturas utilizadas nos ensaios sorológicos3.4.2.1. Relação das culturas de Ascochyta

NÚMERO CULTURA	HOSPEDEIRO	DATA DO ISOLAMENTO	DO PROCEDENCIA
IB 723G	Cafê (<u>Coffea arabica</u> L.)	28-08-68	São Paulo SP
IB 731G*	Berinjela (<u>Solanum melongena</u> L.)	05-07-68	Embu SP
IB 757G	Cafê	-- -- --	Kenya Africa
IB 791G	Couve flor (<u>Brassica oleracea</u> L. var. <u>botrytis</u> L.)	15-08-68	Embu SP
IB 795G	Berinjela	04-06-67	Campinas SP
IB 798G	Repolho (<u>B.oleraceae</u> L.var. <u>capitata</u> L.)	15-09-68	Embu SP
IB 799G	Tomate (<u>Lycopersicon esculentum</u> Mill.)	25-09-68	Embu SP
IB 802G	Algodão (<u>Gossypium hirsutum</u> L.) (folha)	17-01-69	R.Preto SP
IB 804G	Quiabo (<u>Hibiscus esculentum</u> L.)	10-03-69	Embu SP
IB 834G	Couve flor	20-08-68	Embu SP
IB 853G	Berinjela	26-10-69	Caraguatatu- ba SP
IB 863G	Pimentão (<u>Capsicum annum</u> L.)	03-11-69	Embu SP
IB 865G	Vagem (<u>Phaseolus vulgaris</u> L.)	03-11-69	M.das Cruzes SP
IB 866G	Repolho	03-11-69	M.das Cruzes SP
IB 867G	Xuxu (<u>Sechium edule</u> L.)	17-11-69	Embu SP
IB 873G	Tomate	02-12-69	M.das Cruzes SP
IB 886G	Pepino (<u>Cucumis sativus</u> L.)	17-12-69	Atibaia SP
IB 893G	Mamoeiro (<u>Carica papaya</u> L.)	10-06-69	Brasília DF
IB 894G	Alcachofra (<u>Cynara scolymus</u> L.)	17-10-69	V.Grande SP
IB 909G	Berinjela	05-12-69	Embu SP
IB 931G	Tomate	-- -- --	CBS Baarn Holanda
IB 946G	Tomate (fruto)	12-08-70	Jaraguã do Sul SC
IB 947	Algodão	12-08-70	Embu SP

* Cultura padrão de Ascochyta phaseolorum

3.4.2.2. Outras culturas utilizadas

NÚMERO CULTURA	FUNGO	HOSPEDEIRO	DATA ISOLAMENTO	DO PROCEDENCIA
IB 241G	<u>Aspergillus niger</u> V.Tiegh	Cebola	14-03-62	S.J.R. Preto SP
IB 278G	<u>Penicillium digitatum</u> Sacc.	Citros (frutos)	29-08-62	Limeira SP
IB 279G	<u>Penicillium italicum</u> Wehmer	Citros (frutos)	09-11-62	Limeira SP
IB 334G	<u>Aspergillus flavus</u> Link	- - -	-- -- --	IMUFP Pe
IB 408G	<u>Pestalotia palmarum</u> Cke.	Coqueiro (raquis)	-- -- --	Caraguatatu- ba SP
IB 428G	<u>Fusarium moniliforme</u> Sheld var. subglutinans Wr. & Rig.	Abacaxi (frutos)	30-11-64	Sete Lagoas MG
IB 526G	<u>Ceratocystis paradoxa</u> (Dade) C. Moreau	Coqueiro (frutos)	22-03-66	- - - -
IB 747G	<u>Verticillium albo-</u> <u>atrum</u> Reink & Berth,	Tomate (hastes)	03-10-68	Nova Zelandia
IB 752G	<u>Verticillium dahliae</u> Kleb.	Amendoim	13-12-67	Campinas SP
IB 827G	<u>Phomopsis vexans</u> (Sacc. & Syd.) Harter	Berinjela	16-05-68	Bebedouro SP
IB 869G	<u>Colletotrichum</u> <u>gloeosporioides</u> Penz	Berinjela (frutos)	25-11-69	Campinas SP
IB 916G	<u>Colletotrichum</u> <u>gloeosporioides</u>	Berinjela (frutos)	19-10-70	M. das Cruzes SP
IB 932G	<u>Phomopsis vexans</u> (Sacc. & Syd.) Harter	Berinjela	-- -- --	CBS Baarn Holanda
IB 949G	<u>Fusarium</u> sp	Citros (frutos)	16-09-70	Sta. Fé do Sul SP

3.4.3. Manutenção de culturas

Para preservação das diversas culturas, durante o período de desenvolvimento dos trabalhos, foram usados os seguintes processos:

3.4.3.1. Em tubos de cultura

As culturas foram mantidas em tubos contendo meio inclinado de B.A.D. e guardadas inicialmente a tempera-

tura ambiente de laboratório e posteriormente, em câmaras com temperatura controlada para $\pm 10^{\circ}\text{C}$. As repicagens eram realizadas a cada 3 ou 4 meses, mantendo-se 12 tubos para cada cultura.

3.4.3.2. Em água destilada

Todas as cepas utilizadas no experimento foram também preservadas em água destilada e solução fisiológica salina, conforme processo descrito por FIGUEIREDO (1967). Para cada cepa foram empregados quatro frascos de 6ml sendo dois com água destilada e dois com solução fisiológica salina.

3.4.4. Preparo e conservação dos anti-soros (AS)

Na tentativa de estudar a possibilidade do emprego de métodos sorológicos na identificação de A.phaseolorum e especificação de fungos do gênero Ascochyta, foram imunizados 4 coelhos sendo 2 com o isolamento IB 731 G de Ascochyta phaseolorum e outros 2 com o isolamento IB 526 G de Ceratocystis paradoxa (Dade) C. Moreau. Este último fungo foi utilizado como padrão de controle para testar a especificidade antigênica, da qual depende a eficiência do método. Antes da primeira injeção foi feita uma sangria e os soros normais guardados em congelador para serem empregados como controle das reações sorológicas.

Os antígenos imunizantes de A.phaseolorum foram obtidos a partir de suspensões de conídios preparadas como descrito em 3.1.5. As suspensões foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 10 minutos, tempo suficiente para decantar todos os esporos. Para isso, foi empregada uma centrífuga de mesa marca Tominaga, modelo T.O. - 65. Após a centrifugação,

a água foi eliminada e os esporos decantados foram resuspen-
sos em 5ml de uma solução fisiológica salina (0,85% de NaCl).

Essa operação, repetida a cada injeção dos coe-
lhos, forneceu suspensões com concentrações aproximadas de
 10^7 a 10^9 conídios/ml.

Para o preparo do inóculo de Ceratocystis
paradoxa, foram utilizadas culturas desenvolvidas em placas
de Petri contendo meio B.A.D. e mantidas a 27°C , que é uma
temperatura bastante adequada para crescimento e esporulação
do fungo. Após o crescimento e esporulação da cultura, o que
ocorre aproximadamente após 6 ou 7 dias da repicagem, às pla-
cas de Petri juntava-se certa quantidade de água estéril, pro-
cedendo-se a uma ligeira agitação e raspagem para facilitar
a liberação dos esporos. As suspensões assim preparadas eram
passadas por peneiras tipo Granutest, para eliminação de de-
tritos, micélio e corpos de frutificação. Obtida a suspensão,
procedeu-se da mesma forma como descrito para A. phaseolorum.
Essas operações forneceram suspensões com concentrações apro-
ximadas de 10^9 a 10^{10} esporos/ml.

Nas primeiras fases do trabalho, as inocula-
ções com tais suspensões foram realizadas a cada dois dias,
injetando-se coelhos com peso aproximado de 3kg, por via in-
tra-muscular (coxa) e aumentando-se gradativamente a dosagem
de 1 até 5ml. Posteriormente, o método foi aperfeiçoado e as
inoculações passaram a ser realizadas uma vez por semana, in-
jetando-se apenas 3ml das suspensões por animal, em duas do-
ses intra-musculares de 1,5ml em partes diferentes (coxa es-
querda e direita).

Durante o período que se seguiu às inoculações,
foram feitas sangrias periódicas, retirando-se, em cada uma

cerca de 5ml de sangue de cada coelho. Essas sangrias foram realizadas a guisa de triagem, e os anti-soros (AS) obtidos eram empregados em testes imunológicos preliminares para verificação da presença de anticorpos.

Quando os anticorpos foram considerados suficientes para reações sorológicas nítidas, foram feitas sangrias totais por punção cardíaca. Os anti-soros obtidos, acrescidos de 1 gota de Mertiolato 1:1.000, para evitar contaminações, foram acondicionados em ampolas de 5ml. Estas foram depois fechadas a fogo e guardadas em freezer.

Para maior simplicidade no texto, os anti-soros serão identificados pela sigla AS seguida do número da cultura correspondente ou seja AS 731 para o anti-soro de A.phaseolorum e AS 526 para o anti-soro de C.paradoxa.

3.4.5. Preparo de antígenos (AG) para as reações sorológicas

Vários processos foram empregados com a finalidade de se encontrar um método que fosse adequado no preparo dos antígenos para as reações sorológicas.

3.4.5.1. Massa de esporos intacta

As massas de esporos foram obtidas pela centrifugação de suspensões de esporos em solução fisiológica a 4.000 rpm e usadas nas reações sorológicas de dupla difusão em ágar.

3.4.5.2. Massa de esporos triturada

A massa de esporos obtida por centrifugação era ressuspensa em 0,2ml de água destilada estéril e, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, transferida para um pequeno

queno almofariz de porcelana, seguindo-se trituração vigorosa até a completa secagem do material. Depois, prosseguia-se a trituração do material, já seco, por 2 ou 3 minutos para depois ressuspender em 0,5ml de solução fisiológica. O tempo de operação pôde ser reduzido, pela evaporação mais rápida da água, mediante ligeiro aquecimento do almofariz ($\pm 40^{\circ}\text{C}$). A suspensão de esporos assim obtida era então pipetada para ampola de vidro, acrescida de 1 gota de Mertiolato a 1/1.000 e guardada em geladeira para posterior utilização nos testes sorológicos. Este método foi empregado para obtenção de antígenos de todos os fungos incluídos nos experimentos. As suspensões de esporos de fungos do gênero Ascochyta foram obtidas em meio de Azuki e as dos demais fungos em meio de B.A.D.

3.4.5.3. Massa de esporos triturada com o auxílio de abrasivos

Vários materiais foram utilizados a guisa de abrasivos na tentativa de melhorar o efeito da trituração mecânica tais como: limalha de ferro, (posteriormente separada da suspensão pelo emprego de um ímã), vidro moído, areia fina estéril, e carborundum.

3.4.5.4. Destruição dos esporos pelo ultra-som

O emprego de vibradores ultra-sônicos, para promover a destruição celular, tem sido aplicado muitas vezes no processamento de homogeneização, purificação de antígenos ou liberação de fatores antigênicos, para reações sorológicas, em estudos sobre bactérias (MORTON e col. 1955), diversos fungos de interesse médico (FRIEDMAN e col 1953; KADEN

1957) e também em sorologia de fungos de interesse fitopatológico (AMOS e BURREL 1966; MORTON e DUKES 1966; MERZ e col 1969; WIMALAJEEWA e DE VAY 1971).

Principalmente visando a liberação de fatores antigênicos, foi empregado um desintegrador ultra-sônico tipo MSE 100 Watt*. Suspensões de esporos, em solução fisiológica com concentrações aproximadas de 10^{10} esporos/ml, foram submetidas durante 15 minutos à vibrações com frequência de 22 Kc/s e amplitude variando de 1 a 8 micra de pico a pico.

Após o tratamento pelo ultra-som, a suspensão foi centrifugada separando-se o sobrenadante e a massa de esporos sedimentada. Ambas as frações foram depois empregadas como antígeno em reações sorológicas de dupla difusão em agar ou precipitação em tubos.

3.4.5.5. Extração de antígenos (AG solúvel)

A suspensão obtida de cada cultura era colocada em tubos pirex com graduação e centrifugadas durante 5 a 10 minutos a 4.000 rpm para a deposição total dos esporos. A seguir a parte sobrenadante era eliminada e os tubos eram reenchidos com a suspensão e novamente centrifugados, até que a camada de esporos sedimentados atingisse o nível de 0,2ml. A quantidade de esporos assim obtida era acrescida de 2ml de ácido acético a 0,03N e submetida a banho-maria fervente por um período de 45 minutos. Terminada esta operação a suspensão era novamente centrifugada a 4,000 rpm por um período de 10 minutos, separando-se o sobrenadante (extrato fúngico). A acidez do extrato era depois neutralizada com uma solução normal de hidróxido de sódio. A determinação do pH era feita

* Measuring and Scientific Equipment Ltd. 25-28 Buckingham Gate, London, SWL

com o auxílio de um papel indicador de pH Merk ou ainda pelo acrescimento, ao extrato, de uma gota de uma solução de vermelho de fenol. Em seguida, para evitar possíveis contaminações, adicionava-se ao extrato uma gota de solução de Mertiolato 1/1.000.

Os extratos obtidos eram depois acondicionados em ampolas de vidro e conservados em congelador, para serem oportunamente utilizadas nos testes sorológicos. Por este processo, foram preparados extratos de todos os fungos constantes das relações contidas no item 3.4.2.

A técnica de extração, utilizada para obtenção de antígeno solúvel, foi uma adaptação da técnica de SHUMAN, descrita por CASTRO (1969) em estudos sorológicos sobre a bactéria Erysipelothrix rhusiopathiae (Wigula) Buchanan.

Esta técnica é comumente empregada quando os componentes antigênicos são polissacáridos. No desenvolvimento do trabalho os antígenos serão identificados pela sigla AG seguida do número da cultura.

3.4.6. Testes sorológicos

Para observação das reações sorológicas foram empregados os métodos de aglutinação, precipitação em tubos e dupla difusão em ágar.

3.4.5.1. Testes de aglutinação em lâminas

Este teste foi empregado com o propósito de se obter dados preliminares sobre reações antígeno-anticorpo para as diversas culturas estudadas. Para isso, duas gotas de suspensões em solução fisiológica ricas em esporos eram colocadas, separadamente, sobre uma lâmina para microscopia.

Em seguida, a uma delas era juntada uma gota do anti-soro e à outra uma gota de soro normal. O exame era realizado 5 a 10 minutos após, sob o microscópio, para observação da aglutinação.

3.4.6.2. Testes de aglutinação em tubos

Inicialmente, estes testes foram feitos empregando-se tubos de ensaio de 6cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro e como antígeno, foram usadas suspensões concentradas de esporos de A.phaseolorum em solução fisiológica salina. Posteriormente as suspensões foram previamente submetidas a centrifugação de 4,000 rpm por 1 a 2 minutos. Uma vez que A.phaseolorum apresenta conídios com dimensões muito variáveis, os testes de aglutinação em tubo são prejudicados pela precipitação espontânea. Esta centrifugação teve por finalidade selecionar os conídios de menores dimensões e consequentemente a obtenção de uma suspensão mais estável.

3.4.6.3. Testes de precipitação em tubos (teste do anel)

Para estes testes, foram usados tubos de ensaio medindo 4cm de comprimento e 3mm de diâmetro interno. O anti-soro era colocado por meio de uma pipeta Pasteur até a metade do tubo e sobre este era cuidadosamente pipetado o antígeno solúvel, de modo a não haver mistura entre o AS e o AG. A leitura era realizada após 15 minutos, pela observação do anel de precipitação no menisco de separação entre o AG e o AS (in BALL, 1961). Por este processo todos os extratos fúngicos (AG) obtidos das culturas constantes do item 3.4.2. foram comparados com o AS 731.

3.4.6.4. Testes de dupla difusão em ágar

Os testes de dupla difusão em ágar, idealizados por OUCHTERLONY (1949, 1958, 1962) e BALL (1961), foram utilizados para os estudos comparativos entre as diversas cepas empregadas no presente trabalho. A técnica empregada foi descrita por OLIVEIRA (1967) variando-se apenas a quantidade de ágar fosfato (ágar a 1% em tampão fosfato 0,01M pH 7,00) contendo 0,85% de NaCl (TFS) que, ao invés de 3ml, foram empregados 5ml por lâmina. Para os diversos testes realizados os esquemas da distribuição dos orifícios sobre o ágar foi previamente determinado, de acordo com a finalidade do ensaio.

Os AG empregados nestes testes foram obtidos pela trituração dos conídios, conforme descrito em 3.4.5.2.e, principalmente, pelo processo de extração descrito em 3.4.5.5. (AG solúvel). Quando se tratavam de culturas de Ascochyta, antes de se submeter as suspensões à centrifugação para obtenção dos AG solúveis, uma parte desta era reservada para testes complementares de patogenicidade.

3.4.6.5. Testes complementares de patogenicidade

Com a finalidade de comparar os resultados obtidos com as diversas culturas de Ascochyta, nos testes de dupla difusão em ágar e demais estudos sorológicos foram realizados ensaios para verificar a patogenicidade das mesmas para berinjela e feijão. Assim, conforme referido no item anterior, foram empregadas suspensões provenientes de todas as cepas, sendo as inoculações realizadas com parte da suspensão que serviu, posteriormente, para o processo de extração.

Nestes ensaios a variedade de berinjela escolhida foi a Pitangueiras e para feijão, feijão vagem da variedade Campineira. O método empregado foi o mesmo descrito em 3.2.4.2.1. , inoculando-se folhas separadas. As leituras foram realizadas 4 dias após a inoculação e, de acordo com o aspecto geral apresentado pelas folhas, os isolamentos foram classificados como: não patogênico (-); patogênico (+) e altamente patogênico (++) .

3.4.7. Estudos sobre as reações antígeno-anticorpo, Titulações

Para estes ensaios, foram empregados o AS e o AG obtidos da cultura IB 731 G.

3.4.7.1. Determinação do "Título" precipitante

Consistiu em verificar até a que diluição o AG ainda foi capaz de provocar a formação de precipitado , quando adicionado a uma quantidade constante de soro-imune (AS), conforme citado por BIER (1965). Para estes testes, foi empregado o AG solúvel que era sucessivamente diluído em solução fisiológica e cuidadosamente pipetado sobre o soro-imune contido em tubos idênticos aos utilizados em 3.4.6.3. As leituras foram realizadas após 15 minutos e 1 hora, para verificação da formação de anel. Depois, o AG era misturado ao AS e os tubos colocados em refrigerador. A leitura final era realizada 24 horas depois, pela observação de precipitado no fundo dos tubos.

3.4.7.2. Determinação do título de anticorpos no AS (Ótimo β)

Segundo BIER (1965), este método foi idealizado por RAMON, em 1922, para ser usado na aferição de toxinas e antitoxinas. Consiste no inverso do teste do "título" precipitante ou seja, o AG é mantido constante e o AS diluído aritmeticamente em solução fisiológica. A diluição em que a precipitação ocorre mais rapidamente é considerada o ótimo β (ANONIMO 1957, BIER 1965). Para este teste, também foram empregados tubos idênticos aos do ensaio anterior.

3.4.7.3. Determinação da concentração mínima do AS e do AG para os testes de dupla difusão em ágar

Baseado no trabalho de WRIGHT e STACE— SMITH (1966), para determinação da concentração mínima do AS e do AG que permitisse leitura em testes de dupla difusão em ágar, o AS foi mantido fixo e o AG diluído aritmeticamente em solução fisiológica salina, procedendo-se depois de maneira inversa. Os testes foram feitos adotando-se um esquema de orifícios previamente determinado e a técnica descrita em 3.4.6.4. A distância entre as margens dos orifícios que continham os reagentes foi de 3mm.

3.4.8. Estudos preliminares sobre a natureza química do AG

3.4.8.1. Verificação da presença de polissacáridos

Para reforço da hipótese de que o antígeno extraído (AG solúvel) pudesse ser um polissacárido, o mesmo foi submetido ao teste de Anthrona (in BELL 1955) e ao teste de Molisch (in TASTALDI 1960).

O teste de Anthrona consiste na reação de 1ml da solução de carbohidrato com 2ml do reativo de Anthrona, o qual é preparado, misturando-se 950ml de ácido sulfúrico concentrado a 50ml de água destilada e nessa mistura dissolvendo-se 2g de Anthrona. A reação positiva é dada pelo aparecimento de uma coloração verde azulada, dentro de um período de 10 minutos.

O teste de Molisch é realizado juntando a 0,5ml da solução a ser analisada, 5 gotas de Naftol a 5% em etanol e acrescentando-se lentamente, 2ml de ácido sulfúrico (P.A.) pela parede do tubo de ensaio. A reação positiva é dada pelo aparecimento de um anel de coloração violeta na interfase dos dois líquidos, após 5 a 10 minutos.

O teste de Molisch foi também aplicado para outros antígenos que reagiram positivamente com AS 731, bem como a todos aqueles provenientes de culturas de Ascochyta, cujas reações foram negativas.

Ambas as reações foram repetidas após os antígenos terem sido submetidos à diálise por um período de 24 horas a 5°C.

3.4.8.2. Ensaio comparativo entre o AG triturado e o extraído

Estes estudos foram feitos empregando-se o método sorológico de dupla difusão em ágar, e os testes bioquímicos - reação de Ninhidrina em papel e teste colorimétrico de Biureto (in TASTALDI 1960). Os testes bioquímicos foram realizados antes e após os antígenos terem sido submetidos ao processo de diálise.

Nestes ensaios visando verificar se depois de terem sido submetidos ao processo de extração, os conídios ainda mantinham antigenicidade, foram incluídas nos testes de dupla difusão em ágar, massas de esporos previamente tratadas e que depois foram trituradas em almofariz.

3.4.8.3. Reação do AS contra o AG obtido a partir do micélio

Para isso 1g de micélio, obtido por filtração em papel, de cultura (IB 731 G) em meio líquido (Czapeck) foi lavado e submetido a processo de extração com ácido acético e o antígeno resultante empregado em testes de dupla difusão em ágar.

4. RESULTADOS

4.1. Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de A.phaseolorum

4.1.1. Método para esporulação do fungo

Entre os diversos tipos de feijão usados como meio de cultura, para obtenção de esporos, os melhores resultados foram obtidos com o feijão Azuki (P.angularis Kaw.) no qual a esporulação foi muito mais intensa. Além do fator intensidade de esporulação, seu emprego foi sempre vantajoso em relação aos demais tipos, devido ao fato dos grãos serem mais consistentes não se desfazendo após o processo de autoclavagem. Isso faz com que as suspensões de esporos obtidas a partir de tais culturas sejam mais límpidas, contendo menor quantidade de amido ou outros resíduos dos grãos. Nos outros tipos de feijão empregados, sendo a casca facilmente destruída pelo processo de autoclavagem, houve a liberação de grande quantidade de amido, fragmentos da casca e outras impurezas, tornando a suspensão pouco adequada, principalmente quando esta se destinava à injeção de coelhos para obtenção de anti-soros.

Verificou-se, também, uma variação bastante grande no grau de esporulação das diversas cepas utilizadas nos ensaios. Enquanto algumas eram altamente esporulantes, outras o faziam sofrivelmente, havendo necessidade de se aumentar a quantidade de frascos de cultura para se conseguir a quantidade de esporos necessária para as experiências.

4.1.2. Crescimento do fungo a diversas temperaturas

Os resultados do ensaio de crescimento encontram-se resumidos no gráfico 1, onde se verifica que o fungo se desenvolve melhor a temperaturas ao redor de 24°C. Este resultado está de acordo com aqueles obtidos por CROSSAN(1958), que trabalhando com cepas de A.phaseolorum de várias procedências e isoladas de diversos hospedeiros, sempre encontrou o ótimo ao redor de 24°C.

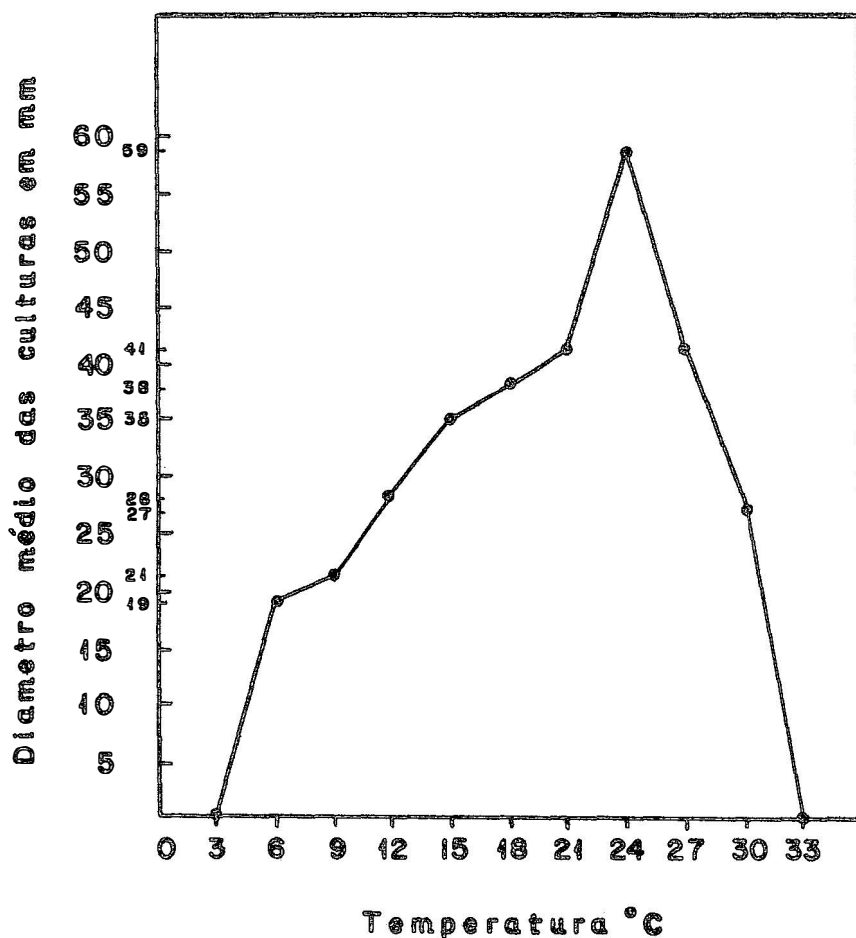


GRÁFICO 1 - Crescimento de A.phaseolorum (I.B. 731G) a diversas temperaturas.

A 3°C e 33°C não foi observado qualquer crescimento durante o período que durou a experiência. Porém, a 3°C não houve perda de viabilidade do fungo, pois este se desenvolveu normalmente quando, após a leitura final, as placas foram transferidas para uma temperatura adequada (24°C). O mesmo não foi observado a 33°C quando, após se ter procedido da mesma forma, o fungo mostrou perda total da viabilidade.

Foi ainda possível observar que o aspecto da cultura variou com a temperatura. À temperaturas mais baixas ($9 - 12^{\circ}\text{C}$), o micélio apresenta coloração branca e conforme esta se eleva (15°C), torna-se branco-rosada passando depois a levemente cinza parda, com grande halo branco (21°C). À 24°C , a coloração cinza parda se intensifica tornando-se bem mais escura que a 21°C e ainda apresentando halo branco. A 30°C a cultura torna-se cinza escura, quase preta, com apenas um pequeno bordo branco (figura 1).

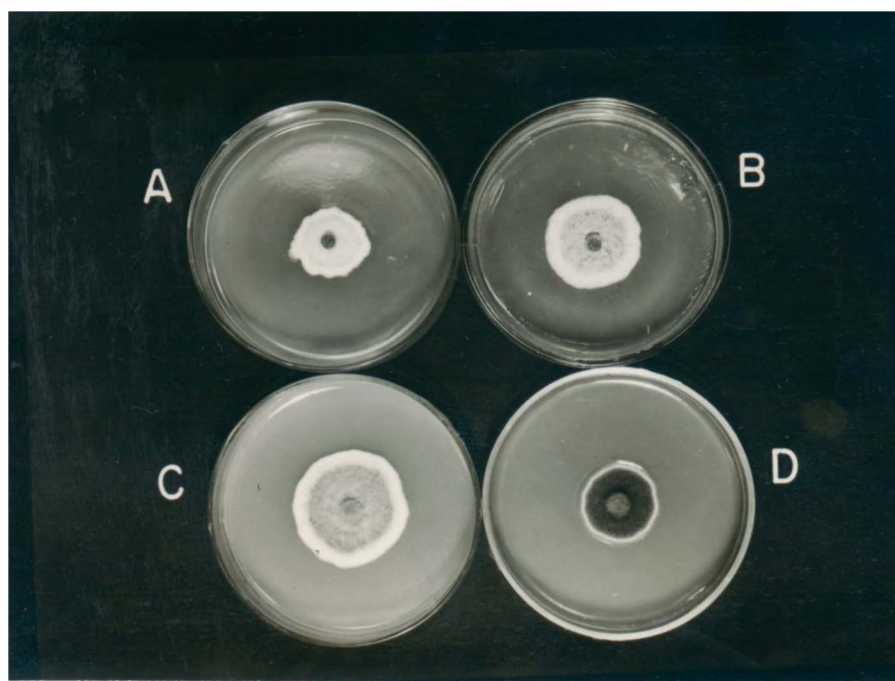


Fig. 1 - Efeito da temperatura sobre o aspecto cultural de *A. phaseolorum*. A - 15°C ; B - 21°C ; C - 24°C e D - 30°C .

4.1.3. Determinação da temperatura ideal para esporulação

Os resultados obtidos nos ensaios para esporulação são apresentados na tabela II, onde se observa que o melhor índice de esporulação ocorreu à temperaturas ao redor de 21°C e 24°C.

TABELA II - Esporulação do fungo A.phaseolorum a diversas temperaturas após 12 dias de incubação

TEMPERATURA °C	CONCENTRAÇÃO DA SUSPENSÃO nº de esporos/ml
9	-----
12	1,6 x 10 ⁶
15	4,0 x 10 ⁶
18	7,1 x 10 ⁶
21	2,0 x 10 ⁷
24	1,8 x 10 ⁷
27	5,8 x 10 ⁶
30	9,3 x 10 ⁴
33	-----

Após os 12 dias de crescimento das culturas, a esporulação foi nula à temperatura de 9°C, havendo apenas crescimento vegetativo. A 30°C a esporulação foi reduzida.

Estes fatos são ilustrados na figura 2, onde pode-se observar, nítidamente, no tubo mantido a 21°C, a for

mação dos picnídios junto às paredes do frasco. A figura mostra também o reduzido desenvolvimento do fungo às temperaturas superiores a 27°C

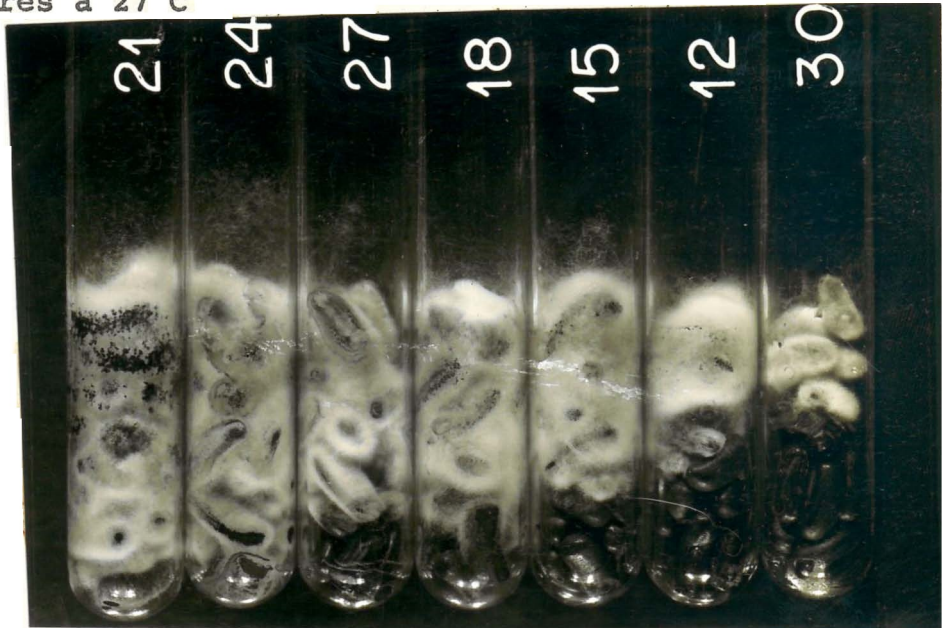


Fig.2 - Esporulação de A.phaseolorum a diversas temperaturas após 12 dias de incubação. Observe-se intensa frutificação junto às paredes do tubo mantido a 21°C.

4.1.4. Determinação da temperatura ideal para germinação dos conídios

Os resultados obtidos, após 6 horas de incubação dos esporos, são apresentados na tabela III onde se verifica que a germinação apenas ocorreu a temperaturas superiores a 6°C e inferiores a 36°C. Embora no ensaio de crescimento a diversas temperaturas (item 4.1.2.) A.phaseolorum tenha apresentado perda de viabilidade a 33°C; neste ensaio foi observada uma germinação de 5%. A germinação máxima se verificou a temperaturas ao redor de 21°C.

Na leitura realizada após 12 horas, o panorama permaneceu praticamente o mesmo, verificando-se, entretanto, o início da germinação dos conídios à temperatura de 6°C

(1,67%). A 33°C não houve qualquer aumento percentual na germinação e tão pouco foi notado crescimento dos tubos germinativos, observados na leitura de 6 horas. A 36°C os conídios não germinaram.

TABELA III - Germinação de conídios de *A. phaseolorum* a diversas temperaturas, após 6 horas de incubação

Temperatura °C	Porcentagem de esporos germinados nas diversas repetições			Porcentagem média de germinação
	I	II	III	
3	---	---	---	---
6	---	---	---	---
9	8,0	3,0	6,0	5,6
12	19,5	12,0	17,5	16,3
15	31,0	35,0	33,5	33,1
18	51,0	51,5	51,0	51,1
21	83,0	84,0	78,0	81,6
24	70,0	72,5	72,5	71,6
27	70,0	70,0	67,0	69,0
30	50,0	50,0	59,0	53,0
33	5,0	6,0	4,0	5,0
36	---	---	---	---

4.1.5. Determinação da idade ideal aproximada da cultura para seu emprego em testes de patogenicidade

Os resultados obtidos encontram-se resumidos nos gráficos 2 e 3. Pela observação do gráfico 2, verifica-se que o máximo de esporulação foi obtido em culturas com idade ao redor de 14 a 19 dias e que houve uma redução no número de esporos liberados em culturas mais velhas (25-27 dias de idade). Essa diminuição do número de esporos liberados, pode ser atribuída à germinação dos conídios, dentro dos frascos após o fenômeno de maturação dos picnídios e extrusão.

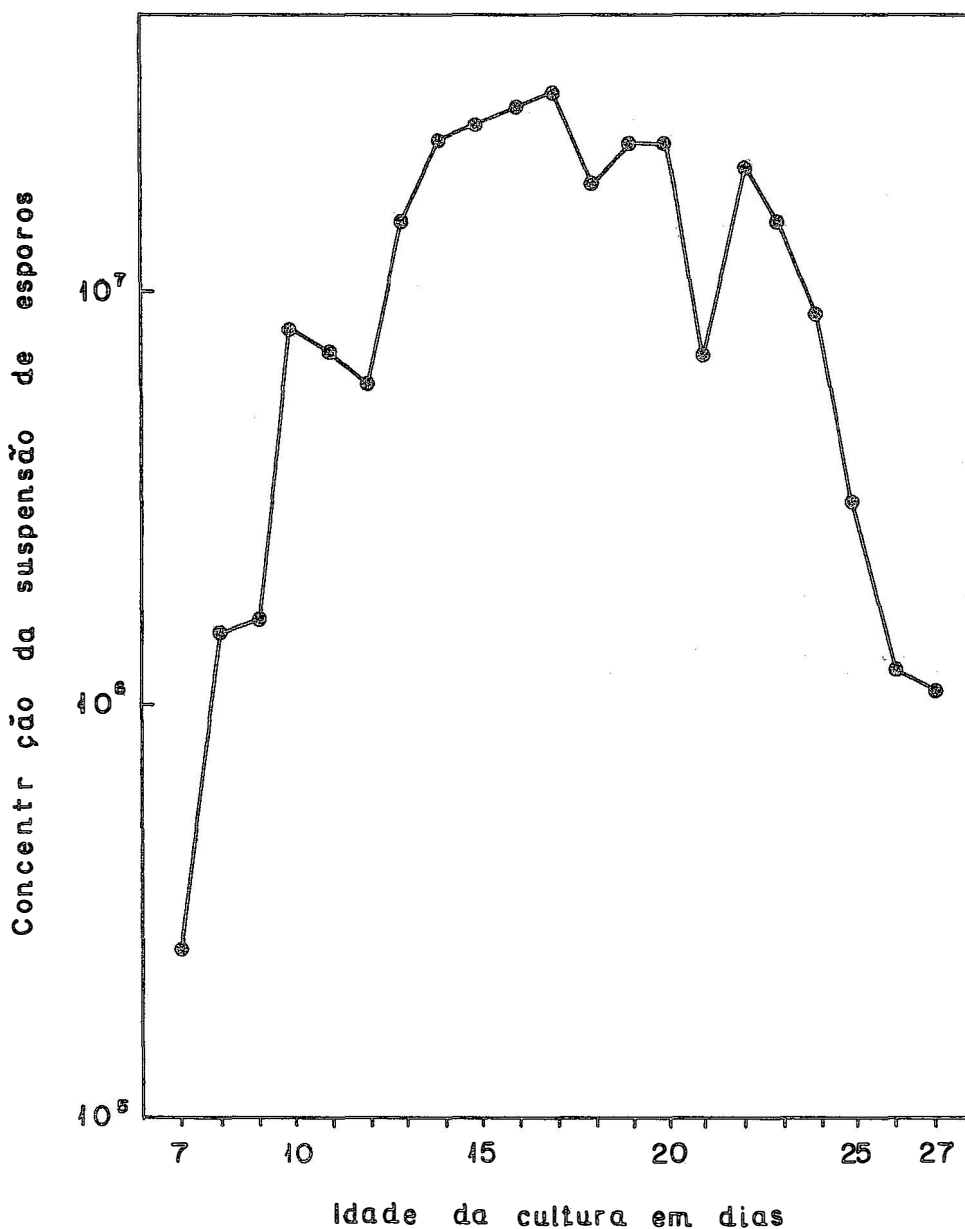
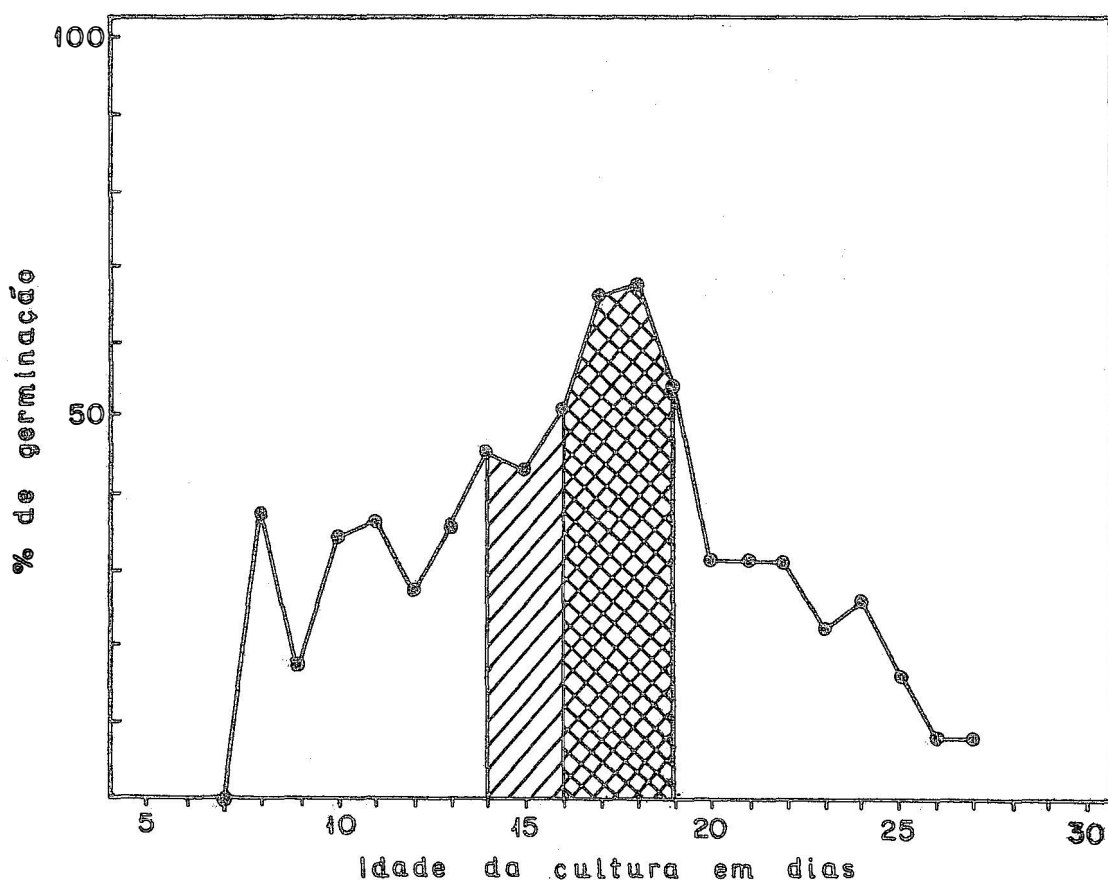


GRÁFICO 2 - Esporulação de A. phaseolorum. Concentração das suspensões obtidas a partir de culturas com diferentes idades.

No gráfico 3, verifica-se que os esporos provenientes de culturas muito jovens (7 dias) não germinaram. O máximo poder germinativo dos conídios foi obtido em culturas com idade de 16 a 19 dias. Uma rápida redução do poder germinativo ocorreu nos conídios provenientes de culturas com idade superior a 20 ou 21 dias.

Transpondo-se para o gráfico 3 os dados obtidos para esporulação (gráfico 2), tem-se a área compreendida entre a idade de 14 a 19 dias, como a área de melhor esporulação (achuria simples e cruzada) e que coincide com a área de melhor germinação no intervalo entre 16 e 19 dias de idade (achuria cruzada).



Faixa ideal da concentração de inóculo em relação à idade



Faixa ideal quanto à idade do inóculo para emprego de mesmo em testes de inoculação

GRÁFICO 3 – Germinação de conídios de A. phaseolorum provenientes de culturas com idades diferentes. Na achúria simples e cruzada, área de melhor esporulação obtida (transposta) do gráfico 2. Na achúria cruzada área (idade) escolhida para emprego dos conídios nos ensaios de patogenicidade

A partir da obtenção destes dados, foram somente utilizadas culturas com idades compreendidas entre 16 e 19 dias, para a realização de ensaios de patogenicidade.

4.1.6. Efeito da alternância de temperaturas

Os resultados encontram-se no gráfico 4.

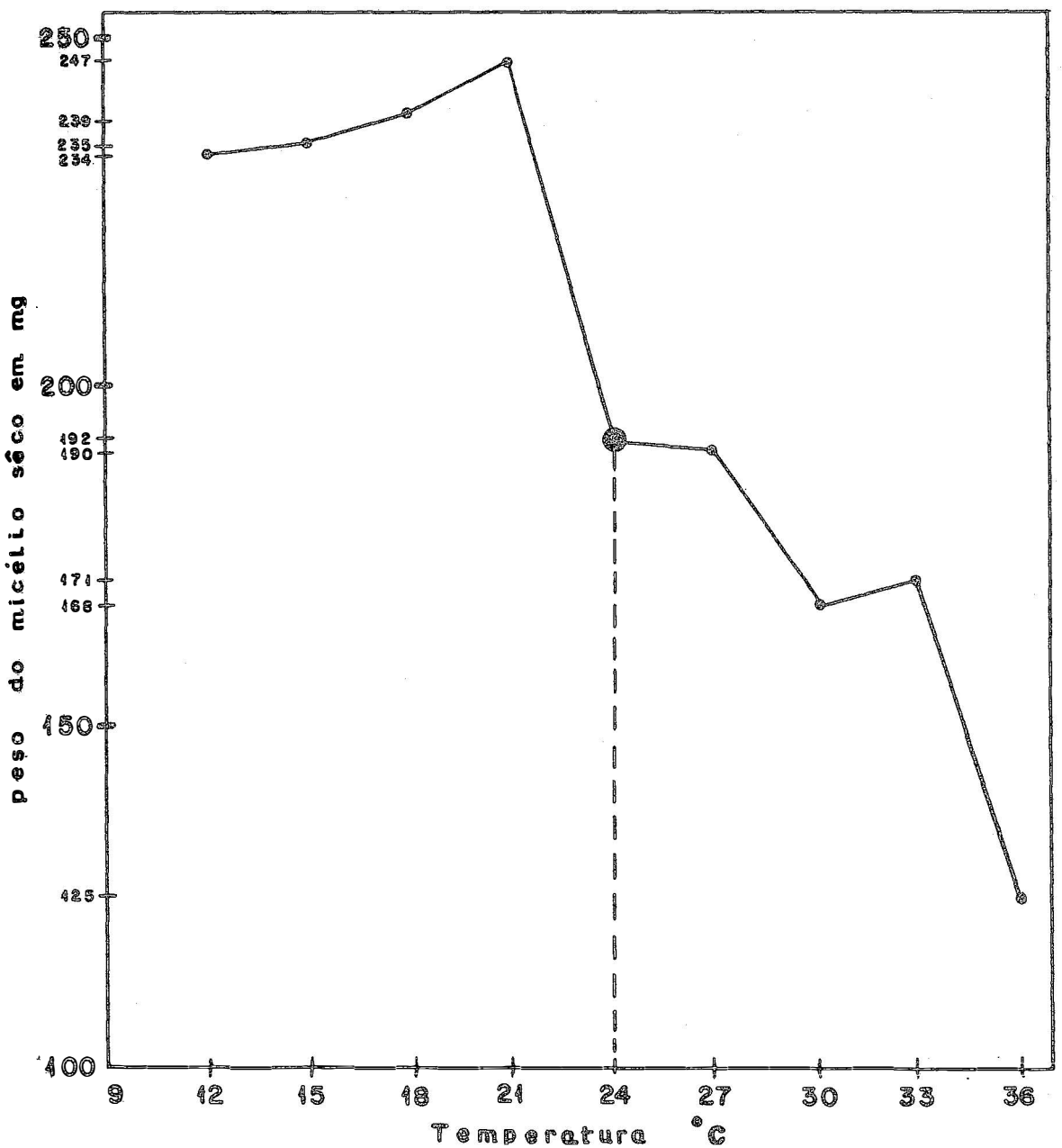


GRÁFICO 4 — Efeito de alternância de temperaturas sobre A. phaseolorum. Temperatura base — 24°C. (culturas mantidas a temperatura constante).

Pela observação do gráfico 4 verifica-se que, em relação ao crescimento observado nos frascos controle mantidos a 24°C (temperatura mais favorável ao desenvolvimento do fungo quando mantido a temperatura constante conforme se verifica no gráfico 1), aqueles que foram submetidos a temperaturas mais baixas, tiveram seu crescimento estimulado. O máximo de crescimento, foi observado nos frascos submetidos a alternância entre 24 e 21°C. Resultado oposto foi conseguido quando o fungo foi submetido a temperaturas mais altas. Houve uma pronunciada inibição do crescimento, como se pode observar nos resultados obtidos para os frascos submetidos a 36°C.

4.2. Estudo comparativo entre os sintomas induzidos em berinjela por A.phaseolorum e por P.vexans

4.2.1. Exames de material herborizado

O reexame dos materiais herborizados, da Seção de Micologia Fitopatológica, confirmou a hipótese de que a semelhança entre os sintomas causados em berinjela por A.phaseolorum e por P.vexans pode levar a confusões, pois os materiais 4825, 6651 e 9135 foram reclassificados como sendo A.phaseolorum ao invés de P.vexans. No estudo do material 4825, proveniente de Itariri e constituído de frutos apresentando lesões, foram encontrados em associação com A.phaseolorum diversos peritécios identificados como pertencentes ao gênero Didymella, (figuras 3 e 4).

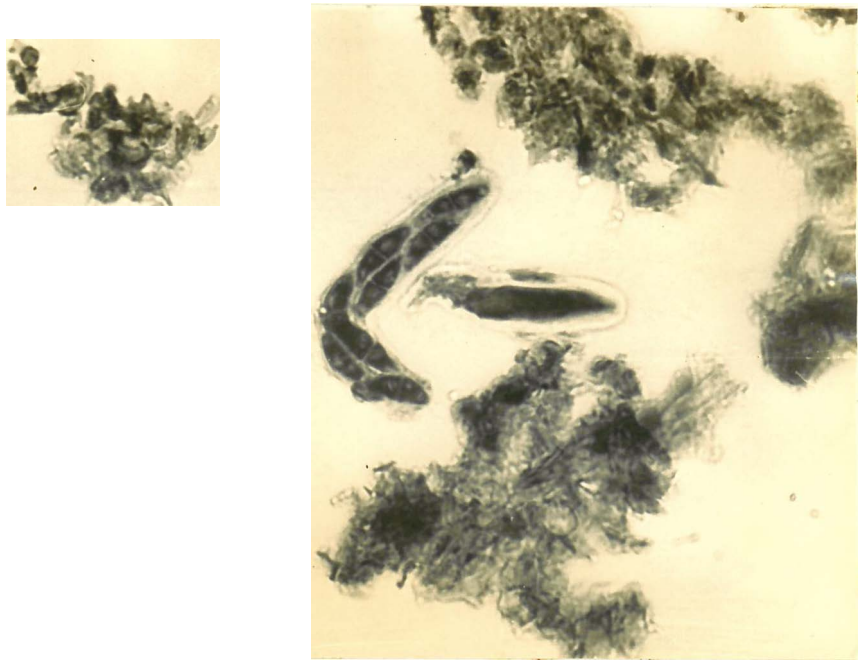


Fig. 3 - Ascospores e ascosporos de Didymella sp ,
frutificações encontradas em associação com
A.phaseolorum. (material nº 4.825) x 700



Fig. 4 - Ascospores e ascosporos de Didymella sp .
As setas indicam a presença de parafises.
(material nº 4.825) x 700

4.2.2. Inoculações experimentais

4.2.2.1. Ensaio de laboratório

4.2.2.1.1. Inoculações de folhas - Sob as condições em que foi realizada a experiência, três dias após a inoculação, os sintomas iniciais já eram evidentes nas folhas inoculadas com A.phaseolorum enquanto que, naquelas inoculadas com P.vexans, o desenvolvimento dos sintomas foi mais lento, pois se tornaram perceptíveis aos 4 dias e nítidos 5 dias após a inoculação.

As manchas causadas por A.phaseolorum tenderam a ser circulares, aquosas e com coloração clara enquanto que as causadas por P.vexans, também aquosas, apresentaram coloração escura, quase preta e limitadas pelas nervuras, tenderam a ser angulosas (figura 5).

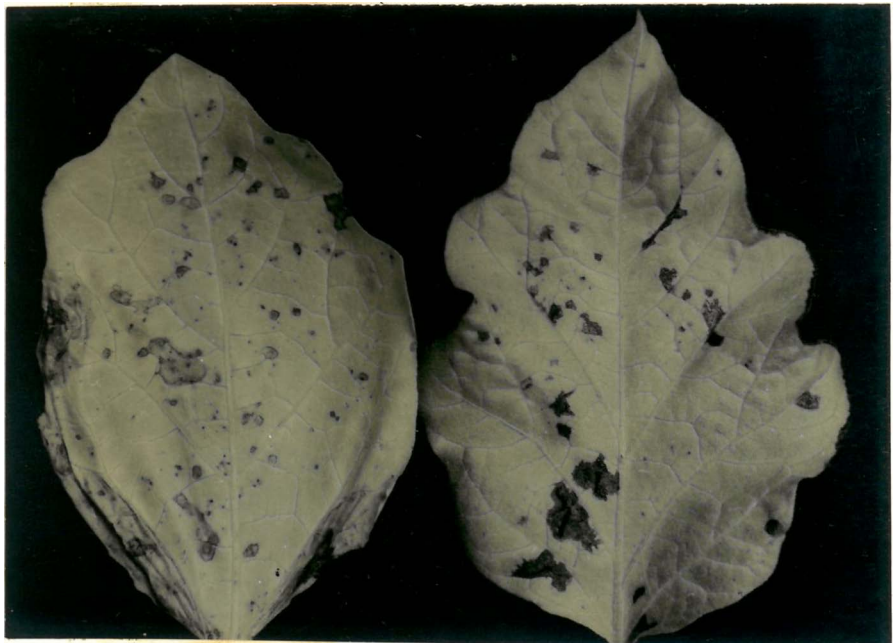


Fig. 5 - Folhas de berinjela inoculadas "in vitro" com A.phaseolorum (à esquerda) e P.vexans (à direita). Aspecto das lesões após 6 dias da inoculação.

Depois de 9 dias, em ambos os casos, houve coalescência das manchas e o aparecimento de uma podridão que se generalizou, havendo destruição total dos tecidos. As folhas testemunhas, após o mesmo período de tempo, apresentaram-se apenas amareladas porém ainda mantendo a turgidez .

Não foram percebidas quaisquer interferências provenientes de diferenças varietais em relação ao tipo de sintoma causado pelos fungos, ou seja, as diferentes variedades reagiram da mesma forma a A.phaseolorum e a P.vexans. De uma maneira geral, para ambos os patógenos, os sintomas observados nestes testes não reproduziram exatamente os sintomas comumente observados em condições de campo.

4.2.2.1.2. Inoculações de frutos - Quatro dias após a inoculação, já eram nítidos os sintomas produzidos por ambos os fungos, nos frutos que foram inoculados pelo processo de injeção de suspensões de esporos. Desde o início, os sintomas induzidos por A.phaseolorum e por P.vexans foram bastante semelhantes; principiando por uma ligeira depressão de aspecto aquoso e, posteriormente, evoluindo para uma grande área apodrecida e deprimida. A podridão causada por A.phaseolorum é bastante escura, quase preta, enquanto que a de P.vexans, embora escura, é mais clara; tomando às vezes, a coloração marrom-parda (figura 6).

Em ambos os casos, o aparecimento de frutificações iniciou junto ao ponto de inoculação, com os picnídios se distribuindo em disposição mais ou menos concêntrica. As frutificações apareceram primeiro nos frutos inoculados com A.phaseolorum ou seja, 6 a 7 dias após a inoculação ao passo que, somente após 10 dias foram notados os primeiros picnídios de P.vexans.



Fig. 6 - Frutos de berinjela inoculados "in vitro" com P.vexans (à esquerda) e A.phaseolorum (à direita). Observe-se a semelhança entre as lesões.

Nos frutos inoculados pelo processo de perfuração e introdução de frutificações, o desenvolvimento dos sintomas foi mais lento, porém, dando como resultado final podridões idênticas as obtidas com o processo de injeção.

4.2.2.2. Ensaio em casa de vegetação

4.2.2.2.1. Inoculações por aspersão - Quatro dias após a inoculação, aparecem os primeiros sintomas nas plantas inoculadas com A.phaseolorum, manifestando-se nas folhas, como pequenas lesões aquosas, que posteriormente evoluem dando origem a manchas de contorno arredondado, apresentando círculos concêntricos e um ponto mais claro no centro, de modo a assemelharem-se muito com as manchas de folhas causadas por fungos do gênero Alternaria (figura 7). É comum a coalescência

de diversas manchas, principalmente junto ao bordo das folhas, provocando o secamento de grandes áreas do limbo, as quais tomam, neste caso, forma irregular (figura 8. Nas hastes a doença se manifesta inicialmente por pequenas lesões de coloração escura, alongada no sentido do comprimento das fibras e deprimidas na sua parte central. Essas lesões, posteriormente evoluem circundando as hastes provocando secamento de toda a parte situada acima da região atacada. Em diversas plantas, houve o aparecimento de uma queima de ponteiros, seguida da queda das folhas mais novas.



Fig. 7 - Folhas de berinjela com lesões provenientes de inoculações em estufa. com A. phaseolorum



Fig. 8 - Folhas de berinjela mostrando cresta mento dos bordos, provenientes de plantas ino culadas com A.phaseolorum por aspersão e em condições de estufa.

Nas plantas inoculadas com P.vexans, os sinto mas somente foram perceptíveis 8 dias após a inoculação prin cipiando quer nas folhas como nas hastes, por pequeninas le- sões de coloração escura. Nas folhas, tais lesões apareceram principalmente junto às nervuras, evoluindo depois, para man chas de aspecto irregular ou anguloso que têm a tendência de se estenderem acompanhando as nervuras (figuras 9 e 10). Nas hastes, as lesões apareceram principalmente junto aos pecío- los, dando origem a podridões que se estendiam pelos mesmos, provocando o murchamento e secamento das folhas. Posterior- mente, a lesão se estende no sentido do comprimento das has- tes não existindo, neste caso, a tendência de envolvê-las co mo sucede em A.phaseolorum.



Figs. 9 e 10 - Folhas de berinjela mostrando manchas resultantes de inoculações com P.vexans (inoculações por aspersão e em condições de estufa).

Em nenhum dos casos foram observadas diferenças no tipo de sintomas causados por A.phaseolorum ou P.vexans que pudessem ser atribuídos a reação varietal.

As manchas de folhas obtidas nestes ensaios , ao contrário das obtidas nos ensaios "in vitro", foram características das doenças, sendo idênticas àquelas normalmente observadas em condições de campo.

4.2.2.2.2. Inoculações por injeção - Nas inoculações por injeção, o desenvolvimento de sintomas foi lento, sendo visíveis após 8 dias nas plantas inoculadas com Ascochyta e somente depois de 15 dias nas plantas inoculadas com Phomopsis. As lesões não diferenciaram muito das obtidas nas hastes através da inoculação por aspersão. Assim, as lesões de Ascochyta se estenderam lateralmente envolvendo a haste (figura 11), enquanto que as de Phomopsis tenderam a alongar-se no sentido do comprimento da mesma. As lesões de Ascochyta são profundas e de coloração escura, enquanto que as de Phomopsis, tendem a ser mais superficiais e claras provocando principalmente secamento da casca e tecidos adjacentes (figura 12).

Enquanto as frutificações de Ascochyta são dificilmente perceptíveis a olho nu, devido a coloração mais escura da lesão as de Phomopsis são visíveis, como pode ser observado na figura 12.

As plantas controle, inoculadas com água estéril, apresentaram rápida cicatrização sem mostrar quaisquer alterações dignas de nota. Nas inoculações de frutos, as lesões desenvolvidas não diferiram daquelas obtidas anteriormente nos ensaios de laboratório e descritas no item 4.2.2.1.2.



Fig. 11 - Planta de berinjela inoculada com A.phaseolorum pelo processo de injeção, mostrando secamento dos ponteiros.



Fig. 12 - Planta de berinjela inoculada com P.vexans pelo processo de injeção. Observe-se lesão alongada sobre a qual percebem-se as frutificações do fungo.

4.3. Alguns aspectos da sintomatologia induzida por *A.phaseolorum* em outras plantas de importância econômica e determinação de novos hospedeiros

O resultado dos estudos da sintomatologia de *A.phaseolorum* em diferentes hospedeiros foram os seguintes :

Algodão - Das observações de campo foi verificado que o fungo ocorre principalmente nas folhas, sendo muito raras e pouco pronunciadas lesões em outras partes das plantas. O tamanho das manchas pode variar chegando a 2 ou 3cm de diâmetro. Principiando por um pequeno ponto de coloração carmim apresentam, posteriormente, contorno arredondado ou irregular e coloração parda sendo, normalmente, circundadas por um halo de cor carmim ou pardo escuro. Em estágio mais avançado do estabelecimento da infecção, estas manchas secam na sua parte central e, pelo dilaceramento dos tecidos, originam-se perfurações de aspecto irregular, que por vezes lembram as rasgaduras causadas por ácaros (figura 13). Normalmente, *A.phaseolorum* não chega a constituir problema sério para a cultura do algodoeiro.



Fig. 13 - Folhas de algodoeiro com lesões de *A.phaseolorum* - infecção natural.

Feijão e feijão vagem - Das observações de campo e inoculações em estufa foi verificado que nestas culturas, a doença pode se manifestar com extrema gravidade, e é particularmente importante para culturas de feijão vagem desenvolvidas nos períodos de inverno. No Estado de São Paulo severos ataques foram verificados nos anos de 1970 e 1971 nos municípios de Mogi das Cruzes, Embu, Embura e Itapeceirica da Serra, onde a cultura da vagem é intensamente desenvolvida no período de inverno. As lesões causadas por A. phaseolorum ocorrem em toda a parte aérea das plantas. Nas folhas, de acordo com as condições de tempo predominantes, os sintomas podem ser bastante variados. Assim, o patógeno pode, em períodos de umidade intensa, dar origem a podridões de coloração escura e contornos pouco definidos, cujos tecidos dilaceram na sua parte central (figura 14). Nestas condições, as lesões podem ser confundidas com as de outros agentes fitopatogênicos, tais como as de Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magn.) Scrib. causador da antracnose. A esta semelhança, fez referência SCHIEBER (1964) em trabalho realizado na Guatemala sobre as principais doenças do feijão, atribuindo a isso, o fato de Ascochyta ter passado despercebida, por muitos anos, naquele país. Em condições de menor umidade as manchas das folhas têm contornos bem definidos. São circulares ou brandamente irregulares, castanho claras, apresentando círculos concêntricos. Neste caso, existe plena concordância com o que foi descrito por CHUPP e SHERF (1970), diferindo entretanto, das manchas da antracnose mesmo quando há dilaceração de tecidos (figura 15). Este fato pôde ser comprovado em inoculações experimentais, em casa de vegetação, prolongando ou reduzindo o período de exposição das plantas ino

ladas às condições de câmara úmida. Por este processo obteve-se um ou outro tipo de lesão. Nas vagens, as lesões são circulares e deprimidas, muito semelhantes às de antracnose, com as quais podem ser facilmente confundidas (figura 16). Nas hastes, as lesões tendem ao envolvimento causando o murchar e seca das regiões situadas acima da parte atacada.

Semelhante a estes são os sintomas causados por A. phaseolorum em outras leguminosas, tais como : fava de Belém (P. lunatus L.), soja (Glicine max L.), dólícos (Dolichus sp).



Fig. 14 - Folíolos e pecíolos de feijão vagem mostrando sintomas causados por A. phaseolorum - infecção natural em condições de alta umidade.



Fig. 15 - Folíolo de feijão vagem apresentando sintomas causados por A. phaseolorum - infecção natural, em condições de baixa umidade.



Fig. 16 - Vagens com lesões: acima ascoquitose e abaixo antracnose - infecção natural.

Pimentão - Observações de campo e inoculações experimentais em estufa demonstraram que as lesões aparecem nas folhas, ramos e frutos. As manchas das folhas apresentam contorno circular com um halo mais escuro, frequentemente nos bordos, provocando crestamento (figura 17). Nos frutos, onde o fungo esporula profusamente, sua incidência é mais rara, provocando podridões que, via de regra, estão condicionadas à existência prévia de ferimentos. Normalmente não tem se constituído em problema sério para a cultura. Sintomas semelhantes aos descritos para pimentão podem ocorrer em plantas de jiló (Solanum gilo Raddi).



Fig. 17 - Ramos e folhas de pimentão com sintomas de ascoquitose - infecção natural.

Quiabo - De acordo com as observações de campo realizadas, o fungo pode atacar toda a parte aérea da planta afetando flores, hastes, pecíolos, folhas e brotos terminais. A cultura é bastante sensível a este agente. Segundo NAGAI (1961), que se referiu ao patógeno como A.abelmoschi, o mesmo tem sido responsabilizado por graves prejuízos em culturas de quiabeiro, na baixada fluminense (RJ). Na Carolina do Norte, USA, segundo ELLIS (1962) A.phaseolorum pode causar queima de ponteiros e desfolhamento da ordem de 50 a 90% nas plantas reduzindo a colheita a nada e, segundo o mesmo autor, ataca severamente as variedades: Clemson, Spineless, Louisiana, Green-Velvet e Perkin's Spineless.

Nas folhas, as lesões apresentam as margens arredondadas ou irregulares, com halo de coloração púrpura ou negra, e como em outras plantas podem dar origem a perfurações. A queima das flores e das hastes novas, bem como o aparecimento nestas últimas de lesões escuras e deprimidas, são os sintomas mais frequentes. Frutos atacados mostram podridões escuras e côncavas que, na maioria das vezes, se localizam junto ao pedúnculo. Nestas lesões pode ser observada profusa esporulação do patógeno (figura 18).

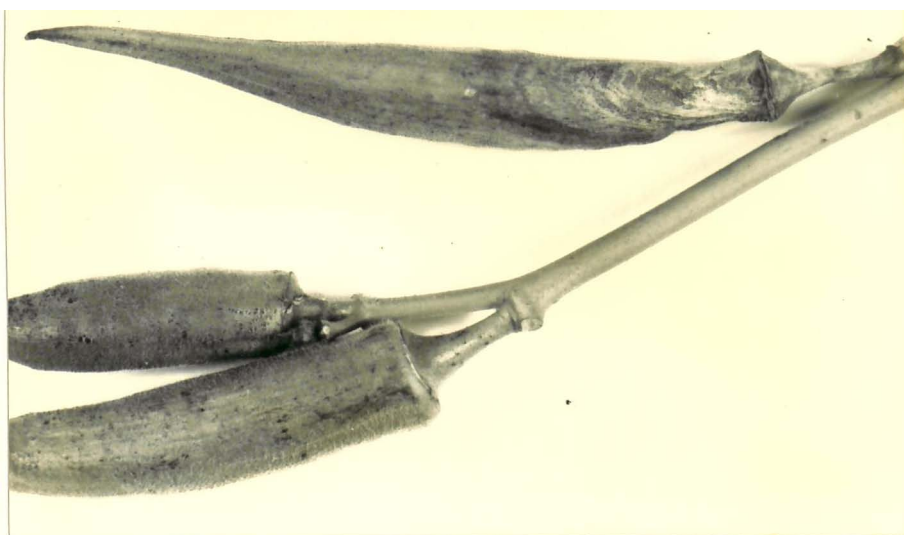


Fig. 18-Frutos de quiabeiro com lesão causada por A.phaseolorum apresentando intensa frutificação do patógeno -infecção natural.

Tomateiro - Nas folhas aparecem manchas que, apresentando coloração castanho clara e círculos concêntricos, são muito semelhantes as causadas por Alternaria solani (Ell. & G.Martin) Sor. (figura 19). Nos frutos aparecem podridões deprimidas e circulares as quais geralmente, se iniciam por ferimentos mecânicos (figura 20). Apenas em condições excepcionalmente favoráveis ao patógeno, essa doença costuma produzir prejuízos à cultura.



Fig. 19 - Folíolo de tomateiro apresentando manchas de A.phaseolorum - infecção natural.

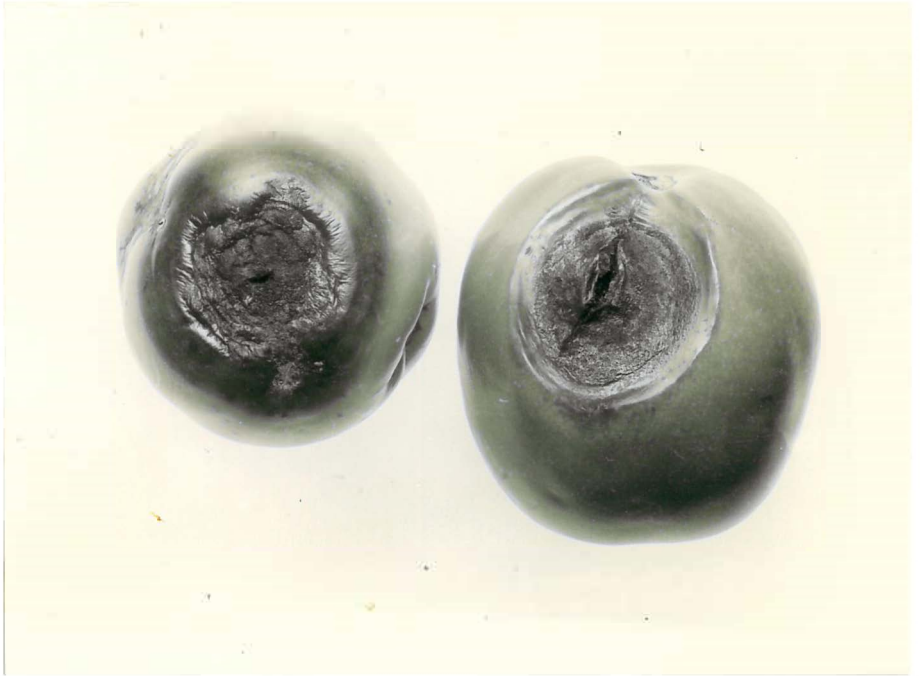


Fig. 20 - Frutos de tomateiro com podridão ocasionada por A.phaseolorum - infecção natural

Plantas nativas - Os resultados dos estudos sobre a patogenicidade de A.phaseolorum para plantas nativas encontram-se resumidos na tabela IV. O fungo foi reisolado de todas as plantas suscetíveis. Algumas lesões, características de A.phaseolorum em diversas plantas, são ilustradas nas figuras 21 e 22.



Fig. 21 - Lesões produzidas por A.phaseolorum em diversas plantas nativas; obtidas por inoculações artificiais. Da esquerda para a direita - Folhas de "estramonio", "estramonio", "malva", "picão branco" e "guaxuma".



Fig. 22 - Lesões causadas por A. phaseolorum em plantas nativas - Inoculações artificiais - Da esquerda para a direita e de cima para baixo "estramonio", "serralha", "campainha", "caruru" , "joá de capote", "erva moura" e "joá bravo".

TABELA IV - Resultados das inoculações de plantas nativas com
Ascochyta phaseolorum

NOME CIENTÍFICO	NOMES VULGARES	Resultados
<u>Ageratum conyzoides</u>	catinga de bode	+
<u>Amarantus hybridus</u>	caruru, caruru bravo, caruru de folha larga	-
<u>Amarantus viridis</u>	caruru, caruru manso, caruru de folha estreita	+
<u>Asclepias curassavica</u>	oficial de sala, paina de sapo, falsa erva de rato	++
<u>Bidens pilosa</u>	picão preto, picão	-
<u>Brassica sp.</u>	nabo selvagem, nabo bravo	+
<u>Chenopodium ambrosioides</u>	erva do Sta. Maria, erva do bicho	++
<u>Chenopodium sp.</u>	quenopodio	+
<u>Cynara scolymus</u>	alcachofra	++
<u>Datura stramonium</u>	estramonio, figueira do inferno	++
<u>Euphorbia prunifolia</u>	amendoim bravo	-
<u>Galinsoga parviflora</u>	picão branco, fazendeiro	++
<u>Ipomea batatas</u>	batata doce	+
<u>Ipomea cairica</u>	campainha	+
<u>Ipomea longicuspis</u>	campainha	++
<u>Lantana camara</u>	camará miúdo, erva de grilo	+
<u>Leonotis sp.</u>	-----	-
<u>Leonurus sibiricus</u>	mato ximango, erva do Santos Filho, rubi	-
<u>Malva parviflora</u>	malva	++
<u>Nicandra physaloides</u>	joã de capote, quintilho	++
<u>Physalis sp.</u>	joã de capote	++
<u>Plantago media</u>	língua de vaca	+
<u>Polygonum sp.</u>	erva de bicho	-
<u>Richardsonia brasiliensis</u>	poalha, poalha branca	-
<u>Rumex obtusifolius</u>	azedada graúda, azedinha do brejo	-
<u>Siegesbeckia sp.</u>	-----	++
<u>Sida rhombifolia</u>	vassoura, guaxuma, guaxumba, mata pasto	+
<u>Sida sp.</u>	vassoura, guaxuma, guaxumba, matapasto	+
<u>Solanum aculeatissimum</u>	joã	++
<u>Solanum americanum</u>	erva moura, maria preta, maria pretinha	++
<u>Solanum ciliatum</u>	joã, joã bravo, mata cavalo	++
<u>Solanum viarum</u>	joã bravo, joã amarelo	++
<u>Sonchus oleraceus</u>	serralha	++
<u>Taraxacum officinale</u>	dente de leão, almeirão bravo	+

4.4. Emprego da sorologia como método auxiliar para a identificação de A. phaseolorum e especificação de fungos do gênero Ascochyta

4.4.1. Isolamento das cepas

Todos os processos, empregados para o isolamento das cepas e referidos nos itens 3.4.1.1.; 3.4.1.2.; 3.4.1.3. e 3.4.1.4., foram bastante adequados para o isolamento das diversas culturas de Ascochyta. Todavia, uns ou outros, foram aplicados de acordo com a natureza do material disponível para o isolamento. A maior parte destes foi realizada empregando-se o isolamento direto uma vez que na maioria dos casos os materiais coletados, quer fossem folhas, hastes ou frutos, apresentavam frutificações do fungo patógeno.

4.4.2. Manutenção das culturas

4.4.2.1. Em tubos de cultura

O método de manutenção de culturas em tubos contendo meio de ágar foi trabalhoso. Mesmo quando a coleção foi mantida a temperaturas mais baixas (10°C), e não obstante o número elevado de tubos mantidos para cada cultura, houve necessidade de constante vigilância, para que não houvesse perda de cepas importantes para o trabalho em desenvolvimento. Em muitas culturas foram observadas modificações no aspecto cultural que, via de regra, estavam associadas a redução ou perda total da capacidade de esporulação.

4.4.2.2. Em água destilada

Por este método, as culturas puderam ser preservadas sem necessidade de repicagens. Não foram observadas

quaisquer modificações em nenhuma das cepas preservadas pelo processo e também não foram notadas diferenças entre a preservação em água destilada e solução fisiológica. Quando houve falha na coleção preservada pelo processo de repicagens constantes, quer pela perda de viabilidade, quer por modificações morfológicas e fisiológicas que ocorreram em certas cepas, estas foram recuperadas lançando-se mão das culturas preservadas em água ou solução fisiológica.

4.4.3. Preparo e conservação dos anti-soros

Para os coelhos inoculados com A.phaseolorum os primeiros resultados positivos, demonstrando a presença de anticorpos no soro sanguíneo, foram obtidos após 8 inoculações, pelo aparecimento de uma tênue linha de precipitação nos testes de dupla difusão em ágar. Para C.paradoxa, somente após 18 inoculações é que foram notadas reações positivas.

Esses resultados iniciais foram conseguidos somente depois de diversas experiências infrutíferas em que se procurou adaptar os antígenos para os diversos tipos de testes sorológicos. Essas experiências serão relatadas a seguir no item 4.4.4.

Com o prosseguimento das inoculações as reações foram se tornando mais nítidas até se mostrarem perfeitamente visíveis.

Com referência a preservação dos anti-soros foi observado que os mesmos se mantiveram inalterados quando conservados a temperatura de -20°C .

4.4.4. Preparo de antígenos (AG) para as reações sorológicas

4.4.4.1. Massa de esporos intacta

Massas de esporos intactas não se prestaram para os testes de dupla difusão em ágar. Os resultados, sempre negativos, demonstraram que não houve difusão dos componentes antigênicos quando os esporos foram mantidos intactos.

4.4.4.2. Massa de esporos triturada

Esse processo teve por finalidade a liberação dos fatores antigênicos e consequente obtenção de reações nos testes de dupla difusão em ágar. Foi conseguido pleno sucesso com a aplicação do processo, permitindo o aparecimento de nítidas linhas de precipitação.

4.4.4.3. Massa de esporos triturada com auxílio de abrasivos

Nenhum dos abrasivos empregados serviram para melhorar os resultados obtidos pela trituração simples, ao contrário, os abrasivos serviram apenas para impurificar o AG interferindo e reduzindo a intensidade das reações sorológicas nos testes de dupla difusão em ágar.

4.4.4.4. Destruição dos esporos pelo ultra-som

O emprego do vibrador ultra-sônico não foi adequado para o preparo de antígenos. Tanto o sobrenadante como a parte precipitada, quando empregados nos testes de dupla difusão em ágar, deram reações pouco claras e muito inferiores àquelas obtidas pela trituração simples. Quando aplicada a testes de aglutinação em tubos, após a mistura do sobrenadante com o sedimentado e ressuspenção em solução fisiológica, houve

precipitação espontânea. Quando se empregou apenas o sobrenadante para testes de precipitação, as reações foram demasiadamente fracas não permitindo leituras nítidas. Examinada ao microscópio, após o tratamento com ultra-som, a suspensão de esporos apresentava um número muito pequeno de conídios destruídos, demonstrando que o processo foi pouco eficiente.

4.4.4.5. Extração de antígenos

O processo de extração com ácido acético permitiu a obtenção de antígenos sorologicamente ativos e preparados de maneira padronizada, quanto ao ponto de vista qualitativo e quantitativo, uma vez que se empregou sempre a mesma quantidade de esporos e de solução ácida e o mesmo tempo de aquecimento. Com o AG obtido pelo processo de extração, foram conseguidos excelentes resultados. As reações sorológicas foram perfeitamente nítidas, tanto nos testes de dupla difusão em ágar, como nos de precipitação em tubos (teste do anel). Somente após a obtenção desse tipo de AG, foi possível a aplicação de métodos que permitissem submeter os antígenos e anti-soros a processos de titulação, como também se proceder a estudos preliminares sobre a natureza química do AG.

4.4.5. Testes sorológicos

4.4.5.1. Testes de aglutinação em lâminas

Foi verificado que este tipo de teste pode ser empregado para obtenção de dados preliminares sobre as reações sorológicas. Quando a suspensão de esporos da cepa IB731G foi submetida a ação do AS ocorreu o fenômeno de aglutinação, enquanto que o mesmo não sucedeu com a suspensão de esporos

submetida ao soro normal (figuras 23 e 24). Quando se empregou como AG suspensões de esporos de outros fungos (vide 3.4.2.2.), não foram observadas reações de aglutinação, demonstrando a boa especificidade do AS. Este método foi usado apenas preliminarmente, adotando-se posteriormente métodos mais adequados.

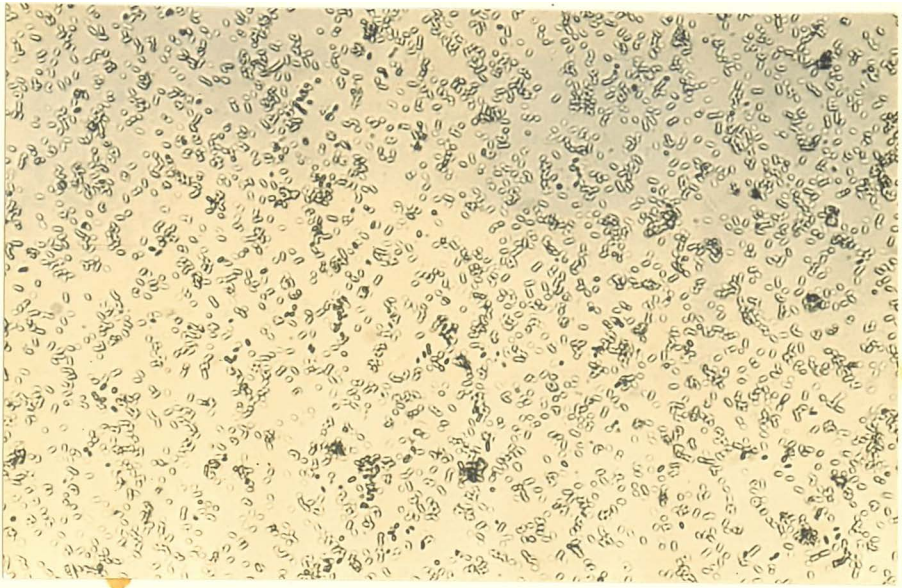


Fig. 23 - Teste de aglutinação em lâmina: Suspensão de esporos de A. phaseolorum submetida a ação do soro normal. x140

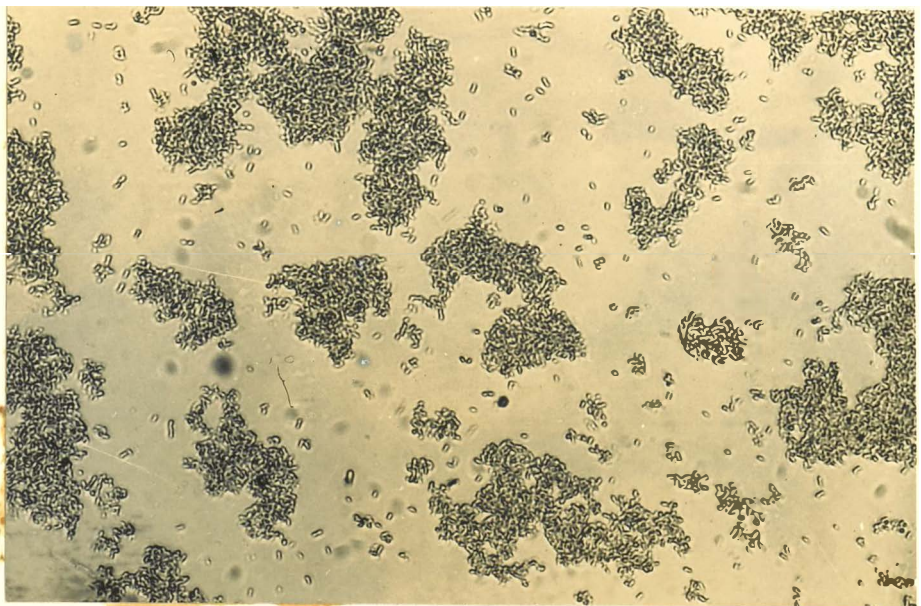


Fig. 24 - Teste de aglutinação em lâmina: Suspensão de esporos de A. phaseolorum em presença de seu AS. Observe-se a ocorrência do fenômeno de aglutinação. x 140.

4.4.5.2. Testes de aglutinação em tubos

Um dos pré-requisitos indispensáveis para o emprego de testes de precipitação é a obtenção de uma suspensão de antígeno estável e homogênea. Este é um problema antigo em sorologia de fungos, conforme citado por CITRON em 1905 (in MATSUMOTO 1929). Entretanto, malgrado os esforços realizados, submetendo-se previamente a suspensão de conídios a uma centrifugação a 4.000 rpm, visando selecionar conídios de menores dimensões que formassem uma suspensão mais estável os resultados não foram satisfatórios. Embora por esse processo tenha sido possível obter uma suspensão com melhores características de estabilidade, esta não era suficiente para impedir a precipitação espontânea após algum tempo de repouso e, consequentemente, o mascaramento dos resultados .

4.4.5.3. Testes de precipitação em tubos

Pelo emprego do AG solúvel os resultados foram bastante nítidos permitindo em casos de reação positiva, leitura rápida após 15 a 20 minutos para as primeiras diluições, quando havia o aparecimento do anel de precipitação no menisco de separação entre o AG e o AS.

Por este processo, as reações sorológicas, foram plenamente coincidentes com as obtidas nos testes de dupla difusão em ágar. O método foi empregado com sucesso nas experiências sobre titulação.

4.4.5.4. Testes de dupla difusão em ágar

Os AS obtidos para A.phaseolorum e C.paradoxa foram altamente específicos, não se observando reações cruzadas quando o AG de um foi testado contra o AS do outro (Lâmina 1).



Lâmina 1 - Teste sorológico de dupla difusão em ágar, em que os AG foram obtidos pela trituração de esporos, mostrando a especificidade das reações. 1=AS 731; A=AG 731; 2=AS 526; B=AG 526.

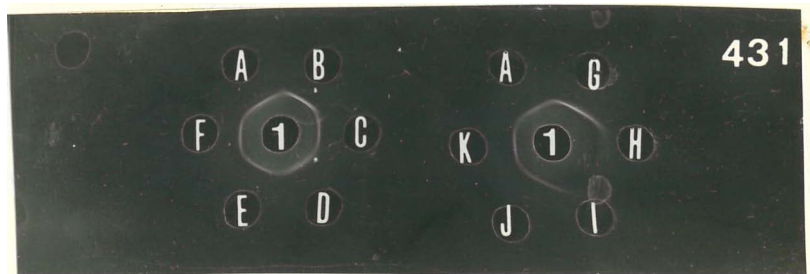
O AG preparado pelo processo de extração com solução ácida mostrou-se também específico e, por apresentar vantagens sobre o AG obtido por trituração, passou a ser empregado em todos os testes subsequentes (Lâmina 2).



Lâmina 2 - Teste de dupla difusão em ágar em que são comparados o AG obtido por trituração e o AG obtido pelo processo de extração. 1=AS 731; M=AG 731 obtido por trituração; E=AG 731 extraído. Observe-se que não houve alteração na especificidade da reação.

Não foram notadas quaisquer relações sorológicas entre o AS 731 e os antígenos extraídos de fungos não pertencentes ao gênero Ascochyta (vide 3.4.2.2.).

Com relação as culturas de Ascochyta, o AS 731 reagiu positivamente com os antígenos de Ascochyta procedentes de: berinjela (AG 788); couve-flor (AG 791); berinjela (AG 795); repolho (AG 798); tomate (AG 799); quiabo (AG 804); couve-flor (AG 834); berinjela (AG 853); vagem (AG 865); repolho (AG 866); alcachofra (AG 894); berinjela (AG 909); tomate (AG 931); tomate (AG 946); algodão (AG 947) e negativamente com os antígenos obtidos a partir de culturas isoladas de café (AG 723); café (AG 757); pimentão (AG 863); xuxu (AG 867); tomate (AG 873); pepino (AG 866) e mamão (AG 893). As reações acima são ilustradas nas lâminas 3, 4 e 5 sendo que esta última, além de antígenos de Ascochyta foram incluídos os AG 827 e AG 932 de P.vexans.



Lâmina 3 - Dupla difusão em ágar - Teste comparativo - Reação entre o AS 731 e os AG extraídos de diversas culturas de Ascochyta.
 1=AS 731; A=AG 731; B=AG 788 (berinjela);
 C=AG 795 (berinjela); D=AG 853 (berinjela);
 E=AG 909 (berinjela); F=AG 799 (tomate);
 G=AG 804 (quiabo); H=AG 863 (pimentão);
 I=AG 873 (tomate); J=AG 931 (tomate);
 K=AG 946 (tomate).



Lâmina 4 - Dupla difusão em ágar, reação entre o AS 731 e os AG extraídos de diversas culturas de Ascochyta. 1=AS 731; A=AG 731; L=AG 947 (algodão); M=AG 865 (vagem); N=AG 791 (couve-flor); O=AG 798 (repolho); P=AG 834 (couve-flor); Q=AG 866 (repolho); R=AG 894 (alcachofra); S=AG 867 (xuxu); T=AG 893 (mamão); U=AG 886 (pepino).



Lâmina 5 - Dupla difusão em ágar, reação entre o AS 731 e os AG extraídos das culturas de Ascochyta e P.vexans. 1=AS 731; A=AG 731; V=AG 827 (P.vexans); X=AG 723 (café); Y=AG 932 (P.vexans); Z=AG 757 (café).

Os resultados dos testes de dupla difusão em ágar foram plenamente coincidentes com os do teste do anel e confirmados por testes de absorção.

4.4.5.5. Testes complementares de patogenicidade

Estes resultados encontram-se resumidos na tabela V onde, para permitir uma melhor visualização dos estudos, foram também incluídos os dados obtidos nos ensaios sorológicos.

TABELA V - Resultados dos ensaios de patogenicidade para isolamento de Ascochyta obtidos de diferentes hospedeiros e suas relações com o anti-soro 731

NÚMERO CULTURA	HOSPEDEIRO	RESULTADO SOROLÓGICO com AS 731 empregando-se o AG sô nível.	PATOGENICIDADE	
			Berinjela	Feijao
IB 723G	Café	-	-	-
IB 731G*	Berinjela	+	++	+
IB 757G	Café	-	-	-
IB 788G	Berinjela	+	++	+
IB 791G	Couve flor	+	++	+
IB 795G	Berinjela	+	xxx	xxx
IB 798G	Repolho	+	++	+
IB 799G	Tomate	+	+	xxx
IB 804G	Quiabo	+	++	++
IB 834G	Couve flor	+	+	-
IB 853G	Berinjela	+	++	+
IB 863G	Pimentão	-	xxx	xxx
IB 865G	Vagem	+	+	++
IB 866G	Repolho	+	++	+
IB 867G	Xuxu	-	-	-
IB 873G	Tomate	-	-	-
IB 886G	Pepino	-	-	-
IB 893G	Mamão	-	-	-
IB 894G	Alcachofra	+	++	++
IB 909G	Berinjela	+	+	+
IB 931G	Tomate	+	xxx	xxx
IB 946G	Tomate (fruto)	+	+	+
IB 947G	Algodão	+	+	+

(++) altamente patogênico

(-) não patogênico

(+) patogênico

(xxx) ensaio não realizado

(*) cultura padrão de A.phaseolorum

4.4.6. Estudos sobre as reações antígeno-anticorpo Titulações

4.4.6.1. Determinação do título precipitante

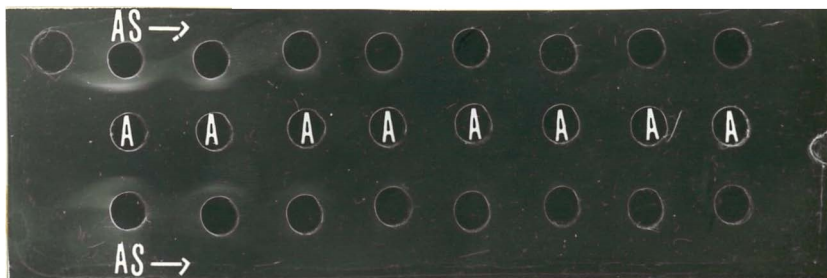
Em 15 minutos foram percebidas reações de anel até a diluição de 1:16 e após 1 hora até 1:64. Na leitura final, realizada depois de 24 horas, foram notados depósitos no fundo dos tubos até a diluição de 1:128, que foi o título precipitante máximo obtido.

4.4.6.2. Determinação do título de anticorpos no anti-soro (Ótimo β)

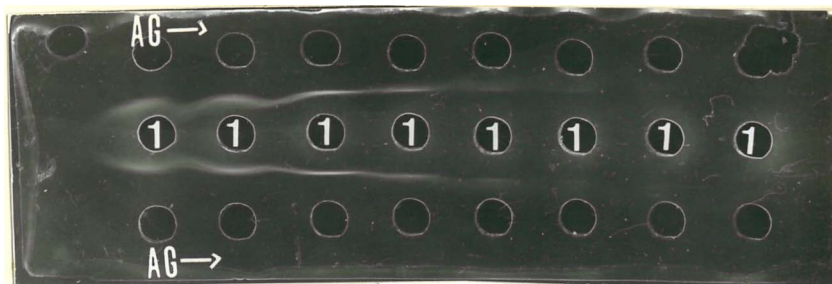
A reação AG-AS mais rápida ocorreu na diluição de 1:8 sendo este, portanto o ótimo β . Foram percebidas reações de anel, até a diluição de 1:16, depois de 15 minutos, e em 1 hora até a diluição de 1:32. O título final, depois de 24 horas, foi de 1:64.

4.4.6.3. Determinação da concentração mínima do AS e do AG para testes de dupla difusão em ágar

A diluição máxima, cuja reação sorológica foi perceptível em lâminas, atingiu a 1:8 quando se diluiu o AS e a 1:64 para diluições do AG (Lâminas 6 e 7).



Lâmina 6 - Teste de dupla difusão em ágar. A diluição máxima do AS foi 1:8. A última diluição é pouco visível na reprodução fotográfica.



Lâmina 7 - Teste de dupla difusão em ágar. A diluição máxima do AG foi 1:64. A última diluição é pouco visível na reprodução fotográfica.

4.4.7. Estudos preliminares sobre a natureza química do antígeno (AG)

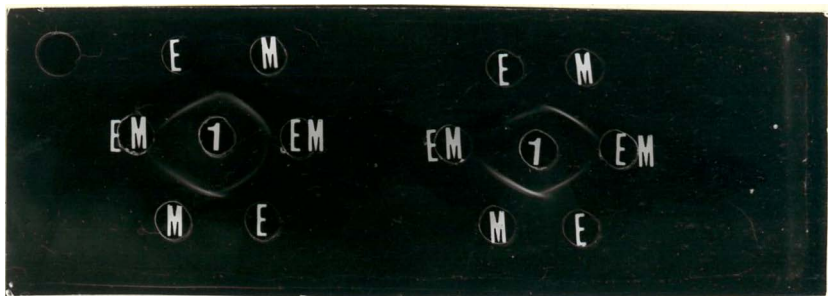
4.4.7.1. Verificação da presença de polissacáridos

O AG 731 reagiu positivamente, tanto ao teste de Anthrona, pelo aparecimento intenso da coloração característica verde azulada, como ao teste de Molisch, dando anel de coloração violeta. Todos os antígenos reagiram positivamente ao teste de Molisch, inclusive aqueles cuja reação foi negativa com o AS 731 (Vide tabela V). As reações ainda persistiram positivas após os extratos terem sido submetidos a diálise por um período de 24 horas.

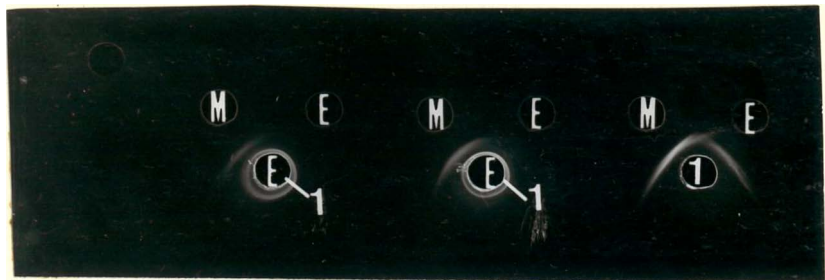
4.4.7.2. Ensaio comparativos entre o AG triturado e o extraído

Nos testes de dupla difusão em ágar, foi verificado no ponto de encontro das linhas de precipitação, a presença de um "esporão", indicando, de acordo com KORNGOLD (1956), uma diferença na composição antigênica dos AG triturado e extraído. Foi observado também, que o processo de extração elimina totalmente a capacidade antigênica dos conídios (Lâmina 8).

Em vista destes resultados, foi feito um novo teste, empregando-se o método de absorção. O esquema empregado é indicado na Lâmina 9 onde, conforme se verifica pelo aparecimento de uma linha de precipitação, o AG extraído não absorveu totalmente os anticorpos do AS, quando este foi testado contra o AG triturado. Isso sugere que o AG triturado possui componentes (ou componente) antigênicos, que por suas características termolábeis, foram totalmente destruídos pelo processo de extração.



Lâmina 8 - Comparação entre os AG extraído e triturado. E=AG extraído; M=AG triturado; EM=AG obtido de conídios extraídos e depois macerados. Observe-se a reação negativa de EM e o esporão formado entre M e E.



Lâmina 9 - Teste de absorção feito com o AG extraído. O AG foi colocado 4 horas antes do AS. No triângulo da direita a reação controle. 1=AS 731; M=AG triturado; E=AG extraído. Observe-se o esporão na reação controle e a reação positiva para o AG triturado.

Nos testes bioquímicos a reação de ninhidrina, em papel, aplicados tanto para o AG triturado como para o extraído foi verificada a presença de aminoácidos, evidenciados pelo aparecimento da coloração violeta característica. Diante deste resultado, foi aplicado o teste colorimétrico de Biureto (in TASTALDI 1960). O teste é específico para proteínas e consiste na mistura, em volumes iguais, da solução problema com uma solução de NaOH a 10%, juntando-se depois, gota a gota uma solução de CuSO_4 a 0,5%. A reação positiva é dada pelo aparecimento de coloração rósea. Nestes testes a reação foi nítida para o AG triturado e quase imperceptível para o AG extraído. Quando ambos os antígenos foram submetidos à diálise por 24 horas e os testes repetidos, nos testes de ninhidrina a reação foi intensa para o AG triturado e fraca para o AG extraído. Nos testes de Biureto os resultados foram iguais ao realizado anteriormente.

4.4.7.3. Reação do AS contra o AG obtido a partir do micélio

As reações com o AG obtido do micélio foram negativas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Alguns aspectos da fisiologia de A.phaseolorum

De acordo com os estudos realizados por CROSSAN (1958) os isolamentos de A.phaseolorum podem cair em dois grupos, conforme o seu desenvolvimento à diversas temperaturas. Aqueles que crescem igualmente a 20° e 24°C. Aplicando-se este critério a cepa IB 731 G estaria incluída no 2º grupo, ou seja, melhor crescimento a 24°C. (vide 4.1.2.)

Conforme resultado obtido no ensaio de crescimento à diversas temperaturas (gráfico 1) o fungo não se desenvolveu a 33°C. Neste caso, este resultado estaria em desacordo com os obtidos no ensaio sobre temperatura ideal para germinação dos conídios onde, conforme se observa na tabela III, foi anotada uma germinação ao redor de 5%. Todavia, neste último ensaio, na leitura realizada após 12 horas (vide 4.1.4.) não foi notado o crescimento dos tubos germinativos. Isso veio demonstrar que o crescimento foi paralizado devido à morte do patógeno, conforme pôde ser comprovado posteriormente, pela transferência das placas contendo as lâminas, para temperatura mais amena (24 C), sem que se obtivesse qualquer crescimento posterior. A germinação de 5% dos conídios teria, provavelmente, ocorrido durante o tempo necessário para o equilíbrio da temperatura das placas, ou seja, antes que o meio de cultura atingisse a temperatura de 33°C.

A melhor germinação dos conídios a 21°C está plenamente de acordo com os resultados obtidos por CROSSAN (1958) que considerou temperaturas entre 20° e 24°C como as mais adequadas para a germinação de conídios de A.phaseolorum.

A inclusão, de um número elevado de culturas de Ascochyta nos estudos sorológicos foi o motivo principal da realização do ensaio, que visou a fixação de uma idade ideal para a utilização das culturas em testes de patogenicidade. Assim, houve a necessidade da realização de inoculações parceladas e em épocas diferentes, cujos resultados deveriam ser comparáveis, uma vez que obtidos os resultados dos estudos sorológicos, a estes era relacionado a característica patogênica de cada cultura. Desde que a viabilidade dos esporos decresce com a idade (HAWKER 1950) evidentemente também a infectividade de um inóculo será proporcional a essa idade. A fixação de idades entre 16 a 19 dias, para o emprego das culturas nos testes de inoculação, permitiu uma boa padronização do método, uma vez que a temperatura (21°C), a idade das folhas, a concentração dos esporos (10⁶ esporos/ml) e o método de inoculação foram também pré-estabelecidos.

A. phaseolorum tem sido constantemente relatado como um fungo típico de épocas frias e úmidas, ou melhor, é nessas ocasiões que o mesmo se torna problema sério para várias culturas de importância econômica (DESLANDES 1945 ; ELLIS 1950; NAGAI 1961; TERANISHI e col. 1968; FIGUEIREDO e col. 1969; ALCORN 1969). Todavia, conforme foi verificado nos ensaios, o seu ótimo de crescimento se situa a temperaturas relativamente elevadas, ou seja, ao redor de 24°C. O motivo pelo qual o fungo é problemático nos período de inverno, tal vez possa ser, em parte, explicado pelos resultados obtidos

nos ensaios de alternância de temperaturas onde, conforme se verifica no gráfico 3, o patógeno não foi afetado pela queda de temperatura, mas pelo contrário teve seu crescimento estimulado. O inverso ocorreu nas temperaturas mais elevadas

pois um período de 4 horas (diárias) de incubação do patógeno a tais temperaturas foi tempo suficiente para inibir seu crescimento. Em nossas condições, temperaturas superiores a 30°C são bastante comuns em estações de verão, principalmente nas horas de maior insolação, ao redor de 12 a 15 horas. Nos períodos de inverno, nas horas de maior insolação, as temperaturas raramente atingem níveis superiores a 25°C ou 26°C. Este talvez seja o motivo porque o fungo tenha pouca significação no período de verão tornando-se problemático no inverno.

Não sabemos os motivos pelos quais o patógeno é inibido às temperaturas elevadas, mesmo que este seja submetido a sua ação por períodos relativamente curtos e tão pouco o motivo do aparente estímulo por temperaturas baixas. Outros estudos seriam necessários para que fosse encontrada uma explicação adequada.

5.2. Estudo comparativo entre os sintomas induzidos em berinjela por A.phaseolorum e P.vexans

O estágio perfeito de A.phaseolorum é ainda hoje um assunto bastante discutido. Segundo NAGAI (1961) A.lycopersici (sinônimo de A.phaseolorum) foi relacionado por KLOBAHN com a forma peritecial Didymella lycopersici Kleb. e A.phaseolorum por sua vez é apontado como tendo por forma perfeita Mycosphaerella pinodes Berck & Blox. Segundo o mesmo autor, a escassez da ocorrência de formas ascogenas não tem permitido que se leve a cabo estudos mais detalhados para estabelecer estas relações.

Os dados obtidos no presente trabalho, são uma indicação de que A.phaseolorum possa estar relacionada com o gênero Didymella uma vez que as parafises puderam ser

nítidamente observadas (figuras 3 e 4). Essa mesma associação, encontrada no material 4825, já havia sido por nós observada, anteriormente, por duas vezes, quando do isolamento
brar que a presença de parafises como elemento morfológico valioso para distinção entre os gêneros Didymella e Mycosphaerella foi amplamente discutido por KOCH (1931). Em suma, todas as dificuldades giram em torno do desconhecimento dos fatores fisiológicos que conduzem a formação do estágio perfeito e do encontro de métodos eficientes para a sua indução sob condições controladas. Talvez isso possa ser conseguido através de estudos mais acurados sobre a genética e, principalmente, no que refere as exigências nutricionais do microrganismo, Com outros fungos fitopatogênicos (WHELLER e col 1959; KIMATI 1970) bons resultados já têm sido obtidos nessa área

Nos diversos ensaios de inoculações realizadas "in vitro" ou em condições de estufa foi verificado que os frutos de berinjela reagiram igualmente aos fungos, quer quando inoculados separadamente e mantidos em caixas plásticas, quer quando ainda não destacados das plantas e mantidos em condições de estufa.

As diferentes variedades reagiram da forma quanto ao ponto de vista qualitativo, ou melhor, houve apenas diferença no tamanho das lesões produzidas indicando que as diversas variedades podem apresentar diferentes susceptibilidades aos patógenos, não havendo, entretanto, variação quando se considerou o tipo de sintomas para um mesmo patógeno inoculado. Foi ainda verificado ser bastante difícil a distinção de podridões causadas por A.phaseolorum e P.vexans

havendo apenas uma pequena variação na coloração das podridões produzidas. Difícil também será a distinção entre as doenças, em condições de campo, quando essa diferenciação for feita tomando-se por base lesões de frutos. Neste caso, apenas o exame de laboratório poderá positivar a diagnose.

Quando se consideram folhas, foi observado que o método de inoculação das mesmas, separadamente, "in vitro" (folhas destacadas), é válido quando se deseja estudar a patogenicidade, mas pouco adequado quando a inoculação é feita com o propósito de se comparar sintomas. Como foi notado, os sintomas foram atípicos tanto no caso de A.phaseolorum como para P.vexans, resultando, em ambos os casos, em podridões generalizadas.

Nas experiências de estufa, onde foram inoculadas plantas inteiras, os sintomas foram idênticos aos normalmente observados em condições de campo, demonstrando que apenas este método deve ser usado quando se deseja estudar sintomatologia. Por este processo, foi verificado que, embora semelhantes em muitos aspectos, os sintomas de A.phaseolorum e de P.vexans diferem principalmente no que se refere ao formato regular das manchas causadas por Ascochyta e, irregular e tendendo a acompanhar as nervuras de Phomopsis.

Com relação as lesões produzidas nas hastes, quer quando os fungos foram inoculados por injeção ou por aspersão a diferença mais marcante foi a tendência a se desenvolver lateralmente envolvendo as hastes apresentadas por Ascochyta enquanto que para Phomopsis as lesões tenderam a estender-se no sentido do comprimento das fibras. Neste caso parece não ser difícil a distinção das duas doenças em condições de campo.

A semelhança entre os sintomas de A.phaseolorum e de P.vexans talvez possa explicar o mal entendido existente em nosso meio, no que se refere a certas restrições que tem sido impostas aos híbridos criados pelo Departamento de Genética da E.S.A.L.Q. Esses híbridos (F 100 e F 45) tem sido considerados, por muitos técnicos e lavradores, como suscetíveis a P.vexans, embora suas origens genéticas fossem para obtenção de resistência. Nos ensaios de inoculação aqui realizados o híbrido F 100, aparentemente, comportou-se como resistente a P.vexans, havendo o aparecimento de lesões pequenas e pouco numerosas. Com relação a A.phaseolorum o mesmo foi suscetível, não diferenciando das demais variedades. Assim, a idéia corrente de que esses híbridos sejam suscetíveis a P.vexans pode ser consequência de informações obtidas através de diagnoses de campo e não comprovadas por exames de laboratório. Estes são, sem dúvida, aspectos do presente trabalho que careceriam ser melhor estudados.

5.3. Determinação de novos hospedeiros

Conforme pode ser verificado nos resultados expressos na tabela IV, existem em nossas condições um número bastante elevado de ervas nativas, hospedeiras e que podem atuar como fonte natural de inóculo. Embora entre as ervas suscetíveis sejam encontradas plantas pertencentes a diversas famílias botânicas, o maior número parece pertencer às famílias Compositae, Malvaceae, Leguminosae e Solanaceae. Este fato tem sido frisado por diversos autores (CROSSAN 1958; ALCORN 1968; SUTTON e WATERSTON 1966, e SIMMONDS 1966). Infelizmente não nos foi possível encontrar plantas nativas da família Leguminosae para que fossem inoculadas.

Nos ensaios de patogenicidade, aqui realizados, os resultados estiveram de pleno acordo com aqueles obtidos por CROSSAN (1958) com isolamentos de A. phaseolorum da América do Norte, isto é, o patógeno infectou as plantas sem que houvesse necessidade prévia de ferimentos nas partes inoculadas. O período de 48 horas de umidade adequada e temperaturas não superiores a 28°C foram condições suficientes para que a infecção se estabelecesse. Alguns insucessos que por vezes ocorreram em nossas inoculações de plantas envasadas estiveram sempre relacionadas com dias excessivamente quentes e conseqüente elevação da temperatura nas câmaras de inoculação. Nessas condições, já que não dispúnhamos de câmaras úmidas com temperatura controlada, houve necessidade de se repetir as inoculações aguardando-se por dias de temperaturas mais amenas.

Os resultados obtidos por ALCORN (1968), em cujas experiências era necessária a existência prévia de ferimentos nas plantas para que a infecção se estabelecesse, sugerem uma variação bastante grande na virulência de diferentes isolamentos de A. phaseolorum. Aliás este fato, já discutido por ALCORN (1968) e por CROSSAN (1958), pôde ser também por nós verificado quando, nas inoculações de folhas de feijão e berinjela, nos testes complementares dos ensaios sorológicos (tabela V), foi notada uma variação na infectividade de das diferentes culturas utilizadas.

As experiências realizadas no presente trabalho, também confirmam a idéia de DESLANDES (1945) que atribuiu a A. lycopersici as manchas que ocorriam em plantas de erva moura, jiló paulista, gérbera, pimentão doce, em uma composta nativa não identificada e sobre Physalis sp., na Es

tação Experimental de São Bento, RJ, plantas estas situadas ao redor de culturas de tomate altamente atacadas. Sabe-se hoje, que A.lycopersici é sinônimo de A.phaseolorum e, conforme se verifica na tabela IV, a erva moura (Solanum americanum), Physalis sp. e várias compostas foram altamente suscetíveis. Também as ilustrações apresentadas por DESLANDES, das lesões em erva moura, são idênticas às aqui apresentadas (figura 21).

De tudo que foi aqui discutido verifica-se que do ponto de vista agrônomo, algumas medidas de ordem prática podem ser adotadas tomando-se em consideração os dados acima obtidos. Por exemplo, dado o grande número de plantas de interesse econômico e plantas nativas, hospedeiras, cuidados devem ser tomados no que concerne a organização de planos para rotação de culturas bem como na limpeza prévia do terreno, quanto às plantas nativas hospedeiras, para o estabelecimento de culturas altamente suscetíveis a A.phaseolorum como é o caso das culturas de feijão vagem, quiabo e berinjela.

5.4. Emprego da sorologia como método auxiliar para a identificação de A.phaseolorum e especificação de fungos do gênero Ascochyta

Os resultados negativos, ou seja, a ausência de reações sorológicas nos testes de dupla difusão em ágar, quando se empregou massas intactas de esporos, vem demonstrar que não houve difusão dos componentes antigênicos. A simples trituração manual dos esporos, obtida com o auxílio de um almofariz, foi suficiente para a liberação de tais componentes resultando em reações positivas. O exame microscópico da massa de esporos, após o processo de trituração manual, demonstrou que um grande número de conídios foi destruído pelo pro

cesso. Isso permitiu que os componentes antigênicos, quer na forma solúvel ou de partículas (antígeno particularizado), se difundissem no ágar permitindo o aparecimento das reações sorológicas.

O emprego de vibradores ultra-sônicos para homogenização de antígenos e liberação de componentes antigênicos tem sido aplicado com sucesso por vários autores, sendo atualmente um método já consagrado na técnica sorológica. Assim é que AMOS e BURREL (1966) quando utilizaram a sorologia para separar diversas espécies de Ceratocystis verificaram que suspensões de esporos tratadas pelo ultra-som, deram reações muito mais fortes, em testes de dupla difusão em ágar, quando comparadas com suspensões de esporos não tratadas. Diferentes tipos de aparelhos ultra-sônicos, tais como Branson S-15 (MORTON e DUKES 1966), Branson Modelo S-110 (MERZ e col. 1969; AMOS e BURREL 1966), Branson Modelo S-75 (AMOS e BURREL 1966), Raytheon R-22-3 (FRIEDMAN e CONANT 1953; KADEN 1957), tem sido empregados para esse fim. Os maus resultados por nós obtidos com o modelo MSE 100 watt foram provavelmente devidos a necessidade de modificações na técnica utilizada ou ainda ao fato do tipo de homogenizador ultra-sônico não ser adequado para esse fim. O que levou ao abandono da técnica e ao não aperfeiçoamento do método, foram os bons resultados afeitos com outras técnicas, como trituração dos esporos e extração dos antígenos com ácido acético.

A tentativa de extração de antígenos, pelo emprego de uma solução ácida fraca, foi baseada na farta literatura existente sobre o significado dos polissacáridos como antígenos de fungos e bactérias. (WILCOX e LINK 1935; TEMPEL, 1959; BISHOP e col. 1960; BISHOP e col. 1963; KWAPINSKI 1963,

SUMMERS e col 1963; PEPYS e LONGBOTTON 1967). Além disso foi tomada em conta a idéia de GOODING (1966), que se referiu a importância de se trabalhar com antígenos purificados ao invés de se utilizar extratos brutos, onde a complexidade das bandas de precipitações dificultam o claro entendimento das reações sorológicas. Também segundo PEPYS e LONGBOTTON (1967), investigações recentes têm demonstrado que os polissacáridos contêm uma série de componentes antigênicos úteis para a produção de reações antígeno-anticorpo altamente específicas.

O fenômeno de aglutinação verificado quando se aplica o AS 731 diretamente sobre uma suspensão de esporos de A. phaseolorum vem demonstrar a presença de antígenos nas paredes externas dos conídios e ainda que esses antígenos não são facilmente difusíveis, uma vez que a reação é negativa, quando massas de esporos intactas são utilizadas em testes de dupla difusão em ágar. (Vide 4.4.4.1.)

Dada a grande especificidade da reação, já que não foi verificada qualquer aglutinação quando se aplicou como antígeno esporos de outros fungos, este teste pode ser utilizado na obtenção de dados preliminares sobre as reações sorológicas. Convém salientar que CHEEK e BARRET (1961) demonstraram que técnicas de aglutinação são úteis apenas para detecção de antígenos de superfície uma vez que antígenos internos são sempre inacessíveis aos anti-corpos.

Empregando-se o AG solúvel, os testes de precipitação em tubos apresentam a vantagem da rapidez das reações, pelo aparecimento do anel da interfase AS-AG mas apresentam a desvantagem no excessivo gasto de reagentes. O método, como no caso do de aglutinação em lâminas, foi útil para a obtenção de dados preliminares e, como já foi salientado anteriormente, bastante adequado para estudos de titulação.

Como as reações obtidas com o AG solúvel foram coincidentes com as do AG triturado quanto a especificidade das reações em gel, deu-se preferência a utilização do primeiro porque o seu preparo é muito menos trabalhoso e tecnicamente melhor padronizado. O emprego do AG solúvel foi também mais adequado pelo fato de que este proporciona lâminas sorológicas mais claras e limpas. Neste particular, a vantagem do uso de esporos triturados é que a massa de esporos colocada nos orifícios das lâminas adere tanto a camada de ágar, nas paredes laterais dos orifícios, como no vidro, ao fundo, após o período necessário para a obtenção de linhas de precipitação nítidas. Isto faz com que seja preciso submeter as lâminas a lavagem com água. Esta é uma operação trabalhosa e deve ser realizada com cuidado porque muitas vezes a aderência dos esporos é tão intensa que se torna difícil a limpeza das lâminas sem que se cause dano a camada de ágar. Há ainda o problema de que, quando a limpeza não é perfeita, no ato de coloração das lâminas, o resíduo de esporos existente se colore intensamente comprometendo a nitidez das linhas de precipitação.

Aplicando-se o método de OUTCHERLONY de dupla difusão em ágar verifica-se que as reações foram altamente específicas conforme os resultados expressos em 4.5.4. O AS preparado para Ceratocystis (AS 526) reagiu apenas com Ceratocystis (AG 526), o mesmo ocorrendo com o AS preparado para A. phaseolorum (AS 731) que reagiu apenas com o AG homólogo (AG 731) ou com antígenos de algumas outras culturas de Ascochyta. (Lâminas 1 e 2).

Os AG 827 e AG 932 de P. vexans (Lâmina 5) foram incluídos a fim de se verificar a possibilidade de rea-

ções cruzadas com o AS 731. Diversos autores (WIMALAJEEWA e J. DE VAY 1971; CHARUDATTAN e DE VAY 1971; DOUBLY e col. 1960; FLAGAS e DIKSON 1961; FLOR 1955) tem demonstrado a possibilidade de reações cruzadas entre antígenos de agentes patogênicos e os anti-soros dos respectivos hospedeiros e vice-versa e procurado relacionar a intensidade dessas reações com o grau de afinidade entre patógeno e hospedeiro. Baseando-se nestes trabalhos e considerando que tanto A. phaseolorum como P. vexans são altamente patogênicos para berinjela, ambos os fungos poderiam ter antígenos comuns. Nas experiências aqui realizadas não foi verificada qualquer relação antigênica entre os dois fungos.

De posse dos dados sorológicos e de patogenicidade contidos na tabela V é possível uma análise geral dos resultados, que serão discutidos individualmente ou agrupados segundo as características gerais ou a possível espécie de cada cepa.

As reações positivas obtidas com os AG-extraídos a partir das cepas: IB 788 G, IB 795 G, IB 853 G e IB 909 G eram esperadas, uma vez que todas essas culturas tinham o mesmo aspecto da cultura de A. phaseolorum (IB 731G) e tinham sido isoladas de plantas de berinjela mostrando sintomas típicos de ascoquitose. Com exceção da cultura IB 795 G, cuja patogenicidade não foi testada, os resultados sorológicos obtidos para as demais puderam ser confirmados pelos testes de inoculação em berinjela e feijão. A cepa IB 909 G mostrou-se menos virulenta em relação as outras três culturas, isoladas da mesma planta.

Também era de se esperar que fossem positivos os resultados obtidos com as cepas IB 799 G, IB 804 G, IB 865 G, IB 931 G, IB 946 G e IB 947 G desde que estas, além de serem,

no que se refere ao aspecto da cultura , iguais a A.phaseolorum, tinham sido isoladas respectivamente de: toma teiro, quiabeiro, feijão vagem, tomateiro , tomateiro e algo doeiro (vide 3.4.2.1.), que são plantas consideradas hospedei ras de A.phaseolorum (CROSSAN 1958). Com exceção da cepa IB 931 G, não inoculada, os testes de patogenicidade realizados com as demais culturas confirmaram plenamente os dados soro lógicos.

Em dois casos - cepas IB 863 G e IB 873 G - os resultados não coincidiram com o que era esperado, a prin cípio. Estas cepas foram isoladas respectivamente de pimen tão e tomateiro, plantas consideradas hospedeiras de A.phaseolorum, tinham as características das culturas bastan te próximas da cepa IB 731 G e no entanto deram reações soro lógicas negativas. Todavia, o resultado também negativo nos testes de patogenicidade realizados com a cepa IB 873 G con firmaram não se tratar de A.phaseolorum. Para a cepa IB 863G a patogenicidade não pôde ser testada. Estes dois isolamentos provavelmente pertenceriam a outra ou outras espécies ocorren do sobre plantas hospedeiras de A.phaseolorum.

Os resultados sorológicos positivos das ce pas IB 791 G, IB 798 G, IB 834 G e IB 866 G, isoladas de plan tas do gênero Brassicacae também não eram esperados uma vez que essas plantas não tem sido consideradas como hospedeiras de A.phaseolorum e sim da espécie A.brassicacae Thun. Entretan to os testes de patogenicidade confirmaram tratar-se de A.phaseolorum. A maioria das cepas mostrou-se altamente pato gênica para berinjela e patogênica para o feijão. Quanto ao aspecto das culturas, não puderam ser notadas diferenças entre estas e a cultura IB 731 G. Devemos ainda considerar que os

isolamentos a partir de plantas do gênero Brassicae foram sempre realizados de folhas velhas. Neste caso, existe a possibilidade de A. phaseolorum estar ocorrendo saprofiticamente. Testes realizados pela inoculação de folhas de couve (Brassica oleracea L.) pelo mesmo processo empregado para berinjela e feijão resultaram no apodrecimento das folhas, mesmo nas folhas controle, antes do aparecimento de qualquer sintoma que pudesse caracterizar infecção pelo fungo. Em favor da hipótese de que A. phaseolorum possa ser patogênica para repolho e couve flor vem o resultado obtido no ensaio de inoculação de plantas nativas (vide tabela IV), quando se obteve resultado positivo na inoculação do nabo bravo (Brassica, sp.). Quanto ao aspecto morfológico comparando as descrições dos fungos contidas em SACCARDO (1884) e SUTTON e WATERSTON (1966) A. brassicae Sacc. difere de A. phaseolorum quanto a forma dos conídios. Enquanto que para a primeira espécie os conídios são regulares e fusiformes, para A. phaseolorum estes são irregulares, muitas vezes encurvados e apresentando extremidades achatadas ou arredondadas. Ao exame microscópico os conídios das cepas isoladas das plantas do gênero Brassicae (IB 771 G; IB 798 G; IB 834 G e IB 866 G) revelaram todas as características do tipo citado para A. phaseolorum.

No caso das cepas IB 723 G e IB 757 o resultado negativo, tanto nos testes sorológicos como nos ensaios de patogenicidade, era o esperado. Em café é citada a espécie A. coffeae Henn. descrita por HENNINGS sobre folhas de cafeeiro do Estado de São Paulo. (HENNINGS, 1922). Sobre a mesma planta é também conhecida A. tarda Stew., descrita por STEWART, na Etiópia (STEWART 1957). Esta espécie ainda não foi encontrada em nosso meio.

Os resultados sorológicos e de patogenicidade negativos, obtidos para as cepas IB 867 G e IB 886 G, isoladas de cucurbitáceas, respectivamente: xuxu e pepino, eram esperados, pois sobre estas plantas é mencionado o fungo A.cucumis (Faut.) Roum, forma picnódica de Mycosphaerella melonis (Pass.) Chiu e Walk. Neste caso, tanto a coloração como o aspecto das culturas diferiram dos de A.phaseolorum.

Também negativos, foram os resultados para a cepa IB 893 G isolada de mamoeiro. Esta planta é hospedeira do fungo A.caricae Pat. forma imperfeita de M.caricae (Maubl. Também neste caso a cultura diferia da cepa IB 731 G.

O resultado positivo para a cepa IB 894 G, isolada de alcachofra, foi plenamente confirmado pelo teste de patogenicidade, pois o isolamento foi extremamente virulento tanto para berinjela como para o feijão. Também a cepa IB 731 G (A.phaseolorum), conforme pode ser verificado na tabela IV, mostrou-se altamente infectiva para alcachofra. Disso se conclui que A.phaseolorum além de ser altamente patogênico para alcachofra é um patógeno que ocorre normalmente em condições de campo atacando esta cultura. Convém ainda salientar que em nossas condições, nas regiões onde se produz alcachofra, nos arredores dos municípios de Ibiuna e São Roque, S.P., uma ascoquitose vem se tornando cada dia, problema mais sério.

Sobre alcachofra a literatura também indica o fungo A.cynarae Maf. Quanto a este aspecto, uma possível relação ou identidade entre as espécies A.phaseolorum e A.cynarae não pode ser desprezada. Conforme se verifica em MALEÇON(1936), as determinações específicas dentro do gênero Ascochyta são geralmente muito confusas, baseadas apenas em pequenas dife-

renças morfológicas, e sem o apoio de pesquisas sobre patogenicidade. Este seria, um caso particular, cujo esclarecimento demandaria pesquisas detalhadas sobre a morfologia, patogenicidade e sorologia dos organismos em questão.

Tomando-se por base os resultados das experiências aqui realizadas no campo da sorologia pode-se verificar que o antígeno preparado mostrou-se altamente específico, dando reações positivas apenas com fungos pertencentes a espécie A. phaseolorum. O AS obtido a partir dos esporos foi , ao que tudo indica, mais específico do que aquele preparado por MADOSINGHI e col (1967), quando estes autores procurando separar diversas espécies de Ascochyta, empregaram como antígenos imunizantes estruturas somáticas (micélio). Por este processo os autores lograram obter, nos ensaios de dupla difusão em ágar, um sistema muito complicado de reações de precipitinas e de difícil interpretação.

O título obtido pelo processo de imunização, empregado no presente trabalho, foi relativamente baixo, ou seja, 1:128 o título precipitante e 1:64 quando o AS foi diluído. A obtenção de títulos pouco elevados é, muitas vezes, vantajosa porque estes estão geralmente relacionados com uma maior especificidade dos anti-soros.

O valor dos polissacáridos como antígenos de fungos já tem sido largamente discutido e comprovado por diversos pesquisadores e, mais recentemente, tem se notado uma grande preocupação no estudo mais detalhado e profundo das características bioquímicas desses antígenos. Notáveis neste campo de estudo são os trabalhos de BISHOP e col. (1960) e BISHOP e col. (1963) quando lograram purificar polissacáridos imunologicamente importantes de Candida albicans (Rob) Berk e de Trichophyton granulosum Sab. Também KAWAPINSKI (1963)

verificou que polissacáridos isolados de Nocardia asteroides (Eppinger) Blanch. poderiam ser considerados como espécie-específicos e SUMMERS e col. (1963) estudaram e demonstraram a importância de antígenos polissacarídicos das paredes celulares de diversos fungos do gênero Candida.

Os estudos sobre a natureza química dos antígenos, realizados no presente trabalho, tiveram por objetivo apenas a obtenção de dados preliminares que pudessem fornecer algumas informações sobre os antígenos extraídos dos esporos de A. phaseolorum, os quais demonstraram ser de bastante utilidade na especificação do fungo. Os testes colorimétricos de Anthrona e de Molisch, positivos, demonstraram a possibilidade de que a antigenicidade específica encontrada em substâncias presentes nos conídios e que são extraídas a quente por uma solução de ácido acético a 0,03N seja, em grande parte, devida a polissacáridos. Esta suposição é ainda enfatizada pelo fato de que as substâncias que reagiram positivamente nos testes colorimétricos de açúcar possuem moléculas grandes, já que são incapazes de atravessar a membrana de diálise. Os resultados, também positivos, obtidos para os antígenos extraídos que reagiram negativamente com o AS 731, sugerem não ter havido falhas no processo de extração, uma vez que estes também possuem polissacáridos. Neste caso, a reação sorológica negativa teria sido apenas uma conseqüência da especificidade do AS. Estes dados podem explicar, em parte, os insucessos obtidos por MATSUMOTO (1929), quando este tentou separar diversas espécies de Aspergillus através de métodos sorológicos. Este autor, ao invés de tentar melhorar as características do AG para as reações sorológicas, já que o problema se constituía na precipitação espontânea das suspen

sões de esporos em testes de aglutinação, o fez procurando melhorar as características do AG inoculante. Introduzindo no modificações na técnica anteriormente empregada, submeteu os esporos de A.amsterlodami ao aquecimento e fervura, antes da injeção, não logrando obter anti-soros. Por este método, MATSUMOTO teria, provavelmente, destruído ou desnaturado a maior parte das proteínas e solubilizado os polissacáridos. Sabe-se hoje que os polissacáridos extraídos de fungos, como regra, tendem a ser haptenos, ou seja, reagem bem com os anti-soros mas falham em estimular a produção de anticorpos quando injetados em animais. Este seria sem dúvida um forte motivo para que o soro obtido reagisse da mesma forma que o soro normal.

O mesmo autor, procurando aplicar métodos de precipitação em tubos, pretendeu extrair substâncias antigênicas a partir de esporos de diversas espécies do mesmo gênero para serem utilizadas como antígenos reagentes. Para isso utilizou, como solvente, álcool absoluto não logrando obter qualquer resultado. Esse insucesso pode ter sido uma consequência da precipitação, pelo álcool, dos polissacáridos e das proteínas existentes nos esporos.

Os dados por nós obtidos são ainda pouco conclusivos, entretanto, deles pode-se facilmente depreender sobre o valor destes estudos e da grande necessidade e importância de pesquisas relativas a bioquímica e especificidade dos antígenos fúngicos, bem como, do estabelecimento de métodos adequados para suas purificações.

Os resultados dos testes de ninhidrina e biuret, aos quais os antígenos triturados e extraídos foram submetidos, parecem sugerir que o componente (ou componentes)

destruído pelo processo de extração possa ser uma proteína . Esta hipótese poderá ser futuramente melhor esclarecida empregando-se outros métodos bioquímicos ou mesmo aplicando-se processos de imunoeletroforese. Entretanto, a destruição deste componente (ou componentes), antigênico, pelo que tudo indica, não interfere na especificidade do antígeno. Isto pode ser verificado nos testes sorológicos e de patogenicidade (tabela V) onde os resultados estiveram de pleno acordo com o esperado. Convém salientar que segundo diversas pesquisas já realizadas (in PEPYS e LONGBOTTON 1966) da mesma maneira como sucede com Pneumococcus, os antígenos polissacarídicos de fungos são em geral responsáveis por uma especificidade muito maior do que os antígenos proteicos. Desta forma, se os testes sorológicos realizados no presente trabalho fossem repetidos, empregando-se apenas o AG triturado, possivelmente poderia haver o aparecimento de reações cruzadas, conseqüentes do componente proteico. Este é um dos aspectos do presente trabalho que merece ser, futuramente, melhor estudado.

As reações negativas, obtidas quando se utilizou como antígeno extrato de micélio da cepa IB 731 G (Vide 4.4.7.3.), comprovam a alta especificidade do AS preparado a partir dos esporos.

Embora diversos autores tenham conseguido resultados apreciáveis em sorologia de fungos, empregando para imunização, antígenos preparados a partir de estruturas somáticas (micélio) ou mesmo a partir de produtos de excreção (metabolitos) ao nosso ver, o emprego de estruturas reprodutivas (esporos) é sempre mais adequado e sempre que possível devem ser injetadas nos animais sem muitos artifícios de técnica, que possam alterar a integridade dos diversos componen

tes antigênicos. As dificuldades na realização dos testes sorológicos aparecem, principalmente, quando há necessidade de se trabalhar com extratos fúngicos. Tais extratos, consistem em um sistema múltiplo de antígenos que apresentam todos os riscos para a análise como: variação quantitativa dos antígenos, artefatos resultantes da técnica de extração e consequentemente precipitações inespecíficas e ainda, se for o caso de se trabalhar com tecido somático, a possível variação quantitativa e qualitativa dos antígenos durante o ciclo de vida do organismo estudado. Muitos destes inconvenientes podem ser evitados se o antígeno inoculante for constituído por estruturas reprodutivas e portanto menos sujeitas a variações do que os tecidos somáticos.

Em apoio a esta idéia e traçando um paralelo com outros campos da sorologia, aplicada a taxonomia, verifica-se, por exemplo, que na sorobotânica tem se notado uma marcante tendência ao emprego de estruturas reprodutivas (sementes, pólen etc.) como antígeno imunizante porque estas são menos sujeitas a variações do que os tecidos somáticos (FAIRBROTHERS 1968; HAWKES e TUCKER 1968). Também na bacteriologia, segundo CASTRO (3), na separação entre amostras de Bacillus cereus Cohn e Bacillus anthracis Frankland & Frankland nem sempre fácil, um dos recursos utilizados para tal diferenciação é o emprego do soro anti-esporos, que se mostra bastante específico, o que não acontece com anti-soros preparados com estruturas somáticas.

(3) A.F. Pestana de Castro - Informação pessoal

Quando estruturas somáticas são empregadas para a sensibilização de animais, os títulos resultantes são, via de regra, muito altos (MADOSINGH 1964, 1964 b, MADOSINGH e col. 1967, LINK e WILCOX 1932 e outros) o que geralmente, está associado a uma pobre especificidade. Desta baixa especificidade resultam complicados sistemas de reações de precipitina, muito difíceis de se interpretar, mesmo quando se lança mão de técnicas de diluição e de absorção.

Uma grande soma de pesquisas já realizadas no campo da sorologia de fungos parece sugerir que, para a obtenção de reações específicas, mais importante do que o aperfeiçoamento de técnicas de imunização ou das características do antígeno imunizante é o aprimoramento das preparações do antígeno para as reações sorológicas.

6. CONCLUSÕES

Os estudos desenvolvidos no presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões principais:

1. Grãos esterilizados de feijão Azuki (P.angularis Kaw.) foram apropriados para esporulação de A.phaseolorum.

2. A temperatura mais adequada para esporulação de A.phaseolorum situa-se ao redor de 21 a 24°C e para germinação de conídios ao redor de 21°C.

3. Períodos curtos de temperaturas elevadas (superiores a 27°C) são suficientes para a inibição do crescimento de A.phaseolorum, enquanto que períodos curtos de temperaturas mais baixas que o ótimo de crescimento (21°- 12°C) têm o efeito inverso.

4. Os sintomas causados em berinjela por A.phaseolorum e por P.vexans são bastante semelhantes, o que pode levar a confusão entre as doenças causadas pelos dois patógenos em diagnoses de campo.

5. A.phaseolorum é patogênico para um número elevado de plantas de importância econômica e plantas nativas, sendo particularmente importante para berinjela, quiabo e feijão vagem, cultivados em período de inverno.

6. Foi encontrada uma grande variação entre os diversos isolamentos de A.phaseolorum no que concerne ao grau de patogenicidade para as diversas plantas inoculadas.

7. O anti-soro preparado para A.phaseolorum, empregando-se suspensões de esporos, mostrou-se altamente específico.

8. A extração do antígeno empregando-se ácido acético a 0,03N é vantajosa e não altera a especificidade antigênica do mesmo.

9. O emprego da sorologia mostrou ser promissor como método auxiliar na especificação de fungos do gênero Ascochyta.

7. RESUMO

No presente trabalho foram realizados estudos que tiveram como finalidade: contribuir para o melhor conhecimento de alguns aspectos da fisiologia de Ascochyta phaseolorum; estudar comparativamente, procurando estabelecer diferenças entre os sintomas induzidos em berinjela por aquele patógeno e por Phomopsis vexans; estudar alguns aspectos da sintomatologia de A.phaseolorum em outras plantas econômicas, procurando a determinação de novos hospedeiros principalmente entre as nossas plantas nativas e finalmente, verificar a possibilidade do emprego da sorologia como método auxiliar para a especificação de A.phaseolorum e de outros fungos pertencentes ao gênero Ascochyta.

Nos diversos ensaios realizados verificou-se que embora haja uma variação bastante grande no grau de esporulação das diversas cepas utilizadas, o meio de grãos esterilizados de Azuki (Phaseolus angularis Kaw.) é bastante adequado para esporulação de A.phaseolorum. A melhor temperatura para o desenvolvimento vegetativo do fungo situa-se ao redor de 24°C. O crescimento é paralizado a 3°C e o patógeno perde a viabilidade a 33°C. O aspecto cultural do microrganismo se modifica com a variação da temperatura e a melhor temperatura para esporulação do fungo situa-se ao redor de 21°C e 24°C. A temperatura de 21°C foi mais adequada para a germinação dos conídios. Quando o fungo foi submetido a alternância de temperaturas, enquanto que períodos curtos de temperaturas, inferiores ao ótimo, estimularam o crescimento, temperaturas elevadas inibiram o desenvolvimento de A.phaseolorum.

Para os estudos comparativos entre os sintomas induzidos em berinjela por A.phaseolorum e por P.vexans foram inoculadas diversas variedades em condições de laboratório e de casa de vegetação, empregando-se diferentes técnicas de inoculação. Estes estudos confirmaram a hipótese de que a semelhança entre estes pode levar a confusões entre as duas doenças. Entretanto, foram anotadas certas diferenças sintomatológicas que podem auxiliar as diagnoses de campo. O estudo sintomatológico permitiu também caracterizar a doença em diversas plantas de interesse econômico tais com: algodão, feijão, feijão vagem, pimentão, quiabo, tomate e alcachofra. A importância econômica da ascoquitose em nosso meio, para cada uma das culturas estudadas, foi comentada.

Através de inoculações em estufa a patogenidade de A.phaseolorum foi estudada para 32 espécies nativas, pertencentes a 14 famílias botânicas diferentes, tendo-se verificado a existência, em nosso meio, de um grande número de hospedeiros que podem manter elevado o nível de inóculo em condições de campo. Em face a estes resultados, como uma medida de ordem prática para o controle da doença, em condições de campo, foi sugerida a limpeza cuidadosa do terreno, no que se referere às ervas nativas, principalmente quando este se destina ao cultivo de feijão vagem, quiabo e berinjela, plantas altamente suscetíveis à A.phaseolorum.

Para os estudos sorológicos o anti-soro foi obtido pela imunização de coelhos através de injeções de suspensões de esporos por via intramuscular, tendo sido estabelecida uma metodologia para estudos sorológicos de A.phaseolorum e outros fungos do gênero Ascochyta. Após o emprego de

diversos processos, visando a obtenção de antígenos para as reações sorológicas, foi considerado como mais adequado o método de extração a partir dos conídios utilizando-se uma solução de ácido acético a 0,03N. Testes sorológicos de dupla difusão em ágar, associados a ensaios de patogenicidade, demonstraram a alta especificidade do anti-soro preparado. As técnicas sorológicas foram consideradas como promissoras, podendo ser empregada como métodos auxiliares para a identificação de A. phaseolorum e especificação de fungos do gênero Ascochyta.

8. SUMMARY

Physiological and serological studies on *Ascochyta phaseolorum* and on the disease caused in egg-plant (*Solanum melongena*) and in other economic plants

The object of this paper was the following :

1) to contribute toward a better knowledge of some physiological aspects of *Ascochyta phaseolorum*, 2) to establish the differences between the symptoms induced in egg-plant by that pathogen and by *Phomopsis vexans*, 3) to study some aspects of the symptomatology of *A. phaseolorum* on other economic plants and to determine new hosts, principally on native plants, and 4) to verify the possibility of employing serology as an auxiliary method for the speciation of *A. phaseolorum* and of other fungi of the genus *Ascochyta*.

It was found in several tests that, while there is considerable variation in the degree of sporulation of the samples used, the media of autoclaved seeds of azuki (*Phaseolus angularis* Kaw) was suitable for the sporulation of *A. phaseolorum*. The best temperature for the mycelial development of the fungus was around 24°C. Growth stopped at 3°C and the pathogen lost viability at 33°C. The cultural aspect of the microorganism changed with the variation of the temperature and the best temperature for sporulation was between 21°C and 24°C. Conidia germinated best 21°C. Short periods of temperatures below optimum stimulated growth whereas high temperatures seemed to inhibit growth of the fungus.

Employing different techniques, several egg-plant varieties were inoculated in laboratory and greenhouse conditions for comparative studies of the symptoms induced in egg-plant by A.phaseolorum and by P.vexans. It was shown that the similarity of the symptoms might lead to mistakes between the two diseases, However, certain differences were noted that might help field diagnosis. The disease was characterized by symptomatological studies in several economic plants, such as: cotton, bean, green bean, peppers, okra, tomato and artichoke. The economic importance of ascochytois in São Paulo, for each of the cultures, was discussed. Pathogenecity of A.phaseolorum was studied by inoculating in the greenhouse 32 native species of weeds from 14 different botanic families, verifying the existance of a large number of hosts able to maintain a high level of inoculum in field conditions. As a practical means of control of the disease in field conditions, carefl weeding of the soil was suggested, principally when planting green beans, egg-plant and okra, which are highly susceptible to the fungus.

For serological studies, the antiserum was obtained by immunizing rabbits by intramuscular injections of spore suspensions. After employing several methods to obtain antigens for serological reactions, the best was considered the extraction from conidia, using a 0,03N acetic acid solution, OUTCHERLONY double diffusion tests associated with pathogenicity assays showed the high specificity of the anti serum prepared. Preliminary studies on the chemical nature of the antigens were developed, and the importance of polisaccharides was discussed. Finally, the serological techniques were considered promising as an auxiliary method for the identification of A.phaseolorum and speciation of other fungi of the genus Ascochyta.

9. LITERATURA CITADA

- ALCORN, J.L., 1968. Occurrence and host range of Ascochyta phaseolorum in Queensland. Aust.J.Biol. Sci., 21: 1143-1151.
- AMOS, R.E. e R.G. BURREL, 1966. Serological differentiation in Ceratocystis. Phytopathology, 57:32-34.
- ANÔNIMO, 1957. Serology. Apostila da Purdue University, Indiana, Lafayette, U.S.A., 5p.
- BALL, ELLEN M., 1961. Serological tests for the identification of plant viruses. Committee on Plant Virology. Am. Phytopath. Soc., 16p.
- BALLS, A.K. , 1925. The precipitin test in the identification of yeasts. J.Immun., 10: 797.
- BECK, E.C., 1934. The precipitin-ring test applied to some Ustilaginaceae. Can. J. Res., 10:234-248.
- BECK, E.C., 1938. The application of serological methods to the differentiation of closely related smut fungi. Can.J.Res., 10: 391-404.
- BELL, D.J., 1955. Mono-and oligosaccharides and mono-saccharide derivates. In PAECH, K. e TRACEY, M.V. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin, Spring-Verlag, 2: 625 p.
- BIER, O., 1965. Bacteriologia e imunologia. 7^a Edição São Paulo, Ed. Melhoramentos. 835 p.
- BISHOP, C.T.; F. BLANK e P.E. GARDNER, 1960. The cell wall polysaccharides of Candida albicans: glucan manan and chitin. Can.J.Chem., 38: 869-881.
- BISHOP, C.T.; F, BLANK e M. HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC, 1962. The water soluble polysaccharides of dermatophytes, I. a galactomannan from Trichophyton granulosum. Can. J. Chem. 40: 1816-1825.

- BITANCOURT, A.A., 1935. Doenças do algodoeiro. Folheto nº 8
Inst. Biol., 2lp.
- BITANCOURT, A.A., 1937. Relação das doenças e fungos parasitas observados na Seção de Fitopatologia durante os anos de 1935 e 1936. Arq. Inst. Biol., 8: 319-322.
- BITANCOURT, A.A.; R. DRUMOND-GONÇALVES e J.C. CARNEIRO. 1935. Relação das doenças e fungos parasitas observados na Seção de Fitopatologia durante os anos de 1933 e 1934. Arq. Inst. Biol., 6: 205-211.
- BONDARTZEVA-MONTEVERDE, V.N., 1923. Contribution to the microflora of the Government of Orel: New species of parasitic fungi (in Russian). Monitor Phytopathology Sect. Chief. Bot. Gard. R.S.F.S.R., 12:70-72 (Apud Rev. Appl. Mycol., 3: 692-693.1924)
- BUXTON, E.W.; W. CULBRETH e R.G. ESPOSITO, 1961. Serological separation of forms and physiologic races of pathogenic Fusarium oxysporum. Phytopathology, 51:575.
- CASTRO, A.F. PESTANA DE, 1969. Contribuição para o estudo do Erysipelothrix rhusiopathiae. São Paulo, Faculdade de Medicina da U.S.P., 55p. Tese.
- CHARUDATTAN, R. e J.E. DE VAY, 1971. Common antigens among varieties of Gossypium hirsutum and isolates of Fusarium and Verticillium species. Phytopathology, 62: 230-234.
- CHUPP, C. e A.F. SHERF, 1960. Vegetable diseases and their control. New York, Ronald Press Co. 693p.
- COONS, G.H. e M.C. STRONG, 1929. New methods for the diagnosis of species of the genus Fusarium. Mich. Acad. Sci. Arts Letters, 9:65-89.

- CROSSAN, D.F., 1953. Comparative studies on species of Ascochyta from okra, bean and cotton in North Carolina. *Phytopathology*, 43: 469.
- CROSSAN, D.F., 1958. The relationships of seven species of Ascochyta occurring in North Carolina. *Phytopathology*, 48: 248-255.
- CUNLEY, R.W. e G.W. GOLDSMITH, 1940. Preliminary serological studies of Phymatotrichum omnivorum. *Phytopathology*, 30: 130-139.
- DESLANDES, J.A., 1945. Fatos sobre doenças do tomateiro. Bol. nº 253 Min. Agric. Serv. de Docum. 70p.
- DOUBLY, J.A.; H.H. FLOR e C.O. CLAGGET, 1960. Relation of antigens of Melampsora lini and Linum usitatissimum to resistance and susceptibility. *Science*, 3: 224.
- ELLIS, D.E., 1951. Noteworthy diseases of cucurbits in North Carolina in 1949 and 1950. *Pl. Dis.Reptr.*, 35: 91-93.
- ELLIS, D.E., 1952. Ascochyta leaf spot of bean in North Carolina. *Pl.Dis. Reptr* , 36: 12.
- EVANS, E.E., 1950. The antigenic composition of Cryptococcus neoformans. *J. Immun.*, 64: 423-430.
- FAIRBROTHERS, D.E., 1968. Chemosystematics with emphasis on systematic serology. In HEYWOOD, V.H. , ed. *Modern method in plant taxonomy*, London, p. 150-173.
- FIGUEIREDO, M. BARRETO, 1967. Aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. *Biológico*, 33: 9-13.
- FIGUEIREDO, M. BARRETO e J. TERANISHI, 1969. Doença causada por Ascochyta phaseolorum Sacc. em berinjela (Solanum melongena L.) *Arq. Inst. Biol.*, 36: 109-115.

- FLANGAS, A.L. e J.G. DICKSON, 1961. The genetic control of pathogenicity, serotypes and variability in Puccinia sorghi. Am. J. Bot., 48:275-285.
- FLOR, H.H., 1955. Host-parasite in flax rust, its genetics and other implications. Phytopathology, 45: 680-685.
- FRIEDMAN, L. e M.F. CONANT, 1953. Immunologic studies on the etiologic agents of North and South American Blastomycosis. II Comparison of serologic reactions. Mycopath. Mycol. Appl., 6: 317-321.
- GILL, H.S. e DWIGHT POWELL, 1969. Serological relationships of physiologic races A-1 to A-8 of Phytophthora fragariae. Phytopathology, 59: 261-269.
- GOODING Jr., G.V. e H.R. POWERS Jr., 1964. Serological comparison of Cronartium fusiforme, C.cerebrum e C.ribicola. Phytopathology, 54: 622.
- GOODING Jr., G.V., 1966. Preparation of macromolecular antigens from Fomes anmosus. Phytopathology, 56: 1310-1311.
- HARTER, L.L., 1918. A hitherto unreported disease of okra. J. Agric. Res., 14: 207-212.
- HAWKER, LILIAN E., 1959. Physiology of fungi. London University, 360p.
- HAWKES, J.G. e W.G. TUCKER, 1968. Serological assessment of relationships in a flowering plant family (Solanaceae). In HAWKES, J.G. Chemotaxonomy and serotaxonomy. London, p.77-88.
- HENNINGS, P., 1922, Fungi S.Paulensis II a.d. Putteman Collecti. Hedwigia, 41: 295-311.

- HOLDEMAN, Q.L. e T.W. GRAHAN, 1952. Ascochyta leaf spot in tobacco plant beds in South Carolina . Pl.Dis.Reptr., 36: 8.
- KADEN, R.H., 1957. Precipitin studies for the identity of antigens in different species of Sporotrichum. Mycopath. Mycol. Appl. , 8: 260-270.
- KIMATI, H., 1970. Glomerella cingulata (Stonem.) Spauld. Et V. Schrenk F.sp phaseoli N.F., fase ascogena do agente causal da antracnose do feijoeiro. Piracicaba- S.P. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 35p. - Tese.
- KOCH, L.W., 1931. "Spur blight" of Raspberries in Ontario caused by Didymella applanata. Phytopathology, 21: 247-287.
- KORNGOLD, L., 1956. Immunological cross-reactions studied by the OUCHTERLONY gel-diffusion technique. J. Immun., 77: 119-122.
- KWAPINSKI, J.B., 1963. Antigenic structure of Actinomycetales, VI serological relationships between antigenic fractions of Actinomyces and Nocardia. J. Bact., 86: 179-186.
- LINK, G.K.K.; ADELIN DE S. LINK; G.L. CROSS e HAZEL W.WILCOX, 1932. The precipitin-ring test applied to fungi. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 29: 1278-1281.
- LINK, G.K.K. e HAZEL W.WILCOX , 1933. Precipitin-ring test applied fo fungi II. Bot. Gaz., 95: 1-34.
- MADHOSINGH, C., 1964. A serological comparison of three Fusarium species. Can. J. Bot. 42:1143-1146.
- MADHOSINGH, C. 1964 B. A serological comparison of isolates of Fomes roseus and Fomes subroseus. Can.J.Bot., 42: 1677-1683.

- MADHOSINGH, C. e V.R. WALLEN, 1967. Serological differentiation of the Ascochyta species on peas. *Can. J. Microbiol.*, 14: 449-451.
- MALEÇON, G, 1936. Une grave maladie des artichauts au Maroc. *Revue Mycol.* 3: 165-175 (Apud *Rev. Appl. Mycol.*, 15: 770, 1937.)
- MATSUMOTO, T. 1929. The investigation of Aspergilli by serological methods. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 14: 69-93.
- MERZ, W.G., R.G. BURREL e M.E. GALLEGLY, 1969. A serological comparison of six heterothalic species of Phytophthora. *Phytopathology*, 59: 367-370.
- MORTON, D.J.; P.D. DUKES e S.F. JENKINS, 1965. Serological identification of Pseudomonas solanacearum in four Solanaceous hosts. *Phytopathology*, 55: 54-55.
- MORTON, D.J. e P.D. DUKES, 1966. Serological differentiation of race 1 from race 2 of Fusarium oxysporum f. lycopersici. *Pl. Dis. Repr.*, 50: 444-445.
- MULLER, A.S., 1934. Lista preliminar de las enfermedades de las plantas cultivadas en el Estado de Minas Gerais. *Monitor Int. Def. Plant*, 9: 193-198.
- NAGAI, H. 1961. Estudos preliminares sobre a queima do quiabeiro (Abelmoschus sculentum (L) Moench) na baixada fluminense. *Agronomia*, 19: 48-55.
- NELSON, C.I., 1933. A method for determining the specificity of intracellular globulin of Fusarium lini. *J. Agr. Res.*, 46: 183-187.
- OLIVEIRA, A.R., 1967. Serologia aplicada ao estudo do virus do anel do pimentão. Piracicaba, S.P. - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 40p - tese.

- OUCHTERLONY, D., 1949. Antigen-antibody reaction in gels. Ark. Kemi. Miner. Geol., 26-b, 14.
- OUCHTERLONY, D., 1958. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: S. KARGER, Progress in allergy, New York, 5:1-78.
- OUCHTERLONY, D., 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: S. KARGER, Progress in allergy. New York, 6:30-154.
- PEPYS, J e JOAN L. LONGBOTTON, 1967. Immunological methods in mycology. In WEIR, D.M.ed. Handbook of experimental immunology , p.813-843.
- SACCARDO, P.A., 1884. Ascochyta Lib. Sylloge Fung, 3:384-404.
- SACCARDO, P.A., 1892. Ascochyta Lib. Sylloge Fung, 10:295-308.
- SCHIEBER, E., 1964. Principales enfermedades de frijol en Guatemala. Fitotec, Latinoam, 1:85-94.
- SEELIGER, H.P.R., 1968. Serology as an aid to taxonomy. In: AINSWORTH, G.C. e A.SUSSMAN, ed. The Fungi. London, 3: 597-624.
- SHATTOCK, P.M.F., 1955. The use of serology in the classification of micro-organisms. J.Gen. Microbiol., 12: 367-374.
- SHAW, GARDNER C., 1965. Taxonomic concepts as applied to the fungi. Phytopathology, 55: 819-821.
- STEWART, R.B., 1957. Leaf blight and stem die-back of Coffea caused by an undescribed species of Ascochyta.
- SUMMERS, D.F. ; A.P. GROLLMAN e H.F. HASENCLEVER, 1963. Polysaccharides antigens of Candida cell wall. J. Immun., 40:1816-1825.
- SUTTON, B.C. e J.M. WATERSTON, 1966. Ascochyta phaseolorum CMI Descr. Pathog. Fungi & Bact., Set 9, n° 81.
- SYDOW, H. e E.J. BUTLER, 1916. Fungi India Orientalis -Pars V Ann. Mycol., 14: 177-220.

- TASTALDI, H., 1960. Práticas de química biológica . 1ª parte, Bioquímica analítica qualitativa. 5ª ed. Universidade de São Paulo, 117 p.
- TEMPEL, A., 1959. Serologisch onderzoek bij F.oxysporum. Meded-Landb Hoogeschool, Wageningen, 59:1-60.
- TERANISHI, J., e M. BARRETO FIGUEIREDO, 1968. Podridões em frutos e hastes de berinjela (Solanum melongena L.) causadas por Ascochyta phaseolorum Sacc. Biologico, 34:206-208.
- THOMPSON, G.E., 1953. A comparison of Ascochyta abelmoschi Harter and Ascochyta gossypii Sidow, in culture and inoculation experiments. Phytopathology, 43: 293-294.
- VIEGAS, A.P., 1945. Alguns fungos do Brasil, XI Fungi Imperfecti (Sphaeropsidales) Bragantia, 5: 717-779.
- WEIMER, J.L., 1951. Ascochyta canker of blue lupine. Pl. Dis. Repr, 35: 81-82.
- WHELLER, H.E.; C.H. DRIVER e C. CAMPA, 1959. Cross and self-fertilization in Glomerella. Amer. J. Bot., 46: 361-365.
- WIMALAJEEWA, O.L.S. e J.E. DE VAY, 1971. The occurrence and characterization of common antigen relationship between Ustilago maydis and Zea mays. Physiol. Pl. Path., 1:523-535.
- WRIGHT, N.S. e STACE-SMITH, 1966. A comparison of the sensitivity of serological tests for plant viruses and other antigens. Phytopathology, 56: 944-948.
- WILCOX, HAZEL W. e G.K.K. LINK, 1935. Serically active (Haptenic) carbohydrates of genotypes of Neurospora tetrasperma and N.sitophyla. Phytopathology, 25: 39.