

JOSÉ FARIAS DA MATA
Engenheiro Agrônomo
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

**PRESERVAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE
DE CLAMIDOSPOROS DE *Ustilago scitaminea***

Orientador: Dr. Hasime Tokeshi

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Piracicaba — São Paulo — Brasil
1975

ÍNDICE

	Página
DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Generalidades	2
2.2. Preservação e Viabilidade em <u>Ustilago</u> spp	2
2.3. Preservação e Viabilidade em <u>U. scitaminea</u>	3
2.4. Fisiologia dos Clamidosporos e Aspectos Morfológicos de sua Germinação	4
2.5. Aspectos Bioquímicos na Germinação de Clamidosporos	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Coletas e Beneficiamento dos Clamidosporos	7
3.1.1. Procedência do material	7
3.1.2. Secagem dos chicotes	7
3.1.3. Beneficiamento dos clamidosporos	8
3.2. Testes de Germinação dos Clamidosporos Utilizados em Todos os Experimentos	8
3.3. Métodos Utilizados na Preservação de Viabilidade dos clamidosporos	8
3.3.1. Preservação em dessecadores com sílica gel a diferentes temperaturas	9
3.3.2. Preservação dos clamidosporos por liofilização e armazenamento à temperatura ambiente	9
3.3.3. Preservação de clamidosporos em nitrogênio líquido	10
3.4. Efeito de Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Processos de Preservação na Percentagem de Germinação dos Clamidosporos	11
3.5. Influência dos Fatores: Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Idade dos Meios de Culturas nas Percentagens de Germinação	12
3.6. Elongação de Promicélios de Clamidosporos recém colhidos comparados aos de material preservado	13
3.7. Efeito da Localização dos Clamidosporos no Chicote , na Viabilidade e Armazenamento	13

3.8. Clamidosporos de Chicotes Envolto pelo "Cartucho Foliar"	14
3.9. Efeitos de Agentes Químicos na Germinação dos clamidosporos	14
a) Teste com bactericidas	14
b) Teste com carboidratos	15
c) Teste com aminoácidos	15
d) Teste com vitaminas	16
3.10. Efeitos de Agentes Físicos na Germinação dos Clamidosporos	17
a) Efeito do contato direto do nitrogênio líquido na germinação dos clamidosporos	17
b) Ação do vácuo parcial na germinação dos clamidosporos	17
c) Ação do choque térmico na quebra de dormência dos clamidosporos	18
3.11. Métodos Estatísticos e Transformações Usados nas Análises dos Experimentos	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Métodos Utilizados na Preservação de Viabilidade dos Clamidosporos	19
4.1.1. Preservação de clamidosporos em dessecadores contendo sílica gel submetidos a diferentes temperaturas	19
4.1.2. Preservação de clamidosporos por liofilização e temperatura ambiente	20
4.1.3. Preservação de clamidosporos em nitrogênio líquido	22
4.2. Efeito de Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Processos de Preservação na Percentagem de Germinação dos Clamidosporos	23
4.3. Influência dos Fatores: Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Idade do Meio de Cultura na Percentagem de Germinação	26
4.4. Elongação do Promicélio dos Clamidosporos recém colhidos comparados aos de Material Preservado	27
4.5. Efeito de Localização dos Clamidosporos no Chicote, na Viabilidade e Armazenamento	28
4.6. Clamidosporos de Chicotes Envolto pelo "Cartucho Foliar"	29

	Página
4.7. Agentes Químicos na Percentagem de Germinação dos Clamidosporos	30
4.8. Agentes Físicos na Percentagem de Germinação dos Clamidosporos	35
5. DISCUSSÃO	38
5.1. Generalidades	38
5.2. Métodos de Preservação na Viabilidade dos Clamidosporos	39
5.2.1. Preservação em dessecadores com sílica gel a diferentes temperaturas	39
5.2.2. Preservação por liofilização e temperatura ambiente	40
5.2.3. Preservação de clamidosporos em nitrogênio líquido	42
5.3. Efeito de Horas de Incubação e Idade dos Clamidosporos	42
5.4. Influência de Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Idade do Meio de Cultura na Germinação.	43
5.5. Elongação de Promicélios dos Clamidosporos Recém Colhidos Comparados aos de Material Preservado	43
5.6. Efeito de Localização dos Clamidosporos no Chicote na Viabilidade e Armazenamento	44
5.7. Clamidosporos Envolto pelo Cartucho Foliar	44
5.8. Efeito de Agentes Químicos na Germinação dos Clamidosporos	45
5.8.1. Testes com bactericidas	45
5.8.2. Testes com carboidratos	45
5.8.3. Testes com aminoácidos	46
5.8.4. Testes com vitaminas	47
5.9. Agentes Físicos na Germinação dos Clamidosporos	47
6. CONCLUSÕES	49
7. RESUMO	51
8. ABSTRACT	53
9. BIBLIOGRAFIA	55
APÊNDICES	58

DEDICATÓRIA

À minha esposa Arlene
e
às minhas filhas: Tânia
Josilene
Sandra
Dione Vanila
Margarônia,

dedico.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos:

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, principalmente ao Prof. Dr. Hasime Tokeshi, pela sua valiosíssima orientação;

ao Departamento de Zootecnia da ESALQ pelo empréstimo do equipamento de nitrogênio líquido;

ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelo fornecimento de nitrogênio líquido;

ao Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida" pelos trabalhos de liofilização realizados;

ao Prof. Saulo Assis P. Melo, da Escola de Agronomia do Nordeste, U.F. Pb., por substituir o autor em suas atividades quando da realização do curso;

aos colegas: Álvaro Sanguino, Wilson Marcelo da Silva, Alonso K. Dodson, Vismar da Costa Lima Neto, Peri Veiga, Léo Pires Ferreira e Marcos Antonio No-guez, pela aquisição de material, numerosas sugestões e valiosos estímulos.

1. INTRODUÇÃO

A lavoura canavieira, pela sua elevada expressão econômica como sustentáculo de uma indústria que dia a dia se expande, carreando divisas para o Brasil e projetando-o no cenário mundial como produtor máximo, é fator indiscutível na propulsão do nosso progresso.

A cana-de-açúcar está sujeita a uma série de doenças importantes destacando-se entre outras, o carvão, a podridão vermelha, a podridão abacaxi, o mosaico e o raquitismo. Não obstante, o carvão da cana-de-açúcar, causado pelo fungo Ustilago scitaminea Sydow, assume uma importância especial em face da legislação vigente no Estado de São Paulo proibindo o uso de variedades suscetíveis. O trabalho dos melhoristas, no afã de conseguirem variedades resistentes ao carvão, sofre soluções de continuidade em certas épocas do ano dado a escassez de inóculo para os testes de patogenicidade.

O objetivo principal do presente trabalho visa preservar a viabilidade dos esporos de U. scitaminea pelo período de pelo menos um ano proporcionando estoque do inóculo para os trabalhos de melhoramento e ainda contribuir com numerosas informações sobre a biologia dos clamidosporos do fungo em apreço, quais sejam: germinação, horas necessárias à incubação, influência da idade dos esporos, idade do substrato, alongação de promicélios em esporos jovens e preservados, localização de clamidosporos no chicote, clamidosporos envolvidos pelo cartucho foliar, efeito de agentes químicos na germinação, e finalmente, o efeito de agentes físicos na germinação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Generalidades

Os métodos de preservação dos microrganismos são bastante numerosos e a maneira de classificá-los tem variado entre os autores. FENNEL (12) agrupa-os em transferências periódicas, cobertura com óleo mineral, cultura em solo ou areia, secagem, congelamento e liofilização. MARTIN (26) concorda com FENNEL, entretanto ONIONS (30) agrupa os métodos de preservação de fungos em microcultivo e em suspensão do metabolismo. Em microcultivo ter-se-iam os métodos de transferências, cultivos em tubos, armazenamento a diferentes temperaturas, armazenamento em óleo mineral e armazenamento no solo, enquanto que na suspensão do metabolismo seria a dessecação, a liofilização e armazenamento em nitrogênio líquido.

Vários outros pesquisadores têm agrupado os diferentes métodos conforme suas próprias conveniências, sem chegarem a um denominador comum, quais sejam: CLARK e LOEGERING (8), TUIE (38), RAPER e ALEXANDER (33), BAKERSPIGEL (4), HASKINS e ANASTASIOU (19), MEYER (28), BAGGA (3), LEATH, ROMIG e ROWELL (22), WESS e OTEIFA (41), WELLMAN e WALDEN (42).

2.2. Preservação e Viabilidade em Ustilago spp

Em espécies de Ustilago, TAPKE (37) reportou uma curta viabilidade de U. nuda armazenado a temperatura ambiente, em contra partida um pronunciado aumento de viabilidade ocorria quando os esporos eram armazenados entre 28 e 30°F (-2,22 e -1,11°C) pois a viabilidade nessas condições atingia períodos de 1 a 10 anos, com germinação acima de 73% até os 7 anos de armazenamento. PORTER (32) sugere que U. nuda tenha permanecido viável por 11 anos no embrião de semente de cevada. GERA e VASHISTER (14) experimentaram manter esporos de U. nuda tritici viáveis às temperaturas de 0, 5, 10, 20, 30 e 35°C tendo obtido resultados satisfatórios com as três primeiras temperaturas propor -

cionando nos 270 dias 45,6%, 43,5% e 31,7%. Espécimens de herbários examinados por FISCHER (13) revelaram esporos viáveis de U. hordei por 23 anos, U. avenae por 13 anos e U. bromivora por 10 anos. SAMPSON (34) encontrou esporos de U. levis com viabilidade por 2,5 anos e algumas amostras alcançaram até 5,5 anos, entretanto o autor não mencionou as percentagens de germinação após esses períodos. Observou ainda o mesmo autor, que esporos de U. avenae têm maior viabilidade que os de U. levis. SAMPSON preservou os fungos em dessecadores controlando a umidade relativa com soluções de H₂SO₄.

Um recorde sem par na longevidade de clamidosporos foi obtido por WANG (40) com U. cromeri, uma viabilidade aos 62 anos. KONDO (21) manteve por um ano as raças 6 e 7 de U. avenae liofilizadas e observou que logo após a liofilização a germinação dos esporos era inferior à dos esporos não liofilizadas, porém, essa situação se invertia após 12 meses. Esse autor concluiu que esporos liofilizados e mantidos a 5°C e a -15°C apresentam maior viabilidade que os liofilizados e mantidos à temperatura ambiente. A raça 6 mostrou maior viabilidade que a raça 7.

Culturas de U. avenae e U. kolleri foram mantidas por GRASSO (17) durante 35 meses em frascos fechados sem perderem a viabilidade. PERKINS (31) afirma que tipos mutantes e selvagens de U. maydis podem ser preservados em tubos contendo sílica gel e opina que esse método é mais conveniente e menos dispendioso que a liofilização.

2.3. Preservação e Viabilidade em U. scitaminea

FAWCETT (11) comprovou com bases experimentais que clamidosporos de U. scitaminea morrem dentro de poucos meses no solo. HIRSCHHORN (20) relata que a viabilidade dos clamidosporos geralmente se perde entre os 9 e 10 meses, porém quando mantidos secos e a baixas temperaturas a viabilidade se prolonga por 12 meses ou mais.

Mais recentemente, LEU (23) publicou um trabalho (1972) no qual enfoca a manutenção de clamidosporos de U. scitaminea viáveis por período superior a quatro anos, em condições secas e com percentagens de germinação até 92%.

2.4. Fisiologia dos Clamidosporos e Aspectos Morfológicos de sua Germinação

As variações no comportamento fisiológico da germinação dos clamidosporos das espécies de Ustilago tem sido observada pelos autores. DAVIS (9), trabalhando com U. striaeformis, concluiu que os clamidosporos recém colhidos apresentam baixa germinação porque são, fisiologicamente, imaturos, necessitando de um período de pós maturação de 180 a 265 dias. O mesmo observou SAM- PSON (34) para U. avenae, porém esse autor não estabeleceu o período de imaturação fisiológica. Por outro lado, estudando as características fisiológicas de U. scitaminea, HIRSCHHORN (20) estabeleceu uma correlação direta entre a velocidade de germinação dos clamidosporos e a idade dos mesmos, concluindo que esporos jovens germinam entre 4 e 5 horas enquanto clamidosporos de 5 a 6 meses retardam a germinação por 24 horas.

A morfologia da germinação de U. scitaminea foi estudada por HIRSCHHORN (20) em 1950 e confirmada por BOCK (5) em 1964, os quais consideram três tipos básicos de germinação dos clamidosporos: no primeiro deles, do tubo germinativo ou promicélio originam-se apenas esporídios; um segundo tipo de cujo promicélio desenvolvem-se hifas de infecção, e um terceiro tipo de cujo promicélio originam-se esporídios gigantes, mas, segundo a própria autora, aspectos bioquímicos e biofísicos como acúmulo de glicose no meio de cultivo a temperaturas de 12 a 15°C na incubação concorrem para a transformação do terceiro tipo em esporídios normais. BOCK (5) afirma que em condições naturais os clamidosporos de U. scitaminea por não encontrarem condições ótimas o promicélio dá origem diretamente as hifas de infecção. O aparecimento desta está correlacionada ainda com a temperatura da incubação, pois enquanto incubação dos clamidosporos a 24°C ou abaixo mesmo após 6 horas nenhuma hifa de infecção foi ob-

servada, a 31°C durante 2 horas já havia substancial número de hifas de infecção.

A elongação do promicélio é reportado por ANTOINE (1) como sendo em média 16 μ .

2.5. Aspectos Bioquímicos na Germinação de Clamidosporos

Na germinação de U. zeae a análise cromatográfica revelou, segundo DE VAY, ROWELL e STACKMAN (10), a presença de aminoácidos livres e a síntese de carboidratos. GRAHAM (16) fez observações em U. tritici sobre o efeito do meio de cultivo na germinação dos clamidosporos e concluiu que o nitrogênio orgânico é prejudicial à germinação enquanto que carboidratos, notadamente sacarose, a elevam. Influências de fontes de carbono e de nitrogênio no crescimento do micélio de U. nuda tritici foram estudados por SEN e MUNJAL (36) os quais relatam exigências muito baixas desses nutrientes, porém indispensáveis. WOLF (43) estudou 4 culturas monospóricas de U. zeae em meios sintéticos contendo fontes de carbono e de nitrogênio. Entre os carboidratos usados por WOLF, a glucose, levulose, manose, sacarose, maltose e trehalose mostraram-se os mais eficientes. U. zeae utiliza nitrogênio em forma de nitrato, amônia e aminas. Dos 23 aminoácidos testados por WOLF, pouco ou nenhum crescimento foi obtido com cistinas, cisteínas, tirosina e hidroxiprolina, ao passo que ácido aspártico, asparagina e serinas aumentaram a percentagem de germinação.

Para U. scitaminea, testes efetuados por SAXENA e KHAN (35) revelaram que clamidosporos frescos procedentes de diferentes localidades da Índia incubados em diferentes fontes de carbono apresentavam respostas variáveis na germinação tanto na procedência como nas fontes de carbono. Concluíram os autores que tais variações eram de natureza genética. HIRSCHHORN (20) relata que o acúmulo de glicose no meio de cultivo combinado com temperaturas de 12 a 15°C na incubação concorrem para a formação de esporídios normais em detrimento de esporídios gigantes. BOCK (5) concorda com HIRSCHHORN, e testando a a-

ção de fontes de carbono em U. scitaminea utilizou sacarose, mannose e lactose em concentrações de 5 a 10%. Afirma o autor que substratos ricos induzem a formação de esporídios.

Os efeitos das vitaminas parecem pouco explorados nos Ustilaginales. Na literatura encontramos apenas ligeira referência de GRAHAM (16) que apesar de trabalhar com U. tritici afirma que vitaminas do complexo B são necessários para muitas espécies de carvões.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho usaram-se clamidosporos de U. scitaminea Sydow, coletados em diferentes épocas e locais conforme exposição abaixo:

3.1. Coletas e Beneficiamento dos Clamidosporos

3.1.1. Procedências do material

a) De Porecatu, PR, coletados em canas da variedade CP 52-1 em duas épocas: 28/09 e 16/11/1972.

b) De Jacareí, SP, coletados em canas da variedade CP 52-1 em 23/07/73.

c) Da ESALQ, Piracicaba-SP, em canas plantadas nas estufas do Departamento de Fitopatologia, de uma mistura de variedades, em três diferentes épocas: 25/09/1972; 11/02/1973 e 06/02/1974.

3.1.2. Secagem dos chicotes

O material coletado nas estufas da ESALQ destinado a trabalhos de acertos metodológicos não foi seco. Os materiais de Porecatu e Jacareí, coletados em épocas chuvosas foram submetidos a uma secagem prévia espalhando-se os chicotes à sombra, em laboratório por três dias antes do beneficiamento dos clamidosporos. Uma porção da partida coletada em Porecatu em 16/11/1972 foi seca com auxílio de desumificador de ambiente durante três dias até o beneficiamento.

3.1.3. Beneficiamento dos clamidosporos

Secos os chicotes, estes foram raspados e peneirados numa série de tamizes de 20 a 200 malhas/pol².

A fração que passou pela última peneira, constituída praticamente de clamidosporos, foi guardada em saquinhos de papel semipermeável em dessecadoras contendo sílica gel, para trabalhos posteriores.

3.2. Testes de Germinação dos Clamidosporos Utilizados em Todos os Experimentos

Após o beneficiamento, os clamidosporos eram germinados em meio de agar água a 2% P/v e determinadas as percentagens dos clamidosporos viáveis nas seguintes condições: eram suspensas 10 mg de clamidosporos em 10 ml d'água, e desta suspensão pipetava-se 0,1 ml em placa de Petri em meio de agar água, espalhando-se com alça de Drigalsky. As placas eram incubadas após seis horas à temperatura de 30°C. Findo esse tempo eram adicionadas algumas gotas de azul de lactofenol para matar e colorir os clamidosporos germinados. As leituras eram efetuadas diretamente nas placas contando-se 500 clamidosporos germinados ou não, em diferentes campos do microscópio, e desta contagem, calculada a percentagem de germinação.

3.3. Métodos utilizados na Preservação de Viabilidade dos Clamidosporos

Entre os vários métodos de preservação de microrganismos citados na literatura (38), optou-se pelos seguintes:

3.3.1. Preservação em dessecadores com sílica gel a diferentes temperaturas.

Os clamidosporos foram guardados em pequenos envelopes de papel semipermeável contendo 200 mg por invólucro. Estes invólucros foram postos em frascos de boca larga transformados em dessecadores, com sílica gel. Foram preparados três conjuntos desses frascos e mantidos em três ambientes:

- a) Congelador horizontal à temperatura de -10°C .
- b) Geladeira doméstica à temperatura de cerca de 5°C .
- c) Ambiente de laboratório, variando à temperatura de 15 a 28°C .

Os três conjuntos mencionados foram preparados no dia 06/12/1972 e constavam de clamidosporos coletados em Porecatu em 16/11/72, cujos chicotes haviam sido secos ao natural e ao desumificador. Inicialmente, procedeu-se a um teste de germinação desses clamidosporos (06/12/72), e a partir de então, todos os meses esses testes foram repetidos obedecendo-se os mesmos critérios, até dezembro de 1973. A partir do teste de germinação inicial até o último mês de observação os resultados forneceram elementos que permitiram várias análises de variância. Neste teste como em todos os outros apresentados nesta dissertação os delineamentos inteiramente casualizados foram utilizados e os resultados estão no quadro II.

3.3.2. Preservação dos clamidosporos por liofilização e armazenamento à temperatura ambiente

Dos clamidosporos de Porecatu coletados em 16/11/72, aliquotas de 500 mg foram colocadas em frascos escuros de 16 ml, providas de duas tampas de plástico, a interna fechando-se sob pressão, a outra munida de roscas. De clamidosporos secos ao natural e dos secos ao desumificador foram preparados 36 frascos dos quais 18 foram mantidos à temperatura ambiente, enquanto os outros 18 foram liofilizados nos laboratórios do Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme

Rocha de Almeida", da ESALQ. Na liofilização empregada não se usou nenhum meio de suspensão para os clamidosporos tal como fez KONDO (21) para teliosporos de Ustilago avenae. O aparelho liofilizador utilizado foi de marca Virtis, modelo 10145 MR-TR. Em linhas gerais, a técnica de liofilização consistiu de uma prévia congelação dos clamidosporos a -20°C durante 24 horas, permanecendo os frascos sem tampas, dentro de uma bandeja, num congelador horizontal. Findo esse período, a bandeja foi levada ao liofilizador congelado a -45°C por 2 horas, submetido ao vácuo de $200 \mu\text{Hg}$ por 45 minutos e a seguir aquecido por sublimação até 45°C . Completada a liofilização o vácuo foi quebrado com nitrogênio e os frascos imediatamente fechados em ambiente de nitrogênio evitando-se a entrada de umidade.

Após a liofilização os frascos foram mantidos à temperatura ambiente.

Em 06/12/72 foi feito um teste de germinação desses clamidosporos liofilizados como ponto de partida na preservação por esse processo, e daí por diante, mensalmente os testes foram repetidos para determinar a viabilidade dos clamidosporos, até o mês de dezembro de 1973. O experimento tinha 4 tratamentos e 10 repetições, e os resultados encontram-se no quadro III.

3.3.3. Preservação de clamidosporos em nitrogênio líquido

Clamidosporos de Jacareí, SP, após o beneficiamento e determinação de percentagem de germinação foram submetidos ao tratamento com nitrogênio líquido em ampolas de vidro com 30 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno. As ampolas foram previamente lavadas e esterilizadas e em cada uma postas 200 mg de clamidosporos, foi feito um vácuo parcial e fechado com maçarico. As ampolas aqui utilizadas foram feitas pelo autor no Departamento de Fitopatologia, da ESALQ. A fim de detectar ampolas mal seladas, estas foram submetidas a um banho numa solução de corante, azul de lactofenol a 4°C por 30 minutos, segundo técnica de LOEGERING, HARMON e CLARK (25). Um conjunto dessas ampolas permaneceu em temperatura ambiente enquanto outro foi posto em um "canister" e

este levado a um congelador a -10°C durante duas horas, para ser em seguida levado ao nitrogênio líquido. Este congelamento prévio é recomendado por BROMFIELD e SCHMIT (7) e tem por fim evitar o congelamento ultra rápido dos clamidosporos, que segundo MAZUR (27) é prejudicial a certas células.

O armazenamento das ampolas em nitrogênio líquido foi feito em um boião para preservação de semen, marca MVE, modelo R.1500 com capacidade para 42 litros. Semanalmente foi feita a reposição do nitrogênio líquido sendo gastos em média 6 litros para manutenção do nível de nitrogênio para que as ampolas permanecessem sempre imersas à temperatura de -196°C .

Seis dias após o tratamento com nitrogênio líquido foi retirada uma ampola do boião e imediatamente submetida a um banho de água morna a 40°C por 2 minutos para quebrar a dormência fisiológica dos clamidosporos segundo GOOS, DAVIS e BUTTERFIELD (15); BROMFIELD e SCHMITT (7); LOEGERING e HARMON (24) e BROMFIELD (6). As ampolas mantidas à temperatura ambiente foram usadas como controle. Toda a metodologia usada nos testes de germinação foi usada aqui e repetindo aos 42, 74, 101 e 120 dias. O experimento constou de dois tratamentos e dez repetições e os resultados encontram-se no quadro IV.

3.4. Efeito de Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Processos de Preservação na Percentagem de Germinação dos Clamidosporos

Este teste teve como objetivo determinar o tempo ideal de incubação dos clamidosporos para se obter o máximo de germinação à temperatura de 30°C . O método utilizado foi o do item 3.2. onde os esporos semeados em agar água permaneceram em incubação por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 horas, findos tais períodos determinavam-se as percentagens de germinação. Os testes foram realizados três vezes tendo cada um deles 10 repetições sendo computadas as médias dos resultados. Vários testes semelhantes foram conduzidos com os clamidosporos preservados pelos diferentes processos, usando-se porém até 8

horas de incubação dada a impossibilidade de fazer leituras após esse período. Com os clamidosporos preservados pelos diferentes processos o teste foi feito no início e no final da preservação conforme mostram os quadros de V a VIII.

3.5. Influência dos Fatores: Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Idade dos Meios de Culturas nas Percentagens de Germinação

O presente teste teve por objetivo determinar que influências teriam as idades dos clamidosporos e dos meios de cultivo na germinação em diferentes horas de incubação. O agar e a água destilada utilizados no preparo dos diversos meios provinham dos mesmos estoques, ambos em quantidades suficientes para os três meios de cultura preparados em diferentes ocasiões, sendo assim denominados.

Mn - meio novo, preparado nas vésperas do ensaio.

M1 - meio com uma semana.

M2 - meio com duas semanas.

Os clamidosporos de mesma origem foram coletados em duas diferentes épocas e assim denominados:

Cn - clamidosporos novos colhidos nas vésperas do ensaio.

Cv - clamidosporos velhos, com 139 dias, mantidos em dessecadores com sílica gel à temperatura ambiente.

O tempo de incubação dos clamidosporos foi de 1, 2, 3 e 4 horas a 30°C. O experimento tinha 6 tratamentos e 4 repetições e os resultados estão no quadro IX.

3.6. Elongação de Promicélios de Clamidosporos recém colhidos comparados aos de material preservado

Com o objetivo de determinar a importância da idade dos clamidosporos no vigor do promicélio testaram-se clamidosporos recém colhidos com clamidosporos preservados pelos diferentes métodos. Os clamidosporos foram incubados em meio agar agar 2% a 30°C por 6 horas, os promicélios foram mortos com lactofenol e os seus comprimentos foram medidos. Em cada placa foram medidos 10 promicélios perfazendo um total de 30 promicélios por tratamento. De cada tratamento considerou-se o menor e o maior promicélio, observados como o mínimo e o máximo, e como termo médio considerou-se a média dos 30 promicélios medidos. O experimento constou de 13 tratamentos e 3 repetições abrangendo todos os métodos de preservação utilizados no trabalho. Os resultados encontram-se no quadro X.

3.7. Efeito da Localização dos Clamidosporos no Chicote, na Viabilidade e Armazenamento

Esta determinação foi realizada visando-se encontrar a região do chicote que melhores clamidosporos produzem. Para isso, foram selecionados vários chicotes, todos com o máximo possível de uniformidade, medindo 50 cm de comprimento e a seguir seccionadas a partir da base em porções de 10 cm cada uma e denominados:

- a) Basal - 0 a 10 cm
- b) Sobrebasal - de 10 aos 20 cm
- c) Mediana - de 20 aos 30 cm
- d) Subapical - de 30 ao 40 cm
- e) Apical - de 40 aos 50 cm

Clamidosporos oriundos de cada região supra citados, mantidos em dessecadores com sílica gel à temperatura ambiente foram testados em duas diferen-

tes ocasiões. O experimento constou de 5 tratamentos e quatro repetições e os resultados são apresentados no quadro XI.

3.8. Clamidosporos de Chicotes Envolto pelo "Cartucho Foliar"

O objetivo desse teste foi determinar a viabilidade de clamidosporos contidos em chicotes ainda envolvidos pelas duas últimas folhas apicais que daqui por diante serão denominadas "cartucho foliar". Para isso alguns chicotes com essa condição foram selecionados e os clamidosporos foram comparados aos de chicotes desprotegidos pelo "cartucho foliar". O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 12 repetições e os resultados encontram-se no quadro XII.

3.9. Efeitos de Agentes Químicos na Germinação dos Clamidosporos

Com o objetivo de determinar o efeito de alguns agentes químicos na germinação dos clamidosporos testaram-se bactericidas, carboidratos, aminoácidos e vitaminas; adicionados ao meio agar água.

a) Teste com bactericidas

Testaram-se seis bactericidas em forma de discos impregnados, conforme a técnica de VICENT & VICENT (39) modificada por MORLEY (29). Os bactericidas usados foram adquiridos no comércio com os seguintes nomes: gentamicina 10 mcg, macrodantina (nitrofurantoina 100 mcg), pantomicina (eritromicina 15 mcg), kantrex 30 (sulfato de kamamycina 30 mcg), wintomylon (ácido nalidixico 30 mcg) e penbritin (ampicilina 25 mcg).

Em cada placa de Petri, após a distribuição dos clamidosporos em meio agar água, foram colocados cinco discos, incubando os clamidosporos por seis horas a 30°C. Os clamidosporos estavam guardados em sílica gel a temperatura

ambiente há 30 dias. Para exame da germinação, os discos foram removidos e os campos de observação nos sítios correspondentes. O experimento constou de 7 tratamentos e 3 repetições e os resultados estão no quadro XIII.

b) Teste com carboidratos

Neste experimento foram usados dez carboidratos dos quais preparam-se soluções aquosas, esterilizadas por filtração, na base de 10 g de açúcar para 1 litro d'água. Estas soluções foram empregadas no preparo dos meios agar água de modo a formar no final a concentração de 3 g por litro de meio. Os glucídios usados foram arabinose, xilose, glicose, frutose, manose, galactose, maltose, celobiose, lactose e sacarose. O controle recebeu água estéril em adição ao meio agar água. Os clamidosporos usados neste experimento foram propositalmente escolhidos com baixa germinação (17,2%) armazenados há 14 meses em sílica gel à temperatura ambiente (15 a 28°C). O experimento possuía 11 tratamentos e 4 repetições. Os resultados encontram-se no quadro XIV.

c) Teste com aminoácidos

Foram ensaiados 16 aminoácidos com o fim de determinar a influência destas sobre a germinação dos clamidosporos. Seguiu-se a técnica de AZEVEDO, NEDER e COSTA (2) e as soluções aquosas dos aminoácidos foram preparadas de forma a dar no final uma concentração de 1 g de cada aminoácido por litro de meio agar água. À testemunha adicionou-se água estéril ao meio agar água. Os aminoácidos usados e o modo como foram distribuídos nos meios agar água encontram-se no quadro I.

Quadro I. Código dos tratamentos usados nos testes de ação de aminoácidos na germinação de clamidosporos de U. scitaminea

Tratamentos	Aminoácidos
A	Ácido glutâmico + histidina + glicina + prolina
B	Fenilalanina + glicina + isoleucina + leucina
C	Cistina + valina + leucina + triptofano
D	Metionina + prolina + treonina + triptofano
E	Ácido aspártico + ácido glutâmico + arginina + cisteína
F	Arginina + lisina + isoleucina + treonina
G	Testemunha (sem aminoácidos)
H	Cisteína + histidina + lisina + valina
I	Ácido aspártico + cisteína + fenilalanina + metionina

Como se procedeu nos carboidratos, os clamidosporos usados foram propositalmente escolhidos os de baixa germinação, preservados por 14 meses em sílica gel à temperatura ambiente. O experimento tinha 9 tratamentos e 4 repetições e os resultados estão no quadro XV.

d) Teste com vitaminas

Objetivando-se determinar a influência de vitaminas na germinação dos clamidosporos três delas foram testadas: nicotinamida, riboflavina e biotina. As soluções aquosas de vitaminas foram preparadas nas seguintes concentrações: nicotinamida 0,008 g/l; riboflavina 0,05 g/l e biotina 1 g/l. Aliquotas de 0,1 ml foram adicionadas às placas de Petri com 20 ml de meio de agar água (Bacto-agar Difco sem vitaminas) antes de solidificar, e mais tarde semeados com clamidosporos com baixo poder germinativo preservados há 14 meses em sílica gel à temperatura ambiente (15 a 28°C). O experimento tinha 4 tratamentos e 9 repetições, sendo os resultados apresentados no quadro XVI.

3.10. Efeitos de Agentes Físicos na Germinação dos Clamidosporos

Para conhecimento da influência de agentes físicos na germinação dos clamidosporos testaram-se os efeitos de contato direto do nitrogênio líquido com os clamidosporos, ação do vácuo parcial na germinação e ação do choque térmico na quebra de dormência fisiológica dos clamidosporos.

a) Efeito do contato direto do nitrogênio líquido na germinação dos clamidosporos.

Por ocasião das determinações de viabilidade dos clamidosporos preservados, o contato físico direto do nitrogênio sobre os clamidosporos pode ser acidentalmente avaliado em virtude de ter sido encontrada uma ampola quebrada imersa no nitrogênio líquido. Os clamidosporos foram incubados em meio agar água em comparação com aqueles contidos em ampolas íntegras mantidas em nitrogênio líquido. Este procedimento apesar de acidental teve a finalidade de indicar se as ampolas quebradas dentro de boião de nitrogênio líquido deveriam ser aproveitadas ou rejeitadas. O experimento constava de 2 tratamentos e 10 repetições, sendo os resultados apresentados no quadro XVII.

b) Ação do vácuo parcial na germinação dos clamidosporos

A fim de determinar a influência do vácuo na germinação de clamidosporos foram comparadas as percentagens de germinação de clamidosporos mantidos por 6 dias em ampolas em três condições distintas: ampolas com vácuo mantidas a -196°C , ampolas com vácuo mantidas à temperatura ambiente (15 a 28°C) e ampolas sem vácuo mantidas à temperatura ambiente.

O vácuo foi feito a 760 ml/Hg por 2 minutos. Este experimento constou de 3 tratamentos e 10 repetições e os resultados estão no quadro XVIII.

c) Ação do choque térmico na quebra de dormência dos clamidosporos

Segundo os autores GOOS, DAVIS e BUTTERFIELD (15), BROMFIELD e SCHMITT (7), LOEGERING e HARMON (24) e BROMFIELD (6), esporos de diferentes espécies de fungos quando congelados à temperatura de nitrogênio líquido, necessitam de uma rápida elevação de temperatura (choque térmico) para evitar perda de germinação. Para verificar a veracidade dessa afirmativa aos clamidosporos de U. scitaminea foi realizado um experimento no qual dois lotes de clamidosporos foram retirados do nitrogênio líquido, um deles foi submetido, por dois minutos a um banho térmico a 40°C, enquanto o outro não o recebeu.

O experimento constou de 2 tratamentos e 10 repetições e os resultados encontram-se no quadro XIX.

3.11. Métodos Estatísticos e Transformações Usados nas Análises dos Experimentos

Em todos os experimentos os delineamentos experimentais foram inteiramente casualizados e em virtude dos dados serem expressos em percentagens em todas as análises estatísticas os dados foram transformados em $\text{arc. sen } \sqrt{\text{percentagens}}$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 1 e 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Métodos Utilizados na Preservação de Viabilidade dos Clamidosporos

4.1.1. Preservação de clamidosporos em dessecadores contendo sílica gel submetidos a diferentes temperaturas.

Os resultados de percentagens de germinação demonstrando a viabilidade dos clamidosporos preservados em dessecadores às temperaturas de -10° , 5° e 15 a 28°C encontram-se no quadro II, e nos apêndices 1, 2 e 3.

Quadro II. Percentagens de germinação dos clamidosporos de *U. scitaminea* preservados em dessecadores, durante 12 meses, de armazenamento a diferentes temperaturas.

Meses	Preservação Sílica Gel *		
	Congelador -10°C	Geladeira 5°C	Ambiente $15 - 28^{\circ}\text{C}$
0	90,90 a	90,90 a	90,90 a
1	90,12 a	89,90 ab	88,58 a
2	89,22 ab	91,06 ab	86,38 ab
3	89,44 ab	89,32 ab	79,92 bc
4	89,20 ab	89,92 ab	74,96 bc
5	86,44 abc	90,72 ab	73,98 c
6	84,90 bc	92,04 ab	57,28 d
7	84,50 c	92,20 ab	52,64 de
8	66,40 d	88,66 ab	43,04 ef
9	65,40 d	88,14 ab	38,68 ef
10	56,22 e	88,04 ab	37,88 f
11	52,82 e	88,06 ab	17,97 g
12	53,22 e	86,72 b	18,76 g
CV	3,86%	2,67%	9,24%

* Média de 10 repetições

Piracicaba 1973

Médias com mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

A análise de variância mostrou F altamente significativo entre clamidosporos preservados as três diferentes temperaturas a partir do segundo mês. Neste período, os clamidosporos mantidos à temperatura ambiente (15 - 28°C) começaram a declinar em viabilidade ao nível de 1% de probabilidade e a partir do quinto mês os clamidosporos preservados em congelador (-10°C) começaram a declinar significativamente ao nível de 1% em relação aos mantidos em geladeira (5°C).

4.1.2. Preservação de clamidosporos por liofilização e armazenamento à temperatura ambiente.

Os resultados das percentagens de germinação dos clamidosporos preservados por liofilização e armazenados à temperatura ambiente e seus respectivos controles encontram-se no quadro III e no apêndice 4, 5, 6, 7.

Quadro III. Percentagens de germinação dos clamidosporos de *U. scitaminea* secos ao natural ou ao desumificador, liofilizados ou não e guardados à temperatura ambiente durante 12 meses

Meses	S E C A G E M			
	Natural		Ao Desumificador	
	Liofil.*	Não Liofil. **	Liofil.	Não Liofil.
0	91,56 a***	90,90 a	92,76 a	93,00 a
1	92,48 a	91,64 a	91,00 ab	92,06 ab
2	89,26 b	86,38 ab	87,36 bc	88,72 bc
3	83,84 c	86,66 ab	85,34 c	88,26 bc
4	83,06 c	86,06 ab	86,52 c	87,44 c
5	81,18 cd	86,68 ab	84,00 c	69,06 d
6	78,64 de	86,48 ab	75,54 d	52,72 e
7	77,26 e	83,26 b	77,46 d	39,68 f
8	76,36 e	83,78 b	77,40 d	38,86 f
9	70,20 f	69,84 c	62,74 e	39,42 f
10	45,86 g	37,80 d	45,86 f	38,34 f
11	11,32 h	2,35 e	41,28 f	28,74 g
12	6,20 i	0,66 f	32,26 g	22,68 h
CV	2,35%	7,07%	4,27%	4,68%

* liofilizados

Piracicaba, 1973.

** não liofilizados

*** os dados representam médias de 10 repetições

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si

Os efeitos dos tratamentos apresentaram resultados variáveis durante os testes sem que nenhuma causa aparente fosse detectada.

4.1.3. Preservação de clamidosporos em nitrogênio líquido

Os resultados das percentagens de germinação dos clamidosporos preservados à temperatura ultra baixa com emprego do nitrogênio líquido estão representados no quadro IV e apêndice 8 e 9.

Quadro IV. Percentagens de germinação dos clamidosporos de U. scitaminea preservados em nitrogênio líquido durante 120 dias comparados com os mantidos à temperatura ambiente.

D i a s *	T r a t a m e n t o s	
	Com Nitrogênio.	Sem Nitrogênio
0	71,56 **	71,56 a
6	68,84 a	66,80 b
42	71,48 a	52,74 c
74	70,85 a	30,90 d
101	69,72 a	28,50 e
120	69,00 a	27,02 e
CV	2,82%	1,59%

* Data do início dos testes: 28/08/1973

** Os números representam médias de 10 repetições

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si

4.2. Efeito de Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Processos de Preservação na Percentagem de Germinação dos Clamidosporos

Os resultados referentes aos efeitos das horas de incubação na germinação dos clamidosporos recém colhidos são apresentados no quadro V.

Quadro V. Efeito de horas de incubação de clamidosporos de U. scitaminea na percentagem de germinação dos clamidosporos recém colhidos.

Horas de Incubação	Médias de Germinação *
0	00,00
1	44,24
2	51,73
3	78,46
4	82,73
5	92,59
6	92,30
7	93,63
8	92,33
9	-
10	-
11	-
12	-

* dados representam médias de 3 experimentos com 10 repetições. A partir de 9 horas devido ao emaranhado de promicélio os dados não foram computados.

Os resultados dos efeitos dos dias de preservação, horas de incubação e temperatura de armazenamento na percentagem de germinação dos clamidosporos guardados em dessecadores com sílica gel são apresentados no quadro VI.

Quadro VI. Efeito de dias de preservação, horas de incubação e temperatura de armazenamento na percentagem de germinação de clamidosporos de U. scitaminea guardados em dessecadores.

Épocas das Determinações	Horas de Incubação	Secagem Natural e Preservação em Dessecadores com Sílica Gel		
		Congelador	Geladiera	Ambiente
		-10°C	5°C	15 - 28° C
40 dias de preservação	0	0,00*	0,00	0,00
	1	56,40	58,33	64,63
	2	80,33	76,73	83,20
	3	83,80	82,20	82,66
	4	90,20	83,00	83,13
	5	90,00	83,33	89,86
	6	91,00	88,73	89,86
	7	91,20	89,20	89,86
	8	90,40	92,00	91,60
385 dias de preservação	0	0,00	0,00	0,00
	1	0,00	0,35	0,00
	2	12,25	13,55	6,00
	3	33,40	64,70	10,30
	4	49,50	78,30	16,30
	5	50,20	86,15	17,90
	6	51,90	85,70	18,60
	7	52,15	85,20	18,55
	8	51,90	85,55	18,75

* os dados representam médias de 10 repetições

Os resultados dos testes para avaliar a ação da idade dos clamidosporos horas de incubação, métodos de secagem e preservação por liofilização na percentagem de germinação são apresentados no quadro VII.

Quadro VII. Percentagens de germinação de clamidosporos de *U. scitaminea* em diferentes horas de incubação, secos ao natural e ao desumificador, preservados por liofilização e não liofilizados

Épocas de Determinações	Horas de Incubação	S e c a g e m			
		Natural		Ao Desumificador	
		Liofil. *	N/Liofil.**	Liofil.	Não Liofil.
48 dias após liofilização	0	0,00 ***	0,00	0,00	0,00
	1	56,60	57,30	39,40	44,80
	2	78,20	75,00	72,50	75,00
	3	81,75	80,00	79,80	80,00
	4	85,00	82,50	84,45	83,50
	5	84,00	86,70	90,80	90,70
	6	93,05	96,50	91,10	90,00
	7	95,95	96,40	95,75	92,35
	8	96,15	95,90	97,40	94,50
393 dias após liofilização	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	1	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,00	0,00	10,95	10,00
	4	1,30	0,75	15,40	20,95
	5	3,60	0,75	32,40	20,97
	6	5,25	0,80	31,70	21,00
	7	6,20	0,80	31,80	21,20
	8	6,75	0,90	31,80	21,50

* liofilizado

** não liofilizado

*** os dados representam médias de 10 repetições

Os resultados do ensaio para medir a influência do nitrogênio líquido na rapidez e percentagem de germinação de clamidosporos congelados por 120 dias são apresentados no quadro VIII em comparação com clamidosporos guardados no ambiente em condições equivalentes.

Quadro VIII. Ação do nitrogênio líquido na rapidez e percentagens de germinação dos clamidosporos de U. scitaminea, após 120 dias de congelamento comparados com clamidosporos guardados no ambiente.

Horas de Incubação	P r e s e r v a ç ã o	
	Nitrogênio Líquido	Ambiente
0	0,00*	0,00
1	0,00	0,00
2	7,65	0,00
3	27,45	0,60
4	67,80	4,85
5	69,54	17,50
6	69,90	26,60
7	69,35	26,40
8	69,75	26,60

* os dados representam médias de 10 repetições

4.3. Influência dos Fatores: Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Idade do Meio de Cultura na Percentagem de Germinação

Os resultados desse experimento acham-se no quadro IX.

Quadro IX. Avaliação da Influência das Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Idade dos Meios de Cultivo na Percentagem de Germinação dos Clamidosporos de U. scitaminea

Tratamentos *	Horas de Incubação			
	1	2	3	4
Mn Cn	33,04**	49,55	93,55	94,35
Mn Cv	0,10	12,60	58,75	64,05
M1 Cn	36,00	46,25	88,80	92,25
M1 Cv	1,85	13,20	58,10	67,05
M2 Cn	31,80	47,25	90,65	94,55
M2 Cv	0,12	9,75	55,45	67,20

* - Mn, M1, M2 representam meio novo (feito na véspera do ensaio), meio de uma semana e meio de duas semanas, enquanto Cn e Cv representam clamidosporos novos (colhidos na véspera do ensaio), e clamidosporos velhos com 139 dias, guardados em dessecadores com sílica gel à temperatura ambiente

** - Os dados representam médias de 10 repetições

4.4. Elongação do Promicélio dos Clamidosporos recém colhidos comparados aos de Material Preservado

Os resultados deste experimento são apresentados no quadro X e abrangem todos os métodos de preservação utilizados no trabalho

Quadro X. Comprimentos de Promicélios de *U. scitaminea* de material recém colhido comparados aos de material seco e preservado por diferentes processos

Preservação	Idade (dias)	Secagem	Comprimento de Promicélios		
			Mínimo (μ)	Máximo (μ)	Média* (μ)
Recém colhidos	0	-	15,95	23,33	18,75
Sílica gel, 15-28°C	396	natural	5,47	18,09	11,19
		desumif.**	4,52	13,80	7,88
Sílica gel a 5°C	396	natural	13,57	16,66	14,26
		desumif.	10,95	15,71	13,35
Sílica gel a -10°C	396	natural	8,33	15,47	11,76
		desumif.	9,52	17,85	13,13
Liofilização	383	natural	2,38	16,19	9,78
		desumif.	4,76	18,57	12,07
Não liofilizados	383	natural	3,09	16,42	7,91
		desumif.	9,28	16,42	12,00
Nitrogênio líquido	131	natural	11,90	16,19	13,81
Sem Nitrogênio líquido	131	natural	4,76	16,42	12,46

* médias de 30 promicélios por cada tratamento medidos ao acaso

** desumificador de ambiente

4.5. Efeito de Localização dos Clamidosporos no Chicote, na Viabilidade e Armazenamento

Os resultados deste experimento encontram-se no quadro XI expressos em percentagens de germinação.

Quadro XI. Percentagens de germinação dos clamidosporos de U. scitaminea de diferentes regiões do chicote, recém colhidos, e após 98 dias de preservação em dessecadores à temperatura ambiente.

Regiões do chicote cm	Preservação em dias	
	0	98
Basal (0 - 10)	81,40*	62,20
Sobrebasal (10 - 20)	86,81	88,90
Mediana (20 - 30)	89,79	87,05
Subapical (30 - 40)	84,63	70,75
Apical (40 - 50)	64,66	59,75

* Os dados representam médias de 4 repetições

4.6. Clamidosporos de Chicotes Envolto pelo "Cartucho Foliar"

Os resultados desse experimento encontram-se no quadro XII e o coeficiente de variação foi 4,16%. O teste F não teve valor significativo

Quadro XII. Percentagens de germinação de clamidosporos de U. scitaminea de chicotes envoltos pelo "cartucho foliar", comparados aos de chicotes desprotegidos.

Repetições	Chicotes	
	Envoltos	Não Envoltos
1	88,30*	90,70
2	92,60	95,00
3	90,70	94,60
4	96,10	94,80
5	96,00	90,40
6	90,00	87,70
7	94,60	90,50
8	97,20	90,00
9	93,40	92,80
10	92,30	90,00
11	95,00	90,00
12	96,30	96,80
Médias	93,54 ^a	91,94 ^a

* Os dados representam médias de 12 repetições.

Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente

CV = 4,16%

4.7. Agentes Químicos na Percentagem de Germinação dos Clamidosporos

Os resultados dos experimentos com agentes químicos: bactericidas, carboidratos, aminoácidos e vitaminas encontram-se na respectiva ordem nos quadros XIII, XIV, XV e XVI.

Quadro XIII. Efeito de bactericidas na percentagem de germinação dos clamidosporos de U. scitaminea com 30 dias de preservação em dessecadores à temperatura ambiente

Tratamentos	Repetições			Médias	Estímulo na Germinação %
	1	2	3		
Gentamicina	92,90	87,90	92,30	91,03a	12,99
Nitrofurantoina	91,00	91,20	87,50	89,90a	11,71
Eritromicina	88,70	84,20	83,30	85,40a	6,07
Kanamycina	81,80	88,00	85,40	85,06a	5,58
Ácido nalidíxico	83,60	86,30	81,00	83,63a	3,81
Testemunha	86,90	87,00	67,80	80,56a	0,00
Ampicilina	3,50	3,80	5,70	4,33b	-94,63

Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si
CV = 5,93%

A análise dos dados transformados em $\ar. \text{sen } \sqrt{\%}$ revelou F significativo ao nível de 1%. O teste de Tukey foi significativo ao nível de 1% e apenas a ampicilina, diferiu nos demais tratamentos. O coeficiente de variação foi de 5,93%.

Quadro XIV. Efeito de carboidratos na percentagem de germinação dos clamidosporos de *U. scitaminea*, preservados em dessecadores à temperatura ambiente por 14 meses.

Tratamentos	R E P E T I Ç Õ E S				Médias	Estímulo na Germinação %
	1	2	3	4		
Sacarose	40,00	38,80	38,00	39,20	39,00a	126,75
Glucose	37,60	36,40	36,80	37,20	37,00a	115,11
Maltose	34,80	30,80	33,60	31,90	32,70b	90,11
Frutose	30,20	30,60	31,20	31,60	30,90bc	79,65
Galactose	31,80	30,40	31,00	30,40	30,90bc	79,65
Celobiose	30,00	29,60	29,80	28,40	29,45cd	71,22
Manose	26,40	28,20	28,20	28,00	27,70fd	61,04
Arabinose	25,60	25,60	26,00	24,00	25,30fe	47,09
Lactose	21,20	20,60	21,80	21,20	21,20gf	23,25
Xilose	18,80	18,40	19,20	20,00	19,10g	11,04
Testemunha	15,80	18,20	17,00	17,80	17,20h	0,00

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

CV = 1,81%

A análise da variância dos dados transformados em $\text{arc. sen } \sqrt{\%}$ revelou F altamente significativo. As médias com letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey e o coeficiente de variação foi 1,81 %

Quadro XV. Efeito de aminoácidos na percentagem de germinação dos clamidospóros de *U. scitaminea* preservados em dessecadores à temperatura ambiente por 14 meses.

Tratamentos*	R e p e t i ç õ e s				Médias**	Estímulo na Germinação %
	1	2	3	4		
A	24,80	23,20	25,60	24,40	24,50a	42,44
B	24,40	24,80	24,40	23,20	24,20ab	40,69
C	24,60	22,80	21,80	25,20	23,60ab	37,20
D	17,20	19,60	18,40	19,00	18,55abc	7,84
E	17,60	18,80	18,80	18,40	18,40bc	6,97
F	18,40	16,80	17,60	17,20	17,50c	1,74
G	16,50	18,20	17,10	17,00	17,20c	0,00
H	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00d	-
I	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00d	-

CV = 2,81%

(*) Os tratamentos são:

A - Ácido glutâmico, histidina, glicina e prolina

B - fenilalanina, glicina, isoleucina e leucina

C - cistina, valina, leucina e triptofano

D - metionina, prolina, treonina e triptofano

E - ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina e cistina

F - arginina, lisina, isoleucina e treonina

G - controle agar água

H - cisteína, histidina, lisina e valina

I - ácido aspártico, cisteína, fenilalanina e metionina

(**) Médias com mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na análise estatística o teste F foi significativo ao nível 1% de probabilidade. Aplicou-se o teste de Tukey em todos os contrastes possíveis ao nível de 1% de probabilidades. O coeficiente de variação do experimento foi 2,81%.

Quadro XVI. Efeito de vitaminas na percentagem de germinação dos clamidospóros de *U. scitaminea* preservados em dessecadores à temperatura ambiente por 14 meses

Repetições	T r a t a m e n t o s			
	Nicotinamida	Riboflavina	Controle	Biotina
1	30,00	28,00	16,90	17,00
2	29,40	29,00	18,30	18,40
3	31,00	27,60	16,40	15,20
4	29,80	29,20	16,70	15,20
5	30,00	27,20	16,60	17,60
6	30,00	28,20	17,00	16,70
7	28,70	27,80	16,90	18,10
8	29,90	28,60	17,00	15,60
9	31,40	28,30	17,20	16,60
Médias	30,04a	28,21b	17,00c	16,71c
Estímulo na Germinação %	76,70%	65,94%	0,00%	-1,71%

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.
CV = 2,12%

A análise da variância revelou F altamente significativo. Pelo teste de Tukey, excetuando-se o contraste das médias referentes ao controle e a biotina que não diferiram significativamente, todos os outros contrastes foram significativos ao nível de 1%. O coeficiente de variação desse experimento foi 2,12%.

4.8. Agentes Físicos na Percentagem de Germinação dos Clamidosporos

Os resultados referentes ao contato físico direto do nitrogênio líquido com os clamidosporos, vácuo parcial e choque térmico na germinação estão nos quadros XVII, XVIII e XIX.

Quadro XVII. Ação do contato físico de nitrogênio líquido com clamidosporos de U. scitaminea

Repetições	Protegido	Desprotegido
1	77,20	67,60
2	65,60	70,80
3	70,00	65,80
4	67,60	65,40
5	67,60	66,20
6	66,00	61,80
7	70,80	71,40
8	67,60	70,40
9	71,60	65,40
10	73,20	66,80
Médias	69,72a	67,16a

As médias não diferiram estatisticamente
CV = 3,7%

Na análise da variância o teste F não foi significativo e o coeficiente de variação foi 3,7%.

Quadro XVIII. Ação do vácuo na germinação dos clamidosporos de U. scitaminea armazenados em ampolas com e sem vácuo a diferentes temperaturas por 6 dias

Repetições	T r a t a m e n t o s		
	Com Vácuo		Sem Vácuo
	Temp. - 196°C	Temp. Ambiente	Temp. Ambiente
1	67,40	65,00	73,60
2	67,40	67,60	73,80
3	71,40	69,20	62,60
4	64,20	65,40	67,20
5	73,80	64,80	67,40
6	68,80	64,80	69,20
7	70,60	62,40	69,60
8	66,00	70,40	68,40
9	74,00	61,80	66,60
10	64,80	73,00	72,80
Médias	68,84a	66,44a	69,12a

As médias com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si.
CV = 4,6%.

Na análise da variância o teste F não foi significativo. O coeficiente de variação do experimento foi 4,6%.

Quadro XIX. Efeito do choque térmico de 40°C por dois minutos na quebra de dormência dos clamidosporos de *U. scitaminea* preservados em nitrogênio líquido.

Repetições	Clamidosporos	
	Com Choque Térmico	Sem Choque Térmico
1	72,40	74,20
2	76,00	73,20
3	75,40	76,00
4	78,00	67,60
5	76,80	69,60
6	75,80	71,60
7	77,80	72,20
8	76,80	72,20
9	76,40	72,60
10	74,60	71,60
Médias	76,00a	72,08b
Estímulo na germinação %	5,43%	

As médias diferiram entre si ao nível de 1% de probabilidade
CV = 6,13%

A análise da variância dos dados transformados em $\text{arc. sen } \sqrt{\frac{y}{100}}$, deu um valor de F significativo a 1%. A diferença entre médias, pelo teste de Tukey, foi significativo ao nível de 1%. O coeficiente de variação do experimento foi 6,13%.

5. DISCUSSÃO

5.1. Generalidades

A produção de variedades de cana resistentes a U. scitaminea não pode ser conduzida sem um constante e adequado suprimento de inóculo de fungo. As pesquisas realizadas tornaram possíveis o armazenamento e testes de germinação dos clamidosporos em condições constantes, solucionando o problema de preservação e disponibilidade de inóculo durante pelo menos um ano.

A escolha de um substrato pobre (agar água) para a germinação dos clamidosporos foi teoricamente baseado nos seguintes pontos:

a) O substrato agar água retardando o crescimento de organismos com possível ação fungistática permitiria uma melhor avaliação da viabilidade dos esporos.

b) A avaliação dos efeitos de açúcares, aminoácidos, vitaminas e fatores físico-químicos na germinação só seria exequível em meios carentes destes compostos.

c) A simplicidade e constância do substrato de germinação possibilitaria coletar dados reproduzíveis.

Os resultados obtidos em todos os ensaios indicaram ausência de ação inibidora dos organismos contaminantes, fungos e bactérias. Nas condições dos testes o exame dos coeficientes de variação de todos os experimentos indicam erros experimentais muito baixos demonstrando que a escolha do substrato foi adequada e que as condições experimentais eram constantes.

5.2. Métodos de Preservação na Viabilidade dos Clamidosporos

Com respeito aos diferentes métodos de preservação dos clamidosporos as discussões serão feitas por partes a saber.

5.2.1. Preservação em sílica gel

Conforme resultados do quadro II, no decorrer dos 12 meses de preservação os clamidosporos mantidos à temperatura ambiente tiveram sua viabilidade afetada ao 4º, 6º, 9º e 11º meses; os clamidosporos mantidos a 5°C não reduziram significativamente sua viabilidade durante os 11 primeiros meses sendo apresentado um declínio significativo aos 12 meses, enquanto isso a germinação dos clamidosporos conservados a -10°C declinaram ao 5º, 6º, 7º, 8º e 10º meses porém menos sensivelmente que aqueles preservados à temperatura ambiente (15 - 28°C).

Comparando-se as três condições de temperatura nas quais os clamidosporos foram mantidos há uma diferença significativa a partir do segundo mês onde os clamidosporos armazenados à temperatura ambiente mostram-se menos viáveis que aqueles guardados a 5°C, entretanto os mantidos a -10°C não diferiram significativamente dos preservados à temperatura ambiente nem dos mantidos a 5°C. Aos 3º e 4º meses, a queda de viabilidade foi cada vez mais marcante nos clamidosporos guardados no ambiente, enquanto nenhuma diferença significativa ocorreria entre os armazenados a 5º e -10°C. Neste último, só a partir do 5º mês houve um declínio sensível na germinação dos clamidosporos.

Clamidosporos de U. scitaminea preservados por LEU (23) em condições idênticas apresentam resultados semelhantes para aqueles mantidos a 5°C durante 12 meses, porém para os esporos mantidos à temperatura ambiente os dados do trabalho são discordantes. Aos resultados obtidos por LEU (23) pesadas críticas podem recair sobre a metodologia usada para os testes de germinação dos clamidosporos.

LEU distribuiu cinco gotas de uma suspensão de clamidosporos, cada uma contendo 40 clamidosporos em placas de Petri com agar 3%. As gotas foram postas separadamente porém o autor não as espalhou no meio, o que torna a leitura impossível de ser realizada, conforme se procurou repetir a experiência nos laboratórios da ESALQ. LEU efetuou as leituras de percentagens de germinação após a incubação de 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. Experimentos preliminares já haviam indicado a impossibilidade de leituras além das 8 horas de incubação. Experimentos em idênticas condições foram mais uma vez repetidos confirmando improcedências de leituras por tão longo período de incubação. BOOK (5) e HIRSCHHORN (20) também demonstraram germinação e formação de hifas e esporídias em tempos menores que 8 horas e isto dificulta observação de germinação.

Dados contraditórios são apresentados no trabalho de LEU na tabela 3 na página 42, com relação aos esporos secos à temperatura ambiente. As percentagens de germinação que iniciaram a 97,8% gradativamente decresceram atingindo no 5º e 7º meses percentagens de 34,0 e 36,3; inexplicavelmente estas percentagens sobem no 9º e 12º meses para 81,7% e 83,3%. Fato semelhante ocorrera com os clamidosporos preservados secos à temperatura de 5°C. Clamidosporos que no 3º mês tinha 72,9% de germinação passam para 21,3% no 4º mês e subitamente sobem para 83,4% no 5º mês. Acreditamos que os dados de LEU estão comprometidos devido às faltas dos testes de germinação e mudança de critério de avaliação, visto que duas pessoas conduziram os testes no decorrer dos experimentos.

5.2.2. Preservação por liofilização

O exame global da preservação dos clamidosporos por liofilização usado neste teste conforme pode ser visto no quadro III, mostrou que as vantagens apresentadas pelos diferentes tratamentos não foram constantes variando seus efeitos com os meses em que se fez as comparações. Assim das duas diferentes maneiras pelas quais os clamidosporos foram secos, e das duas condições de preservação, aqueles secos ao desumificador e liofilizados foram a partir do 3º mês menos viáveis que os clamidosporos secos ao desumificador e não liofilizados.

zados. Ao 4º mês o declínio só foi significativo para os clamidosporos secos ao natural e liofilizados. Aos 5, 7, 8 e 10 meses, os clamidosporos liofilizados, independentemente de como foram secos, comportaram-se igualmente, havendo entretanto diferenças significativas aos 6, 9, 11 e 12 meses. No final de 12 meses de preservação os clamidosporos secos ao natural apresentaram um acentuado declínio de viabilidade, 6,2% para os liofilizados e 0,66% para os não liofilizados. A viabilidade dos clamidosporos secos ao desumificador foi bem superior a dos clamidosporos que foram secos ao natural, no final dos 12 meses 32,26% para os liofilizados e 22,68% para os não liofilizados. Este facto parece indicar uma influência benéfica da retirada rápida da água do interior dos clamidosporos, mas se de fato isto é verdade, só o foi aos 11 e 12 meses de preservação, posto que antes desse período os clamidosporos liofilizados previamente submetidos às duas diferentes secagens tiveram comportamento semelhante. Na maioria das vezes os clamidosporos não liofilizados tanto os secos ao natural como os secos ao desumificador comportaram-se de um modo semelhante com respeito a sua viabilidade até o 4º mês quando começou acentuado declínio na germinação dos clamidosporos secos ao desumificador dos 5 aos 9 meses, quando aos 10 meses deu-se novo equilíbrio para em seguida a viabilidade dos clamidosporos secos ao desumificador ultrapassar a viabilidade daqueles secos ao natural. O fato é que os resultados forneceram dados difíceis de serem interpretados HASKING (18) e qualquer afirmativa poderia ser precipitada até que outros estudos mais detalhados possam dar maior clareza.

Não obstante, os resultados do presente trabalho comparados aos obtidos por KONDO (21) para U. zeeae são idênticos para os clamidosporos secos ao desumificador e liofilizados porém bastante superiores para os não liofilizados que tiveram a mesma secagem. Por outro lado, os clamidosporos de U. scitami - nea que receberam secagem natural e foram liofilizados comportaram-se diferentemente dos estudados por KONDO (21) tendo uma reduzida percentagem de germinação.

5.2.3. Preservação de clamidosporos em nitrogênio líquido

Como mostram os resultados do quadro IV, a preservação de clamidosporos durante 120 dias em temperatura ultra-baixa de -196°C , em nada afetou a viabilidade, enquanto que o declínio da viabilidade foi acentuadamente progressivo para os clamidosporos mantidos em ampolas sob vácuo parcial à temperatura ambiente. Por motivos alheios aos objetivos deste trabalho só foi possível a preservação dos clamidosporos em nitrogênio líquido por 120 dias. A exequibilidade desse método de preservação por longo tempo é suportada por MAZUR (27), pois segundo este autor uma célula ou organismo poderá manter-se viável por longo tempo à temperatura de -196°C , desde que ele seja capaz de resistir ao impacto de ultra resfriamento por 10 minutos e o reaquecimento à temperatura inicial. Clamidosporos de U. scitaminea resistiram muito bem a todas essas condições. Onde houver facilidades na aquisição de equipamentos e de nitrogênio líquido, este método deve ser explorado pois tem possibilidade de permitir preservação por tempo mais longo que o da geladeira. Acreditamos ser este um dos métodos que permitiriam preservar a viabilidade de clamidosporos por 10 ou mais anos.

5.3. Efeito de Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Processos de Preservação na Germinação

O período de incubação de clamidosporos jovens a 30°C comparado ao de clamidosporos velhos preservados por um ano em diferentes processos revela, conforme nos mostram os quadros VI e VII, uma maior rapidez na germinação de clamidosporos jovens que nos clamidosporos velhos. Dentro de 3 a 5 horas os clamidosporos jovens atingem a percentagem máxima de germinação enquanto que os clamidosporos com mais de um ano de preservação pelos diferentes processos só alcançam um máximo de germinação após 5 horas. Estes dados concordam com os de HIRSCHHORN (20) que considera positiva a correlação entre a rapidez de germinação e a idade dos clamidosporos e harmonizam-se com os obtidos por

BOCK (5) o qual estabeleceu o período de 2 horas à temperatura de 31°C para produção de hifas de infecção de U. scitaminea. O fato de clamidosporos velhos serem retardatários na germinação deve-se provavelmente a uma dormência fisiológica. Em nenhuma situação foi possível a realização de leituras por um período acima de 8 horas de incubação, discordando do trabalho de LEU (23) que menciona leituras de até 72 horas. Acima de 8 horas de incubação (quadro v) há um emaranhado de promicélios e esporídias e uma pronta perda de individualidade impossibilitando as observações.

5.4. Influência de Horas de Incubação, Idade dos Clamidosporos e Idade do Meio de Cultura na Germinação

A interação dos fatores horas de incubação, idade dos clamidosporos e idade do meio de cultura conforme resultados do quadro IX comprovam mais uma vez a rapidez da germinação dos clamidosporos jovens em relação aos clamidosporos velhos e demonstram que a idade dos meios de cultivo preparados até duas semanas antes não influem na germinação dos clamidosporos. Como o período de duas semanas é relativamente curto, julgamos serem estes dados de valor limitado para a avaliação do problema.

5.5. Elongação de Promicélios dos Clamidosporos Recem Colhidos Comparados aos de Material Preservados

O comprimento dos promicélios parece sem dúvida correlacionar-se positivamente com o vigor dos clamidosporos. Clamidosporos recém colhidos mostraram no quadro X promicélios mais longos que aqueles clamidosporos preservados pelos diferentes métodos. O comprimento médio do promicélio de U. scitaminea, segundo ANTOINE (1), é de 16 μ e no presente trabalho os clamidosporos recém colhidos tiveram um promicélio médio de 18,75 μ , porém os promicélios de clamidosporos preservados foram inferiores àquela média citada por ANTOINE. Dos clamidosporos preservados pelos diferentes processos alguns que receberam se-

agem natural apresentaram promicélios maiores que aqueles secos ao desumifi-
cador porém noutros casos ocorrera o contrário, parecendo não ter influência
na elongação de promicélios o modo pelo qual a água foi retirada do clamidospo-
ro.

5.6. Efeito de Localização dos Clamidosporos no Chicote na Viabilidade e Armazenamento

Os resultados do quadro XI mostrando as percentagens de germinação dos clamidosporos nas diferentes regiões do chicote tanto em material recém colhido como em material preservado por 98 dias demonstram uma superioridade na germinação dos clamidosporos da região mediana sobre os demais, principalmente em relação à região apical do chicote. A baixa percentagem de germinação dos clamidosporos da região apical do chicote deve ser explicada pela presença de contaminantes e por maior tempo de exposição dos clamidosporos às condições adversas.

5.7. Clamidosporos Envolto pelo "Cartucho Foliar"

Uma relativamente alta percentagem de germinação dos clamidosporos da região basal do chicote e os dados observados no quadro XII tornam evidente que clamidosporos de U. scitaminea não necessitam de período de pós maturação para uma boa germinação indicando que os esporos tão logo sejam colhidos estão prontos para germinar. Dados contraditórios foram encontrados por DAVIS (9) para algumas espécies de Ustilago, sobretudo para U. striaeformis e por SAMPSON (34) para U. avenae, que clamidosporos jovens são fisiologicamente imaturos.

5.8. Agentes Químicos na Germinação dos Clamidosporos

Excetuando-se o caso dos bactericidas, os estudos efetuados com carboidratos, aminoácidos e vitaminas tiveram como particularidade comum o uso de clamidosporos com baixa percentagem de germinação possibilitando desta forma avaliar o estímulo na germinação causado por cada um dos compostos que passaremos a discutir.

5.8.1. Efeito de bactericidas na germinação dos clamidosporos

Nas condições estudadas no presente trabalho o quadro XIII revela a ampicilina como único bactericida capaz de inibir a germinação dos clamidosporos de U. scitaminea, ocorrendo um declínio de 94,63% na percentagem de germinação em relação às testemunhas. Os demais bactericidas não foram significativamente diferentes pelo teste de Tukey, mesmo ao nível de 5% de probabilidade, não obstante, merece ser esclarecido que pequenos estímulos foram notados na germinação dos clamidosporos tratados com bactericida em relação à testemunha: gentomicina 12,99%; nitrofurantoina 11,71%; eritromicina 6,07%; Kanamycina 5,58% e ácido nolidixico 3,81%. Os resultados obtidos para os bactericidas não podem ser comparados com o de outros autores por não termos encontrado referência sobre o assunto em relação à espécie do gênero Ustilago.

5.8.2. Efeito de carboidratos na germinação dos clamidosporos

O quadro XIV revela os estímulos na germinação que os açúcares provocaram em relação à testemunha. Em ordem decrescente as percentagens de estímulo à germinação sobre o controle foram sacarose 126,75%; glucose 115,11%; maltose 90,11%; frutose 79,65%; galactose 79,65%; calbiose 71,22%; manose 61,04%; arabinose 47,09%; lactose 23,25% e finalmente xilose 11,04%, todos os glucídios estudados no presente trabalho foram superiores à testemunha ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, exceto a xilose que só o foi a

5%.

Os dados observados no presente trabalho concordam com a afirmativa de GRAHAM (16) na qual os carboidratos aumentam a percentagem de germinação de U. tritici, entretanto, esse autor não dispõe de dados experimentais comparáveis, pois em seus ensaios excetuando-se a sacarose, os demais carboidratos eram componentes de melaços, sem concentrações definidas. Comparando-se aos dados obtidos por SEN e MUNJAL (36) para U. nuda tritici, esses autores encontraram uma maior eficiência nas hexoses que nas pentoses enquanto os dissacarídeos maltose, sacarose e lactose não alteram a germinação dos clamidosporos. Em U. zeae, WOLF (43) reconhece a glucose, levulose, manose, sacarose, maltose e trehaloses como as melhores fontes de carbono. Tratando-se de U. scitaminea os resultados obtidos por SAXENA e KHAN (35) são extremamente variáveis entre as diversas fontes de carbono e a procedência dos clamidosporos, pelo que não é possível uma generalização de fatos.

5.8.3. Efeito de aminoácidos na germinação de clamidosporos

Face à metodologia empregada nos testes dos aminoácidos, estes só podem ser analisados e discutidos em grupos.

De acordo com o quadro XIV os aminoácidos contidos nos grupos A (ácido glutâmico, histidina, glicina e prolina); B (fenilalanina, glicina, isoleucina e leucina) e C (cistina, valina, leucina e triptofano) incrementaram a germinação dos clamidosporos a ponto de diferirem estatisticamente do controle agar água, a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. Os aumentos produzidos por estes três grupos em relação ao controle foram respectivamente de 42,44%; 40,69% e 37,20%. Do exame detalhado desses grupos sobressaem os efeitos da glicina nos grupos A e B e da leucina nos grupos B e C.

Os grupos D (metioninas, prolinas, treoninas e triptofano); E (ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina e cistina) e F (arginina, lisina, isoleucina e treonina) não diferiram estatisticamente do controle indicando que os

aminoácidos contidos nos grupos não alteram a capacidade germinativa dos clamidosporos de U. scitaminea. Os grupos H (cisteína, histidina, lisina e valina) e I (ácido aspártico, cisteína, fenilalanina e metionina) inibiram totalmente a germinação dos clamidosporos, aparentemente devido à cisteína, pois o único aminoácido presente nos dois grupos.

Os resultados obtidos por WOLF (43) para U. zeeae mostram que os aminoácidos ácido aspártico, asparagina e serina foram superior a outros aminoácidos e que a cisteína é ineficiente no estímulo à germinação, porém ação inibidora não foi por ele observada.

5.8.4. Efeito de vitaminas na germinação de clamidosporos

Na avaliação dos efeitos de algumas vitaminas na germinação dos clamidosporos, no quadro XV sobressaem os efeitos benéficos da nicotinamida e riboflavina aumentando a germinação em 76,70 e 65,94% respectivamente sobre o controle. Estatisticamente a nicotinamida e a riboflavina formam dois grupos de tratamentos diferentes do controle e biotinas, os quais formam o terceiro grupo. Vale a pena ressaltar que entre os compostos químicos estudados a sacarose, a glicina e a nicotinamida foram os que proporcionaram maiores incrementos na germinação. Os resultados obtidos com as vitaminas não puderam ser comparados com os de outros autores, é possível que sejamos os primeiros a observar o fato nesta espécie de fungo.

5.9. Agentes Físicos na Germinação dos Clamidosporos

O contato físico do nitrogênio líquido com os clamidosporos não afetou a germinação dos clamidosporos, quadro XVII. No presente caso, não sendo possível avaliar o tempo de permanência do contato físico dos clamidosporos com o nitrogênio líquido indicam necessidade de maiores estudos antes que ampolas quebradas sob o nitrogênio líquido possam ser usadas.

O vácuo não afetou a percentagem de germinação dos clamidosporos (quadro XVIII). Esta observação se fez oportuna para redimir dúvidas no caso de clamidosporos preservados por processos que exigem um prévio tratamento ao vácuo. A literatura é omissa sobre o caso em tela.

O choque térmico proporcionou um incremento na germinação dos clamidosporos de 5,43% em relação ao controle (quadro XIX). Estes resultados são suportados por GOOS, DAVIS e BUTTERFIELD (15), BROMFIELD e SCHMITT (?), LOEGERING e HARMON (24) e BROMFIELD (6) os quais afirmam que microrganismos ao serem congelados à temperatura de nitrogênio líquido e posteriormente ao serem incubados necessitam de uma brusca elevação de temperatura (choque térmico) para evitar perdas de germinação.

6. CONCLUSÕES

Os resultados que foram discutidos, o presente trabalho contém as seguintes conclusões:

Um método prático e econômico de preservar esporos de Ustilago scitami com alta viabilidade por um ano consiste em mantê-los em dessecadores com sílica gel, guardando-os em geladeiras à temperatura de 5°C. A preservação de clamidosporos por liofilização simples não parece

o uso de nitrogênio líquido na preservação de esporos de U. scitami não foi explorado por um período mais longo pois mantém o vigor dos clamidosporos. Apresenta alta perspectiva de sucesso, apesar do custo elevado do

o tempo de germinação dos clamidosporos está correlacionada com a idade dos mesmos. Quanto mais novos são os esporos mais rápida ocorre

o comprimento dos promicélios de clamidosporos recém colhidos apresentam-se mais longo e clamidosporos preservados pelos diferentes métodos havendo uma correlação positiva entre o vigor do esporo e o comprimento do promicélio.

f) Clamidosporos a serem usados em testes de patogenicidade nos trabalhos de melhoramento devem ser de preferência coletados quando envolvidos pelo "cartucho foliar", na parte mediana e basal dos chicotes pois esses clamidosporos apresentam as mais altas percentagens de germinação.

g) Excetuando-se a ampicilina que inibiu a germinação, os bactericidas: gentamicina, nitrofurantoina, eritromicina, kanamicina e ácido nalidíxico podem ser usados, no controle de bactérias contaminantes que possam inibir a germinação dos clamidosporos.

h) A germinação dos clamidosporos é estimulada em ordem decrescente pelos carboidratos: sacarose, glucose, maltose, frutose, galactose, celobiose, manose, arabinose, lactose e xilose; por grupos de aminoácidos, mormente aqueles contendo glicina e leucina e finalmente por vitaminas nicotinamida e riboflavina.

i) Dos agentes físicos estudados, o contato físico com o nitrogênio líquido e vácuo não afetaram a germinação dos clamidosporos, entretanto, o choque térmico aos 40°C é necessário para quebrar a dormência fisiológica dos esporos armazenados a -196°C.

7. RESUMO

Vários métodos de preservação de clamidosporos de Ustilago scitaminea Sydow foram investigados, simultaneamente, com os efeitos de diversos fatores que podem influir na percentagem e maneira de germinar de clamidosporos submetidos a condições ambientais diferentes.

Clamidosporos coletados em diferentes épocas dos anos de 1972 e 1973, e em diferentes localidades dos Estados de São Paulo e Paraná foram utilizados no estudo da viabilidade dos clamidosporos durante um período de 12 meses (120 dias para o nitrogênio líquido). Os métodos de preservação usados no estudo da viabilidade dos clamidosporos foram: a) preservação por dessecação com sílica gel a três temperaturas diferentes, laboratório (15 - 28°C), refrigerador (5°C) e congelador (-10°C); b) preservação por liofilização; c) preservação com nitrogênio líquido.

Informações básicas sobre o efeito de diversos fatores sobre a germinação dos clamidosporos foram obtidas. Estes experimentos incluíam tempo de incubação, idade dos clamidosporos, idade dos meios de cultivo, alongação do promicélio, localização dos clamidosporos no chicote, clamidosporos envoltos pelas folhas do "cartucho foliar", agentes químicos (bactericidas, carboidratos, aminoácidos e vitaminas) e agentes físicos (contato direto com nitrogênio líquido, vácuo, e choque térmico quebrando a dormência fisiológica dos clamidosporos.

Após 12 meses, os resultados mostraram alta viabilidade (86,72%) dos clamidosporos preservados em dessecadores com sílica gel a 5°C, baixa viabilidade (32,26%) nos liofilizados e com base na literatura consultada boa perspectiva para a preservação em nitrogênio líquido para períodos além de 12 meses.

Testes complementares revelam: a) que clamidosporos jovens são mais rápidos para germinarem que os esporos preservados além de um ano; b) que os

promicélios mais longos são dos clamidosporos jovens; c) que os clamidosporos de região mediana do chicote são mais viáveis; d) que chicotes envoltos pelo "cartucho foliar" possuem clamidosporos com alta viabilidade; e e) que clamidosporos U. scitaminea não apresenta nenhuma dormência fisiológica.

Bactericidas usados não afetaram a germinação dos clamidosporos exceto a ampicilina. Todos os carboidratos testados estimularam a germinação, o mesmo acontecendo com alguns aminoácidos, notadamente glicina e leucina enquanto que cisteína a inibiu totalmente. As vitaminas nicotinamida e riboflavina também estimularam a germinação.

O contato direto com o nitrogênio líquido e a ação do vácuo não afetaram a germinação dos clamidosporos, porém o choque térmico (banho aos 40°C por 2 minutos) estimulou a germinação.

8. ABSTRACT

Various methods of preservation of chlamydo spores of Ustilago scitami -- nea Stow, were investigated and concurrently the effects of several factors that could influence the percentage and manner of germination under different conditions of environment.

Chlamydo spores were collected at different periods during 1972 and 1973 in the States of São Paulo and Paraná were used to study viability of chlamydo spores over a 12 months period (120 days for liquid nitrogen). The preservation methods used to study chlamydo spores viability were: a) preservation by desiccation with silica gel at three different temperature, laboratory (15 - 28°C), refrigerator (5°C) and freezer (-10°C); b) preservation by lyophilization; c) preservation with liquid nitrogen.

Basic information about the effect of several factors upon chlamydo spores germination was obtained. These experiments included incubation time, chlamydo spores age, culture media age, promycelium elongation, location of chlamydo spores in whip like appendages, chlamydo spores protected by the spindle leaves, chemical agents (bactericide, carbohydrates, amino-acids and vitamins) and physical agents (direct contact with liquid nitrogen, vacuum, and thermal shock breaking physiological dormency of chlamydo spores).

After 12 months the chlamydo spores preserved in the desiccator with silica gel at 5°C had the highest viability (86,72%). The lowest viability (32,26%) was found in chlamydo spores preserved by lyophilization. On the bases of the literature chlamydo spores preservation with liquid nitrogen showed excellent possibility for more than 12 months storage period.

Complementary tests demonstrated: a) recently harvested chlamydo spores germinated earlier than one year old preserved chlamydo spores; b) fresh chlamydo spores have the longest promycelium; c) chlamydo spores from the middle area of whip like appendages have the highest viability; d) chlamydo-

pores from whip like appendages while protected by spindle leaves have high viability and e) U. scitaminea chlamydospores did not exhibit physiological dormency.

The bactericide did not effect the germination of chlamydospores except for ampicilin. All tested carbohydrates stimulated germination, the same happened with some ~~amino~~-acids especially glycine and leucine, while cysteine totally inhibited the process. The vitamins nicotinamide and riboflavin also stimulated germination.

Direct contact with liquid nitrogen and vacuun did not affect spore germination, however the thermal shock (bath at 40°C for 2 minutes) promoted germination.

9. BIBLIOGRAFIA

1. ANTOINE, R.S., IN MARTIN, J.P., E.V. ABBOT e C.G. HUGHES Sugar-cane diseases of the world. Amsterdam, Elsevier Publishing Co (ed) Vol. I: 542 p. 1961.
2. AZEVEDO, J.L. de, R.N. NEDER e S.O.P. COSTA. Curso de bioquímica geral. Experimentos de genética de microorganismo. Univ. Federal de Pernambuco. Instituto de Investigações Bioquímica da Faculdade de Medicina, Recife, PE. 1966.
3. BAGGA, H.S. Effect of sealed and unsealed containers on longevity of dried cultures of microorganisms. Plant Dis. Repr., 51:747-750, 1967
4. BAKERSPIGEL, A. Soil as storage medium for fungi. Mycologia, 46:596-604, 1953.
5. BOCK, K.R. Studies on Sugar-cane smut (Ustilago scitaminea) in Kenya. Trans. Brit. Mycol. Soc. 47(3):403-417, 1964.
6. BROMFIELD, K.R. Cold-induced dormancy and its reversal in uredospores of Puccinia graminis var. tritici. Phytopath., 54:68-74, 1964.
7. BROMFIELD, K.R. e C.G.SCHMITT. Criogenic storage of conidia of Peronospora tabacina. Phytopath., 57:1133, 1967
8. CLARK, W.A. e W.Q. LOEGERING. Functions and maintenance of a Type Culture Collection. Ann. Rev. Phytopath., 5:319-342, 1923.
9. DAVIS, W.H. Germination of the spores of timothy smut Ustilago striaeformis (Wested) Niessl. Phytopath. 13:38-39, 1923.
10. DE VAY, J.E., J.B. ROWELL and E. C. STACKMAN. Free aminoacids and carbohydrates synthesized by Ustilago zeae. Phytopath. 42:6, 1952.
11. FAWCETT, G.L. Notas sobre el "carbon" de la cana de azucar. Circ. Est. Exp. Agric. Tucuman 114, 1942.
12. FENNEL, DOROTHY I. Conservation of fungous cultures. Bot. Review, 26:79-141, 1960.
13. FISCHER, G. W. The longevity smut spores in herbarium specimens. Phytopath. 26:1118-1127, 1936.
14. GERA, S.D. e K.S. VASHISTER. Studies in Indian cereal smuts: IX Longevity of the spores of Ustilago nuda tritici Schaf. Indian Phytopath., 21: 447-449, 1968.

15. GOOS, R.D., E.E. DAVIS and W. BUTTERFIELD. Effect of Warming rates on the viability of frozen fungous spores. *Mycologia*, 59:58-67, 1967.
16. GRAHAM, O. Germination responses of Ustilago tritici teliospores in relation to lyophilization. II. Effects of the germinative medium on survival. *Mycol.*, 52:779-785, 1960.
17. GRASSO, V. Um método per la conservation delle culture dei carboni dell'avena. *Bool. Starz. Pat. Veg. Roma*, 14:67-70, 1957.
18. HASKINS, R.H. Factors affecting survival of lyophilized fungal spores and cells. *Can. J. Microbiol.* 3:477-485, 1957.
19. HASKINS, R.H. e J. ANASTASIOU. Comparisons of the survivals of *Aspergillus niger* spores lyophized by various methods. *Mycologia*, 45:523-532, 1953.
20. HIRSCHHORN, ELISA. Caracteres del ciclo evolutivo del carbon de la caña de azucar. *Rev. Invest. Agric.* 4(3):317-324, 1950.
21. KONDO, W. T. Effect of storage temperatures on the viability of liophized Ustilago avenae teliospores. *Phytopath.* 51:4-407, 1961.
22. LEATH, K.T., R.W. ROMIG e J.B. ROWELL. A system for storing rust spores in liquid nitrogen. *Phytopath.* 56:570, 1966.
23. LEU, LII-SIN. Culmicolous smut of sugar cane in taiwan III. Germination abda storage of teliospores, and compatibility of Ustilago scitaminea Sydow. *Sugarcane Pathologists Nowsletter* (1972) 9:16-17. (En) Taiwan Sugar Exp. STN. 1972.
24. LOEGERING, W.Q. and D.L. HARMON. Effect of thawing temperature on urediospores of Puccinia graminis f. sp. tritici frozen in liquid nitrogen. *Plant Dis. Repr.* 46:299-302, 1962.
25. LOEGERING, W.Q., D.L. HARMON e W.A. CLARK. Storage of urediospores of Puccinia graminis tritici in liquid nitrogen. *Plant Dis. Repr.* 50:502-506, 1956.
26. MARTIN, S.M. Conservation of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 18:16, 1964.
27. MAZUR, P. Survival of fungi after freezing and desiccation, p. 325-385, IN Ainsworth, G.C. and A.S. SUSSMAN. *The fungi, an advanced treatise.* Vol. III. Acad. Press. New York, 1968. xix + 738 p.
28. MEYER, ESTHER. The preservation of dermatophytes at sub freezing temperatures. *Mycologia*, 47:664-668, 1955.

29. MORLEY, D.C. A simple method of testing the sensibility of wound bacteria to penicilin and sulphathiazole by the use of impregnated blotting paper discs. J. Path. & Bact., 57:379-382, 1945.
30. ONIONS, A.H.S. Preservation of fungi. IN Booth, C. (ed), Methods in microbiology. Acad. Press. Vol. IV, Cap. 4, 113-151, 1971.
31. PERKINS, D.D. Preservation of Neurospora stock cultures with anhydrous silica gel. Can. J. Microbiol., 8:591-594, 1962.
32. PORTER, R.H. Longevity of Ustilago nuda in Barley seed. Phytopath., 45: 637-638, 1955.
33. RAPER, K.B. and D.F. ALEXANDER. Preservation of molds by the lyophil process. Mycologia, 37:499-525, 1945.
34. SAMPSON, KATHLEEN. The biology of cat smuts. I. Viability of the chlamydospores. Annals appl. Biology, 15:586-622, 1928.
35. SAXENA, S.K. e A.M. KHAN. Effect of carbon sources on germination of chlamydospores of Ustilago scitaminea Syd. Mycopath. et Mycologia applicata, 43(3-4):317-322, 1971.
36. SEN, BINEETA and R.L. MUNJAL. Studies on the physiology of Ustilago nuda tritici Schaf. Indian Phytopath., 21:416-423, 1968.
37. TAPKE, V.F. Longevity in Ustilago nuda. Phytopath., 43:407, 1953.
38. TUIITE, J. Plant pathological methods: fungi and bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Co (ed), 239 p. 1969.
39. VICENT, J.G. e H.W. VICENT. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicilin determination. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 55:162-164, 1944.
40. WANG, C.S. Viability and longevity of chlamydospores of Ustilago crameri. Phytopath., 26:1086-1087, 1936.
41. WEISS, F. and B. A. OTEIFA. Preservation of cultures of microorganisms under oil seal. Phytopath., 43:407, 1953.
42. WELLMAN, A.M. e D.B. WALDEN. Qualitative and quantitative estimates of viability for some fungi after periods of storage in liquid nitrogen. Can J. Microbiol., 10:585-593, 1964.
43. WOLF, F.T. The utilization of carbon and nitrogen compounds by Ustilago zeae. Mycologia, 45:516-522, 1953.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Percentagens de germinação de clamidosporos de U. scitaminea preservados em dessecadores com sílica gel durante 12 meses, a -10°C.

REPETIÇÕES

T R A T A M E N T O S

	Dez.72	Jan. 73	FEV.	MAR	ABR.	MAI.	JUN.	JUL.	AGO.	Set.	OUT.	NOV.	Dez.
1	93,6	90,4	87,6	85,2	86,4	88,8	85,6	86,2	68,8	67,4	50,8	56,8	51,2
2	89,8	88,2	86,0	94,2	85,2	91,2	82,0	88,4	70,2	67,2	63,2	51,6	50,8
3	90,4	90,6	89,4	91,8	88,0	83,2	86,0	88,4	62,2	66,0	58,4	53,2	52,4
4	90,4	89,2	92,2	90,8	91,0	85,6	83,0	86,0	61,0	63,4	61,2	51,0	58,8
5	91,6	90,0	87,0	89,0	90,8	86,0	87,0	84,0	61,2	66,8	52,2	52,8	51,2
6	91,4	86,6	88,0	86,2	88,0	86,0	85,4	81,0	66,4	64,2	53,4	52,6	52,0
7	91,2	96,4	90,0	85,2	86,0	88,4	85,0	80,2	67,0	66,2	57,2	52,6	54,4
8	92,0	92,4	88,0	90,2	95,2	87,2	85,0	81,2	69,4	63,6	55,4	53,6	51,0
9	88,0	86,0	93,2	94,6	91,2	87,0	83,6	83,2	69,2	64,0	55,8	52,2	54,4
10	90,6	91,0	90,8	87,2	90,2	85,0	86,4	68,6	66,2	66,2	54,6	61,8	56,0
Médias	90,90	90,12	89,22	89,44	89,20	86,44	84,90	84,50	66,40	65,40	56,22	52,82	53,22

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	12	12882,1444	1073,5120	184,73 **
Resíduo	117	679,8950	5,8110	
TOTAL	129	13562,0394		

CV = 3,86%
S = 2,41

TESTE DE TUKEY
5% = 3,65
1% = 4,20

APÊNDICE 2 - Percentagens de germinação de clamidosporos de U. scitaminea preservados em dessecadores com sílica durante 12 meses, a 5°C

REPETIÇÕES	T R A T A M E N T O S												
	Dez. 72	Jan. 73	FEV.	MAR.	ABR.	MAI.	JUN.	JUL.	AGO.	SET.	OUT.	NOV.	DEZ.
1	93,6	89,8	84,8	88,8	89,6	94,0	92,6	92,6	88,8	90,4	88,8	86,0	86,0
2	89,8	88,2	92,0	86,2	91,8	94,0	89,6	88,6	89,2	87,6	89,4	88,0	89,8
3	90,4	88,2	92,8	91,0	89,6	89,2	97,8	93,0	89,6	87,8	87,0	86,8	89,8
4	90,4	91,6	92,0	90,0	91,6	91,2	92,0	94,0	89,6	91,0	87,2	88,2	85,6
5	91,6	90,4	89,6	89,6	91,4	88,0	91,0	90,0	88,8	88,2	89,4	89,4	86,0
6	91,4	90,8	92,0	86,4	88,4	93,6	91,0	93,6	88,4	87,6	90,2	88,8	84,8
7	91,2	91,2	89,6	93,4	89,8	90,0	89,6	93,6	88,6	85,4	89,0	88,2	86,4
8	92,0	90,0	90,2	90,4	89,0	88,4	91,2	93,0	88,5	87,4	87,4	86,6	86,2
9	88,0	90,6	94,0	93,0	89,8	91,2	93,8	90,0	89,5	90,2	86,0	87,8	86,6
10	90,6	88,2	93,6	85,4	88,2	87,4	91,8	93,6	85,6	85,6	86,4	90,8	86,0
Medias	90,90	89,90	91,06	89,32	89,32	90,72	92,04	92,20	88,66	88,14	88,04	88,06	86,72

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	12	320,3631	26,6960	7,25 **
Resíduo	117	430,4943	3,6794	
TOTAL	129	750,8474		

TESTE DE TUKEY
 CV = 2,67%
 S = 1,91
 5% = 2,89
 1% = 3,33

APÊNDICE 3 - Percentagens de germinação de clamidosporos de U. scitaminea preservados em dessecadores com sílica gel durante 12 meses à temperatura ambiente

REPETIÇÕES	T R A T A M E N T O S												
	Dez.72	Jan.73	FEV.	MAR.	ABR.	MAI.	JUN.	JUL.	AGO.	SET.	OUT.	NOV.	DEZ.
1	93,6	86,6	83,6	83,0	75,6	67,2	58,8	50,0	43,4	39,6	37,4	21,4	19,4
2	89,8	94,2	86,0	83,0	65,6	74,0	56,8	48,2	41,0	38,0	40,8	19,6	20,6
3	90,4	88,2	87,2	79,6	68,2	77,2	58,6	50,4	43,0	38,8	39,0	17,4	16,0
4	90,4	89,0	85,2	84,0	78,2	72,8	58,8	50,4	44,6	38,8	41,0	17,0	18,4
5	91,6	90,8	90,2	73,4	70,4	76,0	55,2	50,6	43,6	37,6	35,6	18,8	18,8
6	91,4	80,6	86,6	83,0	74,8	75,2	57,2	54,2	41,8	38,6	36,4	15,8	18,4
7	91,2	92,0	90,6	73,8	81,8	75,8	57,4	54,6	43,4	37,2	38,4	16,4	19,6
8	92,0	90,8	83,4	73,2	73,2	70,0	57,0	57,2	43,0	40,6	35,4	18,2	16,6
9	88,0	85,2	84,2	78,0	78,2	75,6	57,6	57,0	43,2	37,6	36,6	15,6	18,0
10	90,6	88,4	86,8	79,4	88,6	76,0	55,4	53,8	43,4	40,0	38,2	19,4	21,8
Médias	90,90	88,58	86,38	79,92	74,96	73,98	57,28	52,64	43,04	38,68	37,88	17,96	18,76

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	12	32102,4331	2675,2027	121,80 **
Resíduo	117	2569,6415	21,9627	
TOTAL	129	34672,0746		

CV = 9,24%
S = 4,68

TESTE DE TUKEY
5% = 7,09
1% = 8,15

APÊNDICE 4 - Percentagem de germinação de clamidosporos de *U. scitaminea* secos ao natural, liofilizados e preservados durante 12 meses, à temperatura ambiente

REPETIÇÕES	T R A T A M E N T O S												
	DEZ.72	JAN.73	FEV.	MAR.	ABR.	MAI.	JUN.	JUL.	AGO.	SET.	OUT.	NOV.	DEZ.
1	86,4	89,8	90,0	84,8	82,8	82,0	78,6	79,0	76,2	72,0	46,8	11,8	6,4
2	95,6	91,6	91,6	82,6	85,6	83,0	78,2	77,0	76,2	70,4	44,8	12,6	4,2
3	92,2	97,2	90,8	83,2	76,0	77,2	79,8	76,0	75,2	69,8	46,8	11,4	5,2
4	91,8	93,6	86,0	81,0	82,6	83,0	78,2	76,2	77,2	70,2	45,2	10,4	8,6
5	90,4	89,6	85,6	83,2	81,4	80,4	78,2	76,4	76,8	70,2	46,4	10,6	8,0
6	91,2	90,8	89,2	87,2	86,2	80,2	78,8	76,8	76,4	71,4	47,8	11,2	6,2
7	91,2	91,2	90,6	85,2	85,0	77,2	78,8	77,4	76,4	69,8	44,0	11,4	6,2
8	93,6	93,4	91,4	80,2	81,0	80,2	78,4	78,2	75,6	69,2	44,2	11,8	6,6
9	92,2	95,2	90,6	81,6	85,4	84,8	78,2	79,0	76,8	69,2	46,8	11,4	5,0
10	91,0	92,4	86,8	84,0	84,6	83,2	79,2	76,6	76,8	69,8	45,8	10,6	5,6
Médias	91,56	92,48	89,26	83,84	83,06	81,18	78,64	77,26	76,36	70,20	45,86	11,32	6,2

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIACÃO	GL	SS	QM	F
Tratamentos	12	44487,8586	3707,3215	2085,57 **
Resíduo	117	207,9838	1,7776	
TOTAL	129	44695,8424		

TESTE DE TUKEY

CV = 2,35%

S = 1,33

5% = 2,01

1% = 2,31

APÊNDICE 5 - Percentagens de germinação de clamidosporos de U. scitaminea secos ao natural e preservados sem liofilização durante 12 meses, à temperatura ambiente

REPETIÇÕES	T R A T A M E N T O S												
	DEZ.72	JAN.73	FEV.	MAR.	ABR.	MAI.	JUN.	JUL.	AGO.	SET.	OUT.	NOV.	DEZ.
1	93,6	88,6	84,6	90,4	80,2	85,8	86,6	85,4	83,8	65,4	37,4	2,4	0,4
2	89,8	90,8	90,2	91,2	84,4	91,8	90,0	81,8	81,6	72,8	38,6	3,0	0,4
3	90,4	87,2	84,8	86,8	89,0	82,0	88,4	81,0	85,2	67,4	40,0	2,6	0,6
4	90,4	90,4	87,0	90,0	85,6	88,0	84,2	81,6	84,6	67,2	37,8	3,3	1,0
5	91,6	95,6	84,6	87,4	83,8	88,4	98,8	85,8	84,0	72,0	38,0	1,2	1,4
6	91,4	95,2	85,6	83,2	88,8	85,2	85,4	80,4	83,8	68,2	38,4	2,4	0,4
7	91,2	92,2	87,6	82,8	85,0	87,2	86,6	83,2	84,4	70,8	37,0	2,4	0,2
8	92,0	91,4	83,6	84,8	88,0	86,8	84,6	79,2	83,6	70,4	36,0	2,0	0,2
9	88,0	95,0	85,4	87,0	89,4	83,2	85,4	89,2	84,2	73,2	39,0	2,4	1,0
10	90,6	90,0	90,4	83,0	86,4	88,4	82,8	85,0	82,6	71,0	35,8	1,8	1,0
Médias	90,90	91,64	86,38	86,66	86,06	86,68	86,48	83,26	83,78	69,84	37,80	2,35	0,66

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIACÃO	GL	SG	GM	F
Tratamentos	12	68074,3035	5672,8586	358,32 **
Resíduo	117	1862,2982	15,8316	
TOTAL	129	69926,6017		

TESTE DE TUKEY
 CV = 7,07%
 S = 3,97
 5% = 6,01
 1% = 6,92

APÊNDICE 6 - Percentagens de germinação de clamidosporos de U. scitaminea secos ao desumificador e preservados por liofilização durante 12 meses, à temperatura ambiente

REPETIÇÕES	T R A T A M E N T O S												
	DEZ.72	JAN.73	FEV.	MAR.	ABR.	MAI.	JUN.	JUL.	AGO.	SET.	OUT.	NOV.	DEZ.
1	89,8	87,2	85,4	88,0	84,8	82,4	78,2	72,0	77,8	68,2	44,2	41,2	29,2
2	93,6	85,0	94,2	82,2	83,6	83,6	75,8	71,6	78,6	60,6	46,6	41,2	31,6
3	93,6	90,4	85,2	82,8	85,6	84,6	75,8	76,8	78,8	61,2	48,2	41,8	25,6
4	94,6	91,8	85,2	82,4	84,8	84,4	75,2	77,8	79,4	62,0	44,6	39,6	33,2
5	92,8	92,2	84,4	86,0	83,2	86,0	75,8	72,0	77,6	60,2	44,6	40,4	34,4
6	92,6	88,2	84,8	84,8	89,0	81,2	74,0	81,2	76,6	65,6	48,6	40,8	36,4
7	91,8	92,6	91,4	85,0	89,2	83,6	74,4	80,4	78,2	59,0	45,6	42,4	33,8
8	90,4	90,4	86,6	86,6	91,0	85,6	75,8	81,0	75,4	64,8	45,2	41,0	33,0
9	93,6	89,8	86,2	91,2	84,0	83,4	74,6	80,6	75,2	59,6	44,4	41,4	31,6
10	94,8	92,4	90,2	84,4	90,0	83,2	75,8	81,2	76,4	66,2	46,6	43,0	33,8
Médias	92,76	91,00	87,36	85,34	86,52	84,00	75,54	77,46	77,40	62,74	45,86	41,28	32,26

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	12	20406,6747	1700,5562	262,95 **
Resíduo	117	756,6435	6,4670	
TOTAL	129	21163,3182		

CV = 4,27%
S = 2,54

TESTE DE TUKEY
5% = 3,85
1% = 4,42

APÊNDICE 7 - Preservação de germinação dos clamidosporos de U. scitaminea secos ao desumificador, não liofilizados, preservados durante 12 meses, à temperatura ambiente

REPETIÇÕES	T R A T A M E N T O S												
	DEZ.72	JAN.73	FEV.	MAR.	ABR.	MAI.	JUN.	JUL.	AGO.	SET.	OUT.	NOV.	DEZ.
1	90,8	92,0	87,2	88,6	84,4	66,0	52,6	41,2	39,2	37,8	36,8	37,2	24,6
2	93,4	93,4	89,2	87,4	91,4	72,0	51,2	38,4	39,4	35,6	38,6	27,4	30,0
3	93,0	93,0	85,2	89,2	89,0	68,0	52,2	38,6	39,6	40,2	36,4	27,8	19,8
4	92,0	96,6	85,8	87,8	87,0	68,8	54,8	41,6	37,8	36,6	46,0	30,0	20,0
5	90,0	94,0	94,2	87,0	87,2	68,4	52,6	38,6	39,0	39,8	34,4	30,6	18,0
6	93,8	89,6	87,0	89,4	83,6	72,8	53,8	39,0	37,8	38,8	43,0	28,4	21,6
7	93,0	89,0	90,2	89,0	91,2	69,8	53,6	40,4	39,0	42,6	38,2	29,0	24,0
8	93,8	88,6	90,4	86,6	87,8	69,0	52,4	38,0	39,0	41,8	37,8	28,4	21,8
9	92,8	92,0	86,4	88,6	87,8	67,0	51,6	40,6	38,8	38,2	37,0	28,2	21,8
10	97,4	92,4	91,6	89,0	85,0	68,8	52,2	40,4	38,8	42,8	35,8	30,4	24,4
Médias	93,00	92,06	88,72	88,26	87,44	69,06	52,72	39,68	38,86	39,42	38,34	28,74	22,68

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIACÃO	GL	SS	GM	F
Tratamentos	12	36417,3917	3034,7825	505,78 **
Resíduo	117	702,0132	6,0001	
TOTAL	129	37119,4049		

TESTE DE TUKEY
 CV = 4,68%
 S = 2,44
 5% = 3,69
 1% = 4,25

APÊNDICE 8 - Percentagens de germinação de clamidospores de U. scitaminea preservados em nitrogênio líquido durante 120 dias

REPETIÇÕES	PERCENTAGENS DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS EM DIFERENTES DIAS					
	0	6	42	74	101	120
1	72,8	67,4	73,0	70,8	77,2	68,4
2	69,8	67,4	71,2	68,8	65,6	69,2
3	72,4	71,4	70,2	72,0	70,0	72,6
4	69,4	64,2	72,6	71,6	67,6	69,4
5	73,4	73,8	68,4	68,8	67,6	70,0
6	72,3	68,8	74,0	72,3	66,0	69,8
7	70,8	70,6	72,8	67,4	70,8	67,8
8	71,0	66,0	70,0	76,2	67,6	68,8
9	70,7	74,0	71,0	71,6	71,6	66,6
10	73,0	64,8	71,6	69,0	73,2	67,4
Médias	71,56	68,84	71,48	70,85	69,72	69,00

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	28,5937	5,7187	2,20 NS
Resíduo	54	140,1454	2,5952	
TOTAL		168,7391		

CV = 2,82%
S = 1,61

APÊNDICE 9 - Percentagens de germinação de clamidospóros de U. scitaminea preservados em ampolas com vácuo parcial durante 120 dias e mantidos à temperatura ambiente

REPETIÇÕES	PERCENTAGENS DE GERMINAÇÃO DOS ESPÓROS EM DIFERENTES DIAS					
	0	6	42	74	101	120
1	72,8	65,0	53,4	29,6	28,8	27,6
2	69,8	67,6	52,6	31,8	27,2	26,2
3	72,4	66,2	53,8	32,4	29,2	27,8
4	69,4	65,4	53,2	29,8	29,0	26,8
5	73,4	68,4	51,0	32,2	29,0	26,0
6	72,3	67,8	54,8	31,2	27,6	27,6
7	70,8	65,4	52,0	31,2	29,6	26,2
8	71,0	67,4	51,0	30,4	29,2	26,0
9	70,7	66,8	52,2	30,4	27,6	27,8
10	73,0	68,0	53,4	30,0	27,8	28,2
Médias	71,56	66,80	52,74	30,90	28,50	27,02

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	107073,7518	21414,7503	49456,90**
Resíduo	54	25,4436	0,4711	
TOTAL	59	107099,1954		

CV = 1,59%
 S = 0,68
 TESTE DE TUKEY
 5% = 0,90
 1% = 1,90