CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, AUXANOGRÁFICA E PATOGENICA
DE COLLETOTRICHUM GOSSYPII SOUTH. E COLLETOTRICHUM
GOSSYPII SOUTH. VAR. CEPHALOSPORIOIDES COSTA & FRAGA JR.

CHRISTINA DUDIENAS

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiróz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia - Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Junho - 1990

D864c

Dudienas, Christina

Caracterização morfológica, auxanográfica e patogênica de *Colletotrichum gossypii* South. e *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr. Piracicaba, 1990.

67p.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia

1. Algodão - Doença 2. Fungo - Características de Conídios - Fatores de Crescimento - Patogenicidade 3. Antracnose 4. Ramulose I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CDD 633.51

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, AUXANOGRÁFICA E PATOGÊNICA
DE *Colletotrichum gossypii* SOUTH. E *Colletotrichum*
gossypii SOUTH. VAR. *cephalosporioides* COSTA & FRAGA JR.

CHRISTINA DUDIENAS

Aprovada em 08.08.90

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

ESALQ/USP

Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo

ESALQ/USP

Prof.^a Dra. Margarete Camargo

FCAVJ/UNESP

Prof. Dr. Hiroshi Kimati
Orientador

Ao meu esposo Elcio
e a meu filho Felipe
com carinho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos

Ao Instituto Agronômico de Campinas e ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", pela oportunidade concedida para a realização do Curso de Pós-Graduação e do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, pela valiosa orientação.

Aos Pesquisadores Científicos Dr. Edivaldo Cia, MS Margarida Fumiko Ito, Dr.^a Maria Aparecida de Souza Tanaka, pela colaboração na execução do presente trabalho.

Ao Pesquisador Científico Dr. Toshio Igue, pelas sugestões na realização das análises estatísticas.

Aos Pesquisadores Dr. Osvaldo Paradela Filho e Dr. Sérgio Almeida de Moraes, pelas sugestões e revisão dos originais.

A amiga e professora de inglês Geni da Silva pela revisão do "Summary".

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

A todos os funcionários da Seção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico de Campinas, que auxiliaram na execução deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Importância e sintomas causados pela ramulose e antracnose em algodoeiro	3
2.1.1. Ramulose	3
2.1.2. Antracnose	5
2.2 Nomenclatura e Taxonomia	6
2.3. Requerimentos nutricionais	9
2.4. Características morfológicas dos apressórios	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Meios de cultura e corantes utilizados ..	13
3.2. Isolamento e conservação dos isolados ..	16
3.3. Determinação do número de núcleos em conídios	18
3.4. Morfologia dos apressórios	19
3.5. Medidas dos conídios	20
3.6. Caracterização auxanográfica	20
3.7. Caracterização patogênica	25

	Página
4. RESULTADOS	28
4.1. Determinação do número de núcleos em co- nídios	28
4.2. Morfologia dos apressórios	28
4.3. Medidas de conídios	29
4.4. Caracterização auxanográfica	32
4.5. Caracterização patogênica	43
5. DISCUSSÃO	49
5.1. Caracterização dos conídios	49
5.2. Caracterização auxanográfica	52
5.3. Caracterização patogênica	55
6. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Relação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de algodoeiro, utilizados neste trabalho	17
2	Distribuição da frequência dos comprimentos dos conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i> da ramulose	30
3	Distribuição da frequência dos comprimentos dos conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i> da antracnose	31
4	Distribuição da frequência das larguras dos conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i> da ramulose	33
5	Distribuição da frequência das larguras dos conídios dos isolados de <i>Colletotrichum</i> da antracnose	34
6	Efeito da suplementação do meio mínimo com extrato de levedura e caseína hidrolisada <u>so</u> bre o crescimento de <i>Colletotrichum</i> da ramu lose	35
7	Efeito da suplementação do meio mínimo com extrato de levedura e caseína hidrolisada <u>so</u>	

Tabela

Página

	bre o crescimento de <i>Colletotrichum</i> da ramu- lose	37
8	Efeito da suplementação do meio mínimo com aminoácidos sobre o crescimento de <i>Colleto- trichum</i> da ramulose	38
9	Efeito da omissão de aminoácidos, isolada- mente, de meio mínimo suplementado com gru- pos de aminoácidos, sobre o crescimento de <i>Colletotrichum</i> da ramulose	40
10	Efeito da suplementação do meio mínimo com diferentes concentrações de asparagina e áci- do aspártico sobre o crescimento de <i>Colleto- trichum</i> da ramulose	42
11	Efeito da inoculação de <i>Colletotrichum</i> da antracnose e ramulose em maçãs destacadas de algodoeiro	44
12	Efeito da inoculação de <i>Colletotrichum</i> da antracnose e ramulose em sementes de algo- doeiro, na germinação das sementes	46
13	Efeito da inoculação de <i>Colletotrichum</i> da antracnose e ramulose em sementes de algo- doeiro, sobre as plântulas originárias des- sas sementes	47

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, AUXANOGRÁFICA E PATOGÊNICA DE
Colletotrichum gossypii SOUTH. E *Colletotrichum gossypii*
SOUTH. VAR. *cephalosporioides* COSTA & FRAGA JR.

Autora: CHRISTINA DUDIENAS

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

RESUMO

Duas importantes doenças do algodoeiro são causadas por fungos do gênero *Colletotrichum*: a antracnose causada por *C. gossypii* South. e a ramulose causada por *C. gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr.

Neste trabalho foram realizadas comparações entre esses dois fungos sob os aspectos morfológicos, auxanográficos e patogênicos.

No aspecto morfológico foram estudados: o número de núcleos nos conídios, a morfologia de apressórios e o tamanho dos conídios. Quanto à auxanografia foram estudados os requerimentos nutricionais. A patogenicidade foi avaliada em maçãs destacadas e em plântulas de dois cultivares de algodoeiro: Nu-15 (suscetível à ramulose) e IAC-17 (mais resistente à ramulose), através da inoculação dos fungos.

Ambos fungos apresentam conídios uninucleados e apressórios morfollogicamente semelhantes.

Quanto ao tamanho de conídios os fungos são diferentes. O agente da ramulose pode apresentar conídios

de comprimento maior que $16\mu\text{m}$, enquanto que todos os conídios do agente da antracnose são menores que $16\mu\text{m}$.

Também auxanograficamente os dois fungos são diferentes: o *Colletotrichum* causador da ramulose é deficiente em asparagina ou ácido aspártico, enquanto que o causador da antracnose é auxoautotrófico para fatores de crescimento.

Considerando-se a patogenicidade em maçãs destacadas do cultivar IAC-17 e em plântulas dos cultivares Nu-15 e IAC-17 de algodoeiro, os fungos comportaram-se de maneira semelhante. Em maçãs destacadas do cultivar Nu-15 o fungo causador da antracnose foi mais patogênico que o fungo causador da ramulose.

Com base nos estudos realizados é possível caracterizar isolados dos agentes causadores da antracnose e da ramulose do algodoeiro, todavia os dados obtidos são insuficientes para separá-los em espécies diferentes.

MORPHOLOGIC, AUXANOGRAPHIC AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION
OF *Colletotrichum gossypii* SOUTH. AND *Colletotrichum*
gossypii SOUTH. VAR. *cephalosporioides* COSTA & FRAGA JR.

Author: CHRISTINA DUDIENAS

Adviser: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

SUMMARY

Two important cotton diseases are caused by fungi of *Colletotrichum* genus: anthracnosis caused by *C. gossypii* South. and ramulosis caused by *C. gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr.

Comparisons among two fungi cultures in the morphological, auxanographic and pathogenic aspects were performed.

The number of nuclei in the conidia, the morphology of the appressoria and the size of the conidia were evaluated in the morphological aspect. Nutritional requirements were studied in the auxanographic aspect. The pathogenicity was evaluated on detached bolls and seedlings of two cultivars of cotton plant: Nu-15 (susceptible to ramulosis) and IAC-17 (more resistant to ramulosis).

Conidia of both fungi are uninucleated and the morphology of their appressoria is similar.

Regarding the size of the conidia the fungi

are different. The fungus responsible for the ramulosis can have conidia with a length larger than $16\mu\text{m}$, while all the others conidia from the agent that produces anthracnosis are smaller than $16\mu\text{m}$.

Auxanographically the two fungi are also different: the *Colletotrichum* responsible for the ramulosis is deficient in asparagin or aspartic acid, while the *Colletotrichum* responsible for the anthracnosis is auxoautotrophic for growth factors.

The fungi were similar in pathogenicity in detached bolls of the IAC-17 cultivar and seedlings of Nu-15 and IAC-17 cultivars of cotton. The fungi were different in pathogenicity in detached bolls of Nu-15 cultivar. The fungus responsible for the anthracnosis was more pathogenic than the responsible for the ramulosis in this cultivar.

The differences found among these fungi showed that it is possible to characterize strains of *Colletotrichum* responsible for the anthracnosis and ramulosis but the datas are insufficient to separate in different species.

1. INTRODUÇÃO

Duas das mais importantes doenças do algodoeiro são causadas por fungos do gênero *Colletotrichum*: a antracnose causada por *Colletotrichum gossypii* South. e a ramulose causada por *C. gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr.

A antracnose causa podridão de maçãs e/ou diminuição de resistência das fibras, resultando em queda do valor comercial do produto. Causa também "damping-off" de pré e pós-emergência, o que resulta em falhas na linha de plantio, resultando em necessidade de replantio da cultura (MARSH *et alii*, 1950 e BITANCOURT, 1935). A ramulose causa superbrotamento de plantas, resultando em redução da produção de até 70%, dependendo do índice de infecção e da severidade da doença (ABRAHÃO & COSTA, 1949).

Ambos agentes causais dessas doenças são morfollogicamente semelhantes, todavia a diferença dos sintomas causados nas plantas mostra diferenças fisiológicas entre eles. FOLLIN & MANGANO (1983) compararam esses dois agentes patogênicos e verificaram diferenças fisiológicas e patogênicas entre eles, o que os levou a concluir que os dois fungos seriam espécies diferentes. Na literatura consultada não

foi encontrado nenhum trabalho que questionasse a proposição desses autores, porém os nomes anteriormente adotados para esses patógenos continuaram a ser utilizados pelos pesquisadores que atualmente trabalham com essas doenças.

O presente trabalho visa dar uma contribuição à taxonomia desses dois fungos, tendo como objetivos principais a caracterização morfológica dos conídios e apressórios e a caracterização auxanográfica e patogênica dos dois fungos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância e sintomas causados pela ramulose e antracnose em algodoeiro

2.1.1. Ramulose

A ramulose ou superbrotamento do algodoeiro, causada por *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa & Fraga Jr., é considerada uma das principais doenças da cultura em locais onde as condições climáticas são favoráveis ao seu desenvolvimento. Segundo KIMATI (1980) além da alta pluviosidade, a alta fertilidade do solo também favorece o desenvolvimento do patógeno.

A doença foi observada, pela primeira vez, no município de Rancharia, no Estado de São Paulo, em 1936 (COSTA & FRAGA JÚNIOR, 1937). Atualmente essa doença é considerada de grande importância nos Estados do Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e regiões do Nordeste (CIA *et alii*, 1982 e CARVALHO *et alii*, 1986).

Os prejuízos causados pela ramulose são variáveis. Pode ocorrer redução na produção da ordem de 30 a 70%, dependendo do índice de infecção e da severidade da doença (ABRAHÃO & COSTA, 1949). O fungo afeta principalmen-

te plantas jovens causando a morte da gema apical. Consequentemente as gemas axilares são estimuladas, produzindo ramos adicionais. Este fato provoca um esgotamento das reservas da planta, em detrimento da formação de capulhos. Por outro lado, se a doença ocorrer em plantas mais velhas, os prejuízos causados à cultura são reduzidos, pois nesta fase a produção já estará garantida. (ABRAHÃO, 1952 e ABRAHÃO, 1961). Segundo CARVALHO *et alii* (1981), plantas infectadas com até 30 dias de idade ficam totalmente improdutivas. Em um experimento com inoculação artificial do fungo causador da ramulose, em 7 variedades de algodoeiro, CARVALHO & LIMA (1982) verificaram a redução na produção de até 33.1%. As plantas inoculadas tornaram-se mais tardias, ocorrendo diminuição no peso médio dos capulhos, no peso de 100 sementes e no índice Micronaire.

As plantas afetadas pela ramulose apresentam além do aspecto ramalhudo, um porte mais baixo, galhos contornados e dilatados, folhas encarquilhadas e deformadas. As folhas apresentam áreas cloróticas que evoluem para lesões necróticas arredondadas, alongadas ou angulares, e, às vezes, acompanhadas de perfurações. Nas hastes e nos pecíolos das folhas observam-se lesões necróticas, deprimidas ou elevadas, algumas vezes fendilhadas (COSTA & FRAGA JR., 1937).

2.1.2. Antracnose

A antracnose, causada por *Colletotrichum gossypii* South. é outra doença do algodoeiro que pode acarretar baixa produtividade da cultura, dependendo das condições climáticas. Ela está largamente distribuída em todas as regiões úmidas onde se cultiva o algodoeiro, afetando a germinação das sementes, e conseqüentemente, reduzindo o número de plantas por área e prejudicando o bom desenvolvimento dos capulhos, fibras e sementes (KIMATI, 1980). Em determinados anos esta doença tem sido de grande importância em alguns Estados como São Paulo e Goiás, e na região Nordeste do país, principalmente em Alagoas (CARVALHO *et alii*, 1985).

As mais graves incidências do *Colletotrichum* causando tombamento das plântulas, aparecem geralmente após as quedas de temperatura que sucedem as primeiras chuvas do ano agrícola (CRUZ *et alii*, 1970). O maior prejuízo causado por essa doença resulta na necessidade de replantio para obtenção de uma população ideal de plantas por unidade de área (BALMER *et alii*, 1966).

Segundo MARSH *et alii* (1950), o *C. gossypii* é conhecido como decompositor de celulose. Ele é capaz de causar uma diminuição na resistência das fibras do algodão, quando os capulhos são afetados. Quantitativamente os danos nas fibras dependem das condições climáticas que ocorrem após a abertura das maçãs. Também constataram altas incidências desse fungo em uma localidade da Carolina do Sul após

uma sucessão de dias nublados e chuvosos. Esses mesmos autores chamaram atenção para a importância da ocorrência desse fungo nas sementes, tornando-as um eficiente veículo de disseminação e uma fonte de inóculo para infecção das plântulas originárias dessas sementes.

A antracnose causa lesões escuras e deprimidas nas maçãs do algodoeiro que, muitas vezes, abrangem todo o fruto. O fungo alcança as sementes e, quando estas são semeadas, podem apodrecer antes mesmo de germinar. Quando a semente consegue germinar, a plântula apresenta uma região avermelhada em torno do colo e a raiz enegrecida. Plântulas com estes sintomas podem reagir e formar novas raízes ou morrer, provocando uma falha na linha de plantio (BITANCOURT, 1935).

2.2. Nomenclatura e Taxonomia

A descrição dos sintomas da antracnose em maçãs de algodoeiro foi realizada por SOUTHWORTH (1891) que também identificou seu agente causal, baseado em suas características morfológicas.

A identificação do agente causal da ramulose do algodoeiro também foi baseada nas características morfológicas do patógeno (COSTA & FRAGA JÚNIOR, 1939). Esses autores verificaram que o fungo causador da ramulose pertencia ao gênero *Colletotrichum* apresentando características morfológicas muito semelhantes ao *C. gossypii* e que ambos

eram capazes de causar tombamento em plântulas. Apenas o fungo causador da ramulose provocava superbrotamento em plantas, quando estas eram provenientes de sementes infestadas artificialmente. Este fungo foi designado *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, considerando-se a possibilidade de ser uma mutação mais agressiva de *C. gossypii*.

O gênero *Colletotrichum* foi amplamente estudado por ARX (1957) que agrupou em *C. gloeosporioides* cerca de 600 espécies que apresentavam conídios elípticos, com dimensões de 12 a 19 por 1 a 6 micra. Esse autor baseou-se apenas nas características morfológicas do fungo para propor esse agrupamento. Em seu trabalho somente fez referência a *C. gossypii* e não cita o fungo *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. Baseado nas características morfológicas poderíamos incluir também esse último na espécie *C. gloeosporioides*, caracterizada por ARX (1957).

O fato do fungo *C. gossypii* var. *cephalosporioides* causar superbrotamento em plantas de algodoeiro mostra que as diferenças fisiológicas entre ele e *C. gossypii* são bem nítidas. Nos trabalhos posteriores ao estudo de ARX (1957), realizados com esses dois fungos, os autores têm utilizado sua nomenclatura original.

FOLLIN & MANGANO (1983) realizaram um estudo comparativo entre essas duas espécies de *Colletotrichum* com o objetivo de verificar se *C. gossypii* var. *cephalosporioides* é realmente uma variação de *C. gossypii* ou se ambos podem ser incluídos na espécie *C. gloeosporioides* proposta

por ARX (1957). Verificaram que, inoculando-se sementes de algodoeiro com esses fungos, ambos causaram tombamento de plântulas, sendo o *C. gossypii* mais drástico. Das sementes inoculadas com esse fungo, apenas 2,6% sobreviveram, sendo que, daquelas inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* 34,1% sobreviveram. Apenas *C. gossypii* var. *cephalosporioides* causou superbrotamento nas plantas, quando inoculadas com 20 a 25 dias de idade. Na inoculação de maçãs de algodoeiro, o *C. gossypii* foi mais drástico. Uma semana após a inoculação 11,8% das maçãs permaneceram sadias, contra 47,1% quando inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

As características morfológicas das colônias dos fungos causadores de antracnose e ramulose foram diferentes em meios de cultura de acordo com FOLLIN & MANGANO (1983). *C. gossypii* apresentou uma cultura uniforme, de cor rosa salmão, em meio de aveia e de Czapeck. *C. gossypii* var. *cephalosporioides* apresentou uma cultura de aspecto granulado e cor parda em meio de aveia e um micélio verde escuro, com pontos mais escuros, em meio de Czapeck com extrato de levedura. Segundo COSTA¹, o agente causal da ramulose produzia em meio de cultura colônias com raios curvos e de aparência mais gelatinosa que *C. gossypii*.

¹ COSTA, A.S. (Instituto Agronômico de Campinas). Comunicação pessoal. 1987.

FOLLIN & MANGANO (1983) observaram também diferenças na velocidade de crescimento desses dois fungos em meio de aveia, em diferentes temperaturas. *C. gossypii* apresentou um crescimento quase ótimo a 30°C enquanto *C. gossypii* var. *cephalosporioides* apresentou crescimento bastante lento. Os conídios de ambos foram morfologicamente idênticos. Fisiologicamente os dois fungos foram diferentes: o causador da ramulose mostrou-se parcialmente deficiente em tiamina e biotina, enquanto o causador da antracnose comportou-se como auxoautotrófico para essas vitaminas. Baseados nessas diferenças, os autores concluíram que não se pode considerar que o *Colletotrichum* causador da ramulose tenha se originado de *C. gossypii* e propuseram para ele o nome de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. var. *cephalosporioides* Costa.

2.3. Requerimentos nutricionais

Em relação à exigência de vitaminas, a diferença fisiológica existente entre *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, constatada por FOLLIN & MANGANO (1983) pode ser muito importante do ponto de vista taxonômico, pois, segundo FRIES (1965), o tipo de auxoheterotrofia pode ser utilizado para a identificação de espécies de fungos, principalmente em casos onde as características morfológicas não são confiáveis para diferenciar esses fungos. Todavia encontram-se na literatura poucos trabalhos com o objetivo de discutir a validade dessa suposição.

GEORG (1952) estudou as características nutricionais e morfológicas de 8 isolados de *Trichophyton megnini* e de 5 isolados de *T. gallinae*. Esse autor identificou nos isolados de *T. megnini* uma deficiência completa em histidina. Os isolados de *T. gallinae* mostraram que não necessitaram desse aminoácido para seu crescimento e que não foram estimulados pela adição de caseína hidrolisada, outros aminoácidos ou vitaminas no meio de cultura.

GEORG & CAMP (1957) observaram que certos dermatófitos do gênero *Trichophyton* apresentavam requerimentos nutricionais específicos e que isso podia ser utilizado para identificá-los. Assim, com isolados de *Trichophyton verrucosum* tiveram uma exigência completa em tiamina ou tiamina e inositol; treze isolados de *T. equinum* em ácido nicotínico. Sessenta isolados de *T. tonsurans* não tiveram requerimentos completos para essas vitaminas, porém seu crescimento foi bastante estimulado pela adição de tiamina. Esses autores estudaram também treze isolados de *T. megnini* e confirmaram sua deficiência em histidina, constatada por GEORG (1952).

Segundo GEORG & CAMP (1957) a característica de apresentação de requerimentos nutricionais específicos é de grande validade para identificação de fungos, principalmente no caso de espécies com difícil esporulação ou que produzem colônias semelhantes ou com características morfológicas atípicas.

VISHNIAC (1955) verificou que o fungo *Labyrinthula minuta* var. *atlantica* apresentou deficiência em L-leucina, destacando-se entre os indivíduos dessa espécie, que não requereram esse aminoácido como fator de crescimento. KIMATI (1975) verificou que *Colletotrichum falcatum* foi auxanograficamente distinto de *C. gramínicola* por ser deficiente em biotina.

No entanto, há também na literatura, trabalhos que não confirmam a suposição de FRIES (1965) de que o tipo específico de auxoheterotrofia pode ser utilizado para a identificação de espécies de fungos. Assim, Robbins¹, citado por ZENTMYER (1980) observou que *Phytophthora cinnamomi* requereu tiamina para seu crescimento, sendo essa característica comum a outras espécies de *Phytophthora*. ANDES & KEITT (1950) estudando 8 isolados monospóricos de *Glomerella cingulata* obtidos de frutos de macieira, verificaram que um deles apresentou deficiência parcial em tiamina e outro em niacina, enquanto que os restantes não apresentaram aumento de crescimento com a adição dessas vitaminas.

2.4. Características morfológicas dos apressórios

Outra característica que pode colaborar com a taxonomia de isolados de *Colletotrichum* é a morfologia

¹ ROBBINS, W.M. Thiamine and growth of species of *Phytophthora*. Bull. Torrey Bot. Club, New York, 65:267-276, 1938.

do apressório. De acordo com SUTTON (1968) a morfologia dos apressórios de *Colletotrichum* de gramíneas pode ser uma característica adicional na taxonomia desses fungos, desde que seja correlacionada com características biológicas adicionais.

Segundo SUTTON (1962) *C. trichellum* e *C. dematium* foram considerados sinônimos por ARX (1957) mas as características morfológicas de seus apressórios diferenciam um do outro. Além das diferenças entre apressórios existem diferenças morfológicas entre seus conídios, acervulos e crescimento micelial em meio de batata-dextrose-água.

SUTTON (1968) mostrou que existem diferenças quantitativas e qualitativas entre apressórios produzidos por isolados de *Colletotrichum* de cana-de-açúcar (*C. falcatum*) e o do sorgo e milho (*C. graminicola*). Há indicações de diferenças morfológicas entre as duas espécies e uma subdivisão de *C. graminicola* em, no mínimo, 2 taxa diferentes. Portanto, a união entre essas duas espécies feita por ARX (1957), foi considerada injustificável. Ainda segundo SUTTON (1968), a maneira mais satisfatória de distinção entre os três grupos de *Colletotrichum* é a diferença qualitativa de seus apressórios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"-USP, em Piracicaba-SP, e nos laboratórios e casa de vegetação da Seção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico, em Campinas-SP.

3.1. Meios de cultura e corantes utilizados

Meio de BDA (batata-dextrose-ágar)

Batata	200g
Dextrose	20g
Ágar	20g
Água destilada	1000ml

Meio de AA (ágar-água)

Ágar	20g
Água	1000ml

Meio de aveia

Farinha de aveia	60g
Ágar	15g
Água destilada	1000ml

Meio mínimo-MM (PONTECORVO et alii, 1953, modificado por KIMATI, 1975)

Glucose	10g
NaNO_3	6g
KH_2PO_4	1,5g
KCl	0,5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g
Solução de micronutrientes	1ml
Ágar Difco	15g
Água destilada	1000ml

Solução de micronutrientes (LILLY & BARNETT, 1951)

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	723,4mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	439,8mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	203,0mg

Estas substâncias foram dissolvidas em 1000ml de água destilada e a solução foi clarificada com ácido sulfúrico.

Meio mínimo com caseína hidrolisada

Meio mínimo	1000ml
Caseína hidrolisada	1,5g

Meio mínimo com extrato de levedura

Meio mínimo 1000ml

Extrato de levedura 0,5g

Meio completo

Meio mínimo 1000ml

Caseína hidrolisada 1,5g

Extrato de levedura 0,5g

Corante Giemsa

Solução estoque de giemsa 2 partes

Tampão fosfato (pH=7,2) 10 partes

Solução estoque de Giemsa

Giemsa 3,8g

Metanol 250ml

Glicerina 250ml

Corante azul de Amann

Azul de algodão 0,5g

Ácido láctico 10ml

Glicerina 20ml

Ácido fênico cristalizado ... 10g

Água destilada 10ml

3.2. Isolamento e conservação dos isolados

Os isolados de *Colletotrichum*, obtidos de ramos, maçãs, sementes e plântulas de algodoeiro, utilizados neste trabalho, estão relacionados na Tabela 1.

Para os isolamentos a partir de ramos e plântulas, pequenos pedaços de tecido da região de transição entre a parte sadia e doente foram cortados e tratados com hipoclorito de sódio a 0,05%, durante 1,5 minutos e, em seguida, colocados em placas de Petri contendo meio BDA. Após uma semana, as colônias desenvolvidas foram repicadas para tubos de ensaio, contendo o mesmo meio de cultura.

A obtenção de isolados a partir de maçãs foi realizada diretamente a partir de maçãs com sintomas de antracnose, que permaneceram em câmara úmida (caixas gerbox contendo um chumaço de algodão embebido em água destilada) e mantidas em condições de laboratório. Depois de 24 horas nessas condições surgiram as frutificações típicas do fungo que foram repicadas para placas de Petri, contendo meio de cultura AA. Posteriormente essas culturas foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA.

A técnica utilizada para isolamento dos fungos a partir de sementes foi a mesma utilizada em testes de sanidade de sementes, pelo método do papel de filtro. Sementes deslintadas com ácido sulfúrico foram submetidas à assepsia superficial em uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante cinco minutos. Em seguida, foram colocadas em

Tabela 1. Relação dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de algodoeiro.

Isola dos	Sintomas	Parte da Planta	Procedência
1	ramulose	ramos	Sta. Helena-GO
2	antracnose	plântulas (colo)	Campinas-SP
3	ramulose	ramos	Canápolis-MG
4	não visível	sementes	Castilho-SP
5	ramulose	ramos	Ituverava-SP
6	ramulose	ramos	Ituverava-SP
7	ramulose	ramos	Ituverava-SP
8	ramulose	ramos	Ituverava-SP
9	não visível	sementes	Pirapozinho-SP
10	não visível	sementes	Leme-SP
11	não visível	sementes	Leme-SP
12	não visível	sementes	Leme-SP
13	ramulose	ramos	Ituverava-SP
14	ramulose	ramos	Ituverava-SP
15	antracnose	plântulas (colo)	Conchal-SP
16	ramulose	ramos	Pirassununga-SP
17	antracnose	maças	Sta. Helena-GO
18	ramulose	ramos	Uberaba-MG
19	ramulose	ramos	Uberaba-MG
20	ramulose	ramos	Capinópolis-MG
21	antracnose	maças	Uberaba-MG
22	não visível	sementes	Piracicaba-SP
23	antracnose	maças	Mococa-SP
24	antracnose	maças	Sta. Cruz R. Pardo-SP

placas de Petri de plástico transparente, que continham três discos de papel de filtro de 80g/m^2 , previamente umedecidos em água destilada esterilizada. As sementes foram incubadas por doze dias, a $22\pm 2^\circ\text{C}$ sob luz NUV ("near ultra violet"), alternada com escuro (12/12h). Após esse período as sementes foram examinadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Os fungos que se desenvolveram sobre elas foram, então, transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura AA sendo, após 48 a 72 horas repicados para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA.

Os isolados obtidos foram conservados em água pelo método de CASTELLANI (1939), modificado por FIGUEIREDO (1967). O método constitui-se na transferência de pequena porção de meio de cultura contendo o fungo, para vidros do tipo empregado para penicilina, com capacidade de 6cm^3 , contendo de 4 a 5ml de água destilada esterilizada. Depois da repicagem os vidros foram fechados com tampas de borracha e, em seguida, com lacres de alumínio.

3.3. Determinação do número de núcleos em conídios

Foram utilizados os isolados de número 5, 8, 15, 17, 18 e 22. Os conídios foram retirados de culturas desenvolvidas em BDA, durante 14 dias, sob condições ambientais de laboratório. Foi utilizada a técnica de coloração de núcleos, descrita por BARROS (1977). Os conídios foram fixados em lâminas para microscópio ótico com uma solução

de albumina a 5% e secos ao ar. Em seguida foram fixados com uma solução contendo etanol, ácido acético e ácido lático na proporção de 6:1:1, durante 20 minutos. Posteriormente foram lavados com uma mistura de álcool e água, nas concentrações de 95%, 70%, 50% e 0% de álcool, durante 5 a 8 minutos para cada uma. Foram hidrolisados com HCl 1N, durante 5 a 6 minutos em temperatura ambiente e durante 6 a 8 minutos a 60-63°C e lavados, em seguida, 4 a 5 vezes em água, durante 5 a 8 minutos para cada lavagem. Foram depois lavados em tampão fosfato (pH=7,2), durante 20 minutos. Finalmente foram imersos em corante Giemsa, durante 2 horas.

Com auxílio de um microscópio ótico com aumento de 540 vezes, os núcleos foram observados e contados. Para cada isolado foram observados 300 conídios.

3.4. Morfologia dos apressórios

Os isolados 5, 8, 15, 17, 18 e 22 foram cultivados em meio de aveia durante uma semana. Os conídios produzidos foram suspensos em água destilada e esterilizada sendo uma gota dessa suspensão depositada sobre uma lâmina de microscopia, que permaneceu em câmara úmida, à temperatura de 27-29°C, no escuro, até que ocorresse a germinação. Após 24 horas os conídios germinados foram coloridos com azul de Amann e sendo a morfologia dos apressórios observada com o auxílio de microscópio ótico.

3.5. Medidas de conídios

Os conídios foram medidos utilizando-se o micrômetro ocular de tambor de Huyghens. Os isolados utilizados foram os de número 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23 e 24. As lâminas foram preparadas com conídios retirados de culturas com 7 dias que se desenvolveram em meio de aveia a 27-29°C, no escuro. Foram preparadas 4 lâminas de cada isolado e medidos 25 conídios por lâmina.

3.6. Caracterização auxanográfica

A caracterização fisiológica dos isolados foi efetuada em 5 etapas e baseou-se na técnica auxanográfica descrita por BEADLE & TATUM (1945) para *Neurospora*.

a) Primeira etapa

Na primeira etapa os isolados 4, 5, 7, 9, 14 e 15 foram cultivados nos seguintes meios: meio mínimo, meio mínimo com caseína hidrolisada, meio mínimo com extrato de levedura e meio completo.

Os isolados foram repicados, por duas vezes sucessivas para meio mínimo para garantir a sua purificação evitando assim a contaminação com o meio original. Após a segunda repicagem, quando as colônias dos fungos apresentavam-se com 7 dias, blocos com 0,5cm de diâmetro, contendo micélio, foram retirados dos bordos dessas colônias e colo-

cados nos centros de placas de Petri contendo os diferentes meios em estudo. As placas foram mantidas em condições ambientes de laboratório.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento, representado pelos meios de cultura, realizado com três repetições. Portanto, o número total de placas de Petri no ensaio foi 72.

A avaliação do ensaio foi realizada 7 dias após a repicagem, através da medição do diâmetro das colônias.

b) Segunda etapa

Na segunda etapa foi avaliado o crescimento dos isolados 5, 7 e 14 em meio mínimo suplementado com misturas de aminoácidos. Devido ao não crescimento desses três isolados em meio mínimo e estimulação de seu crescimento pela adição de caseína hidrolisada foram estudados os aminoácidos. Foi observado um pequeno crescimento em meio mínimo contendo extrato de levedura, mas isso ocorreu provavelmente, devido a impurezas contidas no extrato de levedura. Os outros três isolados da primeira etapa não foram utilizados neste teste, pois não mostraram deficiência em fatores de crescimento, já que cresceram em meio mínimo.

Para a suplementação das misturas, os aminoácidos foram agrupados da seguinte forma:

I: DL-alanina, L-arginina, L-ácido glutâmico, glicina, L-prolina e L-tirosina.

II: L-asparagina, DL-ácido aspártico, DL-isoleucina, DL-leucina, DL-fenilalanina e DL-serina.

III: DL-valina, DL-treonina, L-histidina, L-lisina, DL-metionina e DL-triptofano.

Esse agrupamento de aminoácidos foi baseado em resultados obtidos por PELLETIER & KEITT (1954) que estudaram diferentes fontes de nitrogênio para *Venturia inaequalis*. Os autores classificaram os aminoácidos como fontes de nitrogênio boas, satisfatórias ou pobres para aquele fungo, de acordo com a indução de um crescimento micelial bom, intermediário ou baixo. Então o grupo I deste trabalho reuniu os aminoácidos considerados por esses autores como boas fontes de nitrogênio. O grupo II reuniu alguns aminoácidos considerados como fontes satisfatórias de nitrogênio e o grupo III alguns considerados fontes satisfatórias e outros fontes pobres de nitrogênio.

Os aminoácidos de cada grupo foram adicionados ao meio mínimo em quantidades calculadas para permitir uma concentração de nitrogênio de 0,1g/l, equivalente a concentração desse elemento encontrada na caseína hidrolisada. Todos os aminoácidos contribuíram com a mesma porcentagem de nitrogênio no meio de cultura.

Os isolados foram repicados para meio mínimo, meio mínimo suplementado com aminoácidos do grupo I, do grupo II, do grupo III, separadamente e meio mínimo com caseína hidrolisada. A transferência dos isolados para os di-

ferentes meios de cultura, o tempo de incubação das culturas, o delineamento experimental e a avaliação foram realizadas conforme descrito anteriormente. Para cada meio de cultura foram testados três isolados com 3 repetições. O número total de placas no ensaio foi 45.

c) Terceira etapa

Nessa etapa foram testados os aminoácidos dos grupos I e II pois foram apenas esses dois grupos que proporcionaram crescimento dos isolados. Foram preparados meios de cultura contendo os 6 aminoácidos de cada grupo e meios contendo 5 desses 6, omitindo-se um aminoácido de cada vez. Portanto foram preparados sete meios de cultura para se testar os aminoácidos do grupo I e sete para se testar os aminoácidos do grupo II. Em cada um dos meios, cada aminoácido contribuiu com a mesma concentração de nitrogênio, totalizando 0,1g/l do elemento.

A repicagem, a incubação e o delineamento experimental foram realizadas conforme esta descrito na primeira etapa. Foram também feitas 3 repetições para cada isolado. O ensaio foi constituído de 126 placas de Petri. A avaliação deu-se aos 20 dias após a repicagem.

d) Quarta etapa

A quarta etapa foi realizada empregando-se os isolados 7, 14 e 18. Foi necessário substituir o isolado 5 devido a contaminação do mesmo.

Nessa fase foram testadas diferentes concentrações de asparagina e ácido aspártico pois esses aminoácidos mostraram-se essenciais ao crescimento do fungo. Os isolados foram cultivados em meio mínimo, meio mínimo com asparagina, meio mínimo com ácido aspártico e meio mínimo com caseína hidrolisada. Esses aminoácidos foram adicionados ao meio mínimo em quatro concentrações de nitrogênio: 0,05g/l; 0,1g/l; 0,2g/l e 0,4g/l. Foram, portanto, utilizados 10 meios de cultura (quatro concentrações de asparagina, quatro concentrações de ácido aspártico, meio mínimo e meio mínimo com caseína hidrolisada). Os três isolados foram testados com três repetições, resultando em 90 placas de Petri com os tratamentos.

A repicagem, a incubação e o delineamento experimental foram os mesmos da etapa anterior. A avaliação do crescimento deu-se aos 7 dias a partir da repicagem dos isolados.

e) Quinta etapa

Como última etapa deste trabalho, todos os isolados relacionados na Tabela 1, com exceção do 5, foram repicados para meio mínimo. Assim, foram utilizados 23 isolados com três repetições, resultando em 69 placas de Petri contendo meio mínimo com os isolados. Novamente a repicagem, a incubação e o delineamento experimental foram os mesmos da etapa anterior. A avaliação do crescimento foi efetuada aos 7 dias a partir da repicagem.

Foi realizada análise de variância dos resultados obtidos nos ensaios da primeira à quarta etapa seguindo-se um esquema fatorial meios X isolados. Na quinta etapa a avaliação foi qualitativa. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey a 5%.

3.7. Caracterização patogênica

Essa caracterização baseou-se na patogenicidade dos isolados 5,15,19 e 22 em maçãs destacadas e em sementes e plântulas dos cultivares de algodoeiro Nu-15 e IAC-17. A escolha dos isolados foi feita após um teste preliminar de patogenicidade em maçãs destacadas do cultivar IAC-17. Foram testados 5 isolados obtidos de plantas com ramulose e 5 obtidos de plantas com antracnose, tendo sido escolhidos os dois mais patogênicos de cada grupo.

Para obtenção do inóculo, os isolados foram cultivados em meio de aveia, no escuro, a 27-29°C, durante 7 dias. Os conídios foram suspensos em água destilada e esterilizada. A concentração do inóculo foi ajustada para cerca de 10^6 conídios por ml. Para inoculação das testemunhas foi utilizada água destilada e esterilizada.

As maçãs de algodoeiro, quando atingiram 2/3 de seu desenvolvimento (com aproximadamente 20 a 25 dias de idade), foram submetidas à desinfestação através de imersão em hipoclorito de sódio a 0,05%, durante 1 minuto. Foi efetuada uma perfuração de 3mm de profundidade no centro de um lóculo de cada maçã, com uma agulha de seringa hipodérmica

de 1ml. Sobre esse ferimento foi depositada uma gota de, aproximadamente, 0,02ml da suspensão de conídios. Essas maçãs foram mantidas em câmara úmida, com o ponto de inoculação voltado para cima, até a avaliação do experimento.

O delineamento estatístico utilizado foi um fatorial $2 \times 5 \times 10$, sendo 2 cultivares, 5 tratamentos (4 isolados mais uma testemunha) e 10 repetições (cada uma representada por uma maçã), perfazendo um total de 100 maçãs.

A avaliação da patogenicidade foi efetuada 5 dias após a inoculação através da medição do diâmetro da lesão ocasionada pelos isolados inoculados.

As sementes, deslindadas com ácido sulfúrico, foram submetidas a assepsia superficial, utilizando-se uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, na qual permaneceram imersas durante 5 minutos. Essas sementes foram inoculadas através de imersão na suspensão de conídios, à semelhança da inoculação realizada por FOLLIN & MANGANO (1983), que também testaram a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* em plântulas de algodoeiro. As sementes ficaram imersas durante 2 horas em uma suspensão com cerca de 10^6 conídios/ml e, posteriormente, deixadas à sombra, para secar, durante 24 horas. Em seguida foram semeadas em vasos contendo solo esterilizado sendo os vasos mantidos em condições de casa de vegetação, sem controle de temperatura e umidade, durante o mês de setembro de 1988.

O delineamento estatístico utilizado foi um

fatorial $2 \times 5 \times 5$, sendo 2 cultivares, 5 tratamentos (4 isolados e uma testemunha) e 5 repetições. Cada repetição consistiu de dois vasos com 25 sementes cada, totalizando 250 sementes para cada tratamento.

Dez dias após o plantio foi contado o número de sementes germinadas e aos 20 dias foi realizada a avaliação final do ensaio, através da contagem de plântulas saudáveis e plântulas com lesões no colo.

Foi realizada análise de variância dos resultados obtidos com a inoculação de maçãs e sementes. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey a 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação do número de núcleos em conídios

O exame microscópico dos conídios submetidos a coloração de núcleos mostrou que eles continham apenas um núcleo. Não foram observados, em nenhum dos 6 isolados estudados, conídios com mais de um núcleo.

O tempo de exposição dos conídios ao corante Giemsa durante 2 horas foi suficiente para evidenciar de forma bem nítida os núcleos dos mesmos.

4.2. Morfologia dos apressórios

Quanto a morfologia de apressórios não houve diferença entre os isolados obtidos de lesões de ramulose e antracnose.

A germinação dos conídios ocorreu 24 horas após a suspensão dos mesmos em água. Logo após a germinação deu-se a formação dos apressórios. Estes apareceram diretamente nos conídios ou em ramos secundários curtos do tubo germinativo ou ainda diretamente nos tubos germinativos. Verificou-se nos conídios estudados a formação de um ou dois apressórios no mesmo conídio, a formação de um apressório e um tubo germinativo sem apressório e também a formação de

apenas um ou dois tubos germinativos no mesmo conídio. Foi frequente a observação de duplicação de conídios, sem ocorrência de germinação ou formação de apressório.

Quanto a forma os apressórios apresentaram-se arredondados, um pouco clavados ou lobados, quando vistos de cima. Vistos de lado tinham formato de taça. No início da formação os apressórios eram hialinos e, posteriormente, adquiriram uma coloração marrom.

4.3. Medidas de conídios

Na Tabela 2 encontra-se a distribuição da porcentagem do número de conídios dentro de classes de comprimento, dos isolados obtidos de lesões típicas de ramulose. Na Tabela 3 encontram-se os valores referentes aos isolados obtidos de sementes ou de lesões típicas de antracnose.

Verificou-se que todos os isolados retirados de lesões de ramulose apresentaram uma porcentagem de conídios com comprimento acima de $16\mu\text{m}$. O comprimento médio dos conídios variou de $16,03\mu\text{m}$ a $15,02\mu\text{m}$ e o coeficiente de variação dos comprimentos desses conídios variou de 4,82% a 11,36%.

Todos os isolados retirados de lesões de antracnose tiveram os conídios com comprimento menor ou igual a $16\mu\text{m}$. O comprimento médio dos conídios variou de $14,82\mu\text{m}$ a $12,53\mu\text{m}$ e o coeficiente de variação dos comprimentos desses conídios variou de 5,28% a 9,05%.

Tabela 2. Distribuição da frequência dos comprimentos dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* da ramulose

Isolados	Porcentagem de conídios por classe de comprimento (em μm)								Média** (em μm)	CV(%)
	12*	13	14	15	16	17	18	19		
14	1	1	17	26	18	13	17	7	16,03	9,98
3	0	0	0	26	57	14	3	0	15,93	4,82
5	0	0	6	32	41	10	10	1	15,90	6,35
19	4	1	16	24	23	15	14	3	15,87	11,36
7	0	2	5	32	38	13	8	2	15,86	6,86
13	0	0	9	50	30	7	4	0	15,51	5,67
18	0	0	13	43	33	7	4	0	15,42	5,64
8	0	0	16	37	39	8	0	0	15,38	5,18
16	0	0	16	44	23	9	8	0	15,20	5,26
20	1	11	19	27	32	8	2	0	15,02	9,85
Média	0,6	1,5	11,7	34,1	33,4	10,4	7,0	1,3		

* Cada classe de comprimento agrupa valores em intervalos compreendidos entre 0,4 μm abaixo e 0,5 μm acima do número inteiro.

** Média de 100 conídios

Tabela 3. Distribuição da frequência dos comprimentos dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* da antracnose

Isolados	Porcentagem de conídios por classe de comprimento (em μm)					Média** (em μm)	CV(%)
	12*	13	14	15	16		
17	0	4	35	41	20	14,82	5,31
10	0	11	35	42	12	14,56	5,52
23	0	10	41	41	8	14,46	5,28
15	6	20	37	26	11	14,19	8,30
24	2	21	45	23	9	14,15	6,20
21	2	18	45	32	3	14,11	5,96
9	12	21	30	20	17	14,04	9,05
2	10	29	42	13	6	13,76	7,08
12	10	37	36	11	6	13,60	7,86
4	53	30	16	1	0	12,53	7,33
Média	9,5	20,1	36,2	25,0	9,2		

* Cada classe de comprimento agrupa valores em intervalos compreendidos entre 0,4 μm abaixo e 0,5 μm acima do número inteiro.

** Média de 100 conídios

Na Tabela 4 encontra-se a distribuição da porcentagem do número de conídios dentro de classes de largura dos isolados obtidos de lesões de ramulose e na Tabela 5 os valores referentes aos isolados obtidos de sementes ou lesões de antracnose.

Foi observada uma variação de largura de $4,35\mu\text{m}$ a $3,84\mu\text{m}$ para os isolados de lesões de ramulose. O coeficiente de variação da largura dos conídios variou de 4,99% a 9,56%.

A largura média dos conídios retirados de lesões de antracnose variou de $4,31\mu\text{m}$ a $3,88\mu\text{m}$ e o coeficiente de variação da largura de 5,49% a 13,21%.

Observou-se que as larguras dos conídios dos dois fungos são semelhantes. Em relação ao comprimento verificou-se uma frequência maior de conídios mais longos nos isolados de ramulose.

4.4. Caracterização auxanográfica

a) Primeira etapa

Na Tabela 6 encontram-se os resultados de crescimento diametral das colônias de três isolados de *Colletotrichum* obtidos de lesões de ramulose (5, 7 e 14) em meio mínimo, meio mínimo suplementado com extrato de levedura, meio mínimo suplementado com caseína hidrolisada e meio completo.

Tabela 4. Distribuição da frequência das larguras dos conídios isolados de *Colletotrichum* da ramulose

Isolados	Porcentagem de conídios por classe de largura (em μm)			Média** (em μm)	CV(%)
	3*	4	5		
16	0	75	25	4,35	7,77
19	0	76	24	4,28	9,47
20	0	87	13	4,13	8,83
18	0	92	8	4,06	7,59
14	8	84	8	4,05	9,56
8	0	100	0	4,04	4,99
3	3	95	2	3,99	7,33
5	0	100	0	3,96	7,07
13	0	100	0	3,89	5,73
7	11	89	0	3,84	8,96
Média	2,2	89,9	8,0		

* Cada classe de largura agrupa valores em intervalos compreendidos entre 0,4 μm abaixo e 0,5 μm acima do número inteiro.

** Média de 100 conídios

Tabela 5. Distribuição da frequência das larguras dos conídios dos isolados de *Colletotrichum* da antracnose

Isolados	Porcentagem de conídios por classe de largura (em μm)			Média** (em μm)	CV(%)
	3*	4	5		
24	0	75	25	4,31	8,74
4	1	75	24	4,27	10,10
15	10	63	27	4,22	13,21
2	0	81	19	4,18	8,98
9	5	90	5	4,01	8,98
21	0	100	0	3,96	5,49
17	0	99	1	3,94	6,30
12	2	98	0	3,92	5,73
10	4	89	7	3,91	7,27
23	0	100	0	3,88	5,59
Média	2,2	87,0	10,8		

* Cada classe de largura agrupa valores em intervalos compreendidos entre 0,4 μm abaixo e 0,5 μm acima do número inteiro.

** Média de 100 conídios.

Tabela 6. Efeito da suplementação do meio mínimo com extrato de levedura e caseína hidrolisada sobre o crescimento de *Colletotrichum* da ramulose.

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	5	7	14	
MM	0,00	0,00	0,00	0,00
EL	23,33	15,33	19,33	19,33 b
CH	50,67	58,00	58,67	55,78 a
MC	57,33	55,33	62,67	58,44 a

CV = 6,81%; Δ Tukey 5% = 6,29.

¹ MM: meio mínimo; EL: meio mínimo + extrato de levedura; CH: meio mínimo + caseína hidrolisada; MC: meio mínimo + extrato de levedura + caseína hidrolisada.

² Média de 3 repetições, avaliação feita aos 7 dias de idade.

³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Obs.: Para efeito de análise estatística o crescimento dos isolados em MM não foi considerado.

Nessa primeira etapa verificou-se que os isolados obtidos de lesões de ramulose não cresceram em meio mínimo. Quando as médias dos isolados foram comparadas estatisticamente verificou-se que o meio mínimo suplementado com extrato de levedura proporcionou um crescimento de colônias menor que o meio mínimo com caseína hidrolisada e que o meio completo. Estes foram iguais entre si.

Na Tabela 7 encontram-se os resultados de crescimento diametral das colônias de três isolados de *Colletotrichum* obtidos de sementes ou lesões de antracnose (4, 9 e 15), nos mesmos meios de cultura.

Os isolados do fungo causador da antracnose, ao contrário dos isolados do causador da ramulose, cresceram em meio mínimo, mesmo após a segunda repicagem nesse meio. O meio mínimo proporcionou o menor crescimento e diferiu dos outros meios; o meio completo proporcionou o maior crescimento. Os meios mínimo com extrato de levedura e mínimo com caseína hidrolisada apresentaram crescimentos intermediários.

b) Segunda etapa

Na segunda etapa do trabalho foram testados grupos de aminoácidos para a verificação do crescimento de três isolados de *Colletotrichum* causador de ramulose (Tabela 8). Os aminoácidos do grupo III não proporcionaram o crescimento dos isolados. O meio mínimo com caseína hidrolisada

Tabela 7. Efeito da suplementação do meio mínimo com extrato de levedura e caseína hidrolisada sobre o crescimento de *Colletotrichum* da antracnose.

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	4	9	15	
MM	70,67	65,33	62,67	66,22 c
EL	84,00	72,00	72,00	76,00 ba
CH	75,33	71,33	69,33	72,00 b
MC	81,33	80,00	78,00	79,78 a

CV = 4,73%; Δ Tukey 5% = 4,52

¹ MM: meio mínimo; EL: meio mínimo + extrato de levedura; CH: meio mínimo + caseína hidrolisada; MC: meio mínimo + extrato de levedura + caseína hidrolisada.

² Média de 3 repetições, avaliação feita aos 7 dias de idade.

³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 8. Efeito da suplementação do meio mínimo com aminoácidos sobre o crescimento de *Colletotrichum* da ramulose.

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	5	7	14	
MM	0,00	0,00	0,00	0,00
MM + I	20,00	16,33	17,67	18,02 c
MM + II	32,33	23,67	17,00	24,33 b
MM + III	0,00	0,00	0,00	0,00
MM + CH	70,33	84,33	76,33	77,00 a

CV = 7,65%; Δ Tukey 5% = 6,24

¹ MM: meio mínimo; I: DL - alanina, L - arginina, L - ácido glutâmico, glicina, L - prolina e L - tirosina; II: L asparagina, DL - ácido aspártico, DL - isoleucina, DL - leucina, DL - fenilalanina e DL - serina; III: DL - valina, DL - treonina, L - histidina, L - lisina, DL - metionina e DL - triptofano; CH: caseína hidrolisada.

² Média de 3 repetições, avaliação feita aos 7 dias de idade.

³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Obs.: Para efeito de análise estatística o crescimento dos isolados em MM e MM + III não foi considerado.

foi o melhor tratamento. Os aminoácidos dos grupos I e II proporcionaram o crescimento dos isolados, sendo o grupo II melhor que I. Também proporcionaram crescimento inferior a meio mínimo suplementado com caseína hidrolisada. Em meio mínimo os isolados apresentaram o mesmo comportamento verificado na primeira etapa (Tabela 6).

c) Terceira etapa

Os resultados da terceira etapa estão na Tabela 9. Os meios que propiciaram maior crescimento para os três isolados obtidos de lesões de ramulose foram: MM + I, MM + I-A, MM + I-C, MM + I-F e MM + II-J e os que propiciaram menor crescimento foram: MM + II e MM + II-L. Os meios MM + II-G e MM + II-H não apresentaram crescimento de nenhum dos três isolados.

d) Quarta etapa

Na quarta etapa deste trabalho foram estudados a asparagina e o ácido aspártico como fontes de aminoácidos para os três isolados do fungo causador de ramulose (Tabela 10). Entre os meios de cultura, o meio mínimo com caseína hidrolisada (CH) destacou-se como o melhor e diferiu de todos os demais. Os meios mínimos com asparagina em concentração de 0,4g/l (4AS) e 0,2g/l (2AS) de nitrogênio destacaram-se entre os meios com asparagina ou ácido aspártico. Os meios mínimos com asparagina nas concentrações de

Tabela 9. Efeito da omissão de aminoácidos, isoladamente, de meio mínimo suplementado com grupos de aminoácidos, sobre o crescimento de *Colletotrichum* da ramiplose

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	5	7	14	
MM + I	41,7	56,5	44,7	47,0 a
MM + I-A	51,7	60,3	30,3	47,43 a
MM + I-B	51,0	45,7	38,3	45,00 ab
MM + I-C	58,3	54,7	39,0	50,67 a
MM + I-D	47,3	50,0	33,7	43,67 abc
MM + I-E	37,3	34,0	37,3	36,33 bcd
MM + I-F	77,3	33,7	29,7	46,90 a
MM + II	33,7	25,7	23,7	27,70 d
MM + II-G	0,0	0,0	0,0	0,00
MM + II-H	0,0	0,0	0,0	0,00
MM + II-I	37,7	35,7	27,3	35,57 bcd
MM + II-J	52,0	58,3	32,0	47,43 a
MM + II-L	33,0	37,7	31,0	33,90 d
MM + II-M	37,7	34,7	31,0	34,47 cd

CV = 14,72%; Δ Tukey 5% = 9,69

continua ...

Tabela 9. Continuação

¹ I: DL-alanina, L-ácido glutâmico, L-arginina, glicina, L-prolina e L-tirosina.

A: DL-alanina; B: L-ácido glutâmico; C: L-arginina; D: glicina; E: L-prolina; F: L-tirosina.

II: L-asparagina, DL-ácido aspártico, DL-isoleucina, DL-leucina, DL-fenilalanina e DL-serina.

G: L-asparagina; H: DL-ácido aspártico; I: DL-isoleucina; J: DL-leucina; L: DL-fenilalanina; M: DL-serina.

² Média de 3 repetições, avaliação feita aos 20 dias de idade.

³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Obs.: Para efeito de análise estatística o crescimento dos isolados em MM + II-G e MM + II-H não foi considerado.

Tabela 10. Efeito da suplementação do meio mínimo com diferentes concentrações de asparagina e ácido aspártico sobre o crescimento de *Colletotrichum* da ramulose

Meios ¹	Crescimento diametral dos isolados (em mm) ²			Média ³
	7	14	20	
CH	74,2	57,0	90,0	73,70 a
4AS	50,0	34,5	80,0	54,83 b
2AS	57,0	27,8	87,5	57,43 b
AS	56,5	26,2	80,0	54,23 bc
AS/2	51,2	26,0	63,2	46,80 de
4AC	0,0	0,0	0,0	0,00
2AC	53,5	23,2	72,8	49,83 cd
AC	45,0	19,8	68,2	44,33 c
AC/2	36,8	18,0	63,5	39,43 f
MM	0,0	0,0	0,0	0,00

CV = 6,84%; Δ Tukey 5% = 4,59.

¹ CH: caseína hidrolisada; AS/2, AS, 2AS e 4AS: meio mínimo + asparagina em concentração de nitrogênio igual a 0,05g/l; 0,1g/l; 0,2g/l e 0,4g/l, respectivamente; AC/2, AC, 2AC e 4AC: meio mínimo + ácido aspártico em concentração de nitrogênio igual a 0,05g/l; 0,1g/l; 0,2g/l e 0,4g/l, respectivamente; MM: meio mínimo.

² Média de 4 repetições, avaliação feita aos 7 dias de idade.

³ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Obs.: Para efeito análise estatística o crescimento dos isolados em 4AC e MM não foi considerado.

0,1g/l (AS) e 0,05g/l (AS/2) de nitrogênio e meio mínimo com ácido aspártico na concentração de 0,2g/l (2AC) de nitrogênio foram intermediários, enquanto que os meios mínimos com ácido aspártico nas concentrações de 0,1g/l (AC) e 0,05g/l (AC/2) de nitrogênio foram os que proporcionaram menor crescimento aos isolados de *Colletotrichum*. O fungo não cresceu no meio mínimo com ácido aspártico na concentração de 0,4g/l (4AC) de nitrogênio e meio mínimo (MM).

e) Quinta etapa

Na última etapa deste trabalho foi estudado o crescimento em meio mínimo de todos os isolados relacionados na Tabela 1 (menos o número 5). Observou-se que todos os isolados do fungo causador de ramulose não cresceram nesse meio e todos os isolados do fungo causador de antracnose apresentaram crescimento em meio mínimo.

4.5. Caracterização patogênica

Na Tabela 11 são apresentados os resultados da inoculação de maçãs destacadas de dois cultivares de algodoeiro, com dois isolados obtidos de lesões de ramulose e dois isolados obtidos de lesões de antracnose. Observou-se que o tamanho médio das lesões nas maçãs do cultivar Nu-15 foi menor que no cultivar IAC-17.

A comparação entre as médias dos tamanhos das

Tabela 11. Efeito da inoculação de *Colletotrichum* da antracnose e ramulose em maçãs destacadas de algodoeiro

Isolados ¹	Diâmetro das lesões em maçãs destacadas(em mm) ²		Média ³
	CULTIVARES		
	Nu-15	IAC-17	
Testemunha	0,0	0,0	0,00
5-R	4,3 bc	5,6 b	4,95 b
19-R	2,2 c	8,2 ab	5,20 b
15-A	8,3 ab	6,9 ab	7,60 ab
22-A	9,2 a	12,4 a	10,80 a
Média ³	6,00 B	8,28 A	

CV = 29,55%.

¹ R = isolado de ramulose; A = isolado de antracnose

² Média de 10 repetições. Avaliação realizada aos 5 dias após a inoculação.

³ Para efeito de análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (Δ Tukey 5% = 0,64), ou maiúscula na linha (Δ Tukey 5% = 0,34) não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Obs.: O mesmo ocorre para médias dentro de cada cultivar (Δ Tukey 5% = 0,91).

lesões em maçãs destacadas causadas pelos isolados nos dois cultivares mostrou que o mais patogênico desses isolados foi o 22-A, que diferiu estatisticamente dos isolados 5-R e 19-R. O isolado 15-A foi intermediário. Dentro do cultivar Nu-15 o mais patogênico foi o isolado 22-A e o menos patogênico o 19-R. Os isolados 15-A e 5-R foram intermediários, sendo o primeiro mais patogênico que o segundo. Dentro do cultivar IAC-17 o mais patogênico foi o isolado 22-A e o menos patogênico o 5-R. Os isolados 15-A e 19-R foram intermediários.

Comparando-se as médias de porcentagem de germinação entre os tratamentos inoculados com os quatro isolados de *Colletotrichum* (Tabela 12), observou-se que sementes das plantas da testemunha tiveram a mesma germinação que as sementes inoculadas com o isolado 15-A. A menor germinação de sementes foi observada no tratamento com o isolado 22-A. O tratamento com o isolado 19-R apresentou germinação superior ao do isolado 22-A. O tratamento com o isolado 5-R foi intermediário entre a testemunha e 19-R. O cultivar IAC-17 apresentou melhor média de germinação de sementes, diferindo estatisticamente de Nu-15.

Na Tabela 13 estão relacionadas as porcentagens de plântulas doentes dos cultivares Nu-15 e IAC-17, aos 20 dias após a semeadura. Essas plântulas originaram-se de sementes inoculadas com os isolados de *Colletotrichum*.

Comparando-se a patogenicidade desses isolados, verificou-se que os isolados 19-R e 22-A foram estatisticamente

Tabela 12. Efeito da inoculação de *Colletotrichum* da antracnose e ramulose em sementes de algodoeiro, na germinação das sementes.

Isolados ¹	Porcentagem de germinação em solo ²		Média ³
	CULTIVARES		
	Nu-15	IAC-17	
Testemunha	68,40	79,60	74,00 c
5-R	63,60	71,60	67,60 bc
19-R	47,60	71,20	59,40 b
15-A	66,40	79,60	73,00 c
22-A	43,20	51,20	47,20 a
Média ³	57,84 A	70,64 B	

CV = 10,32%.

¹ R = isolado de ramulose; A = isolado de antracnose.

² Média de 5 repetições de 50 sementes. Avaliação realizada aos 10 dias após a semeadura.

³ Para efeito de análise estatística os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{x/100}$. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (Δ Tukey 5% = 7,07), ou maiúscula na linha (Δ Tukey 5% = 3,17) não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Tabela 13. Efeito da inoculação de *Colletotrichum* da antracnose e ramulose em sementes de algodoeiro, sobre as plântulas originárias dessas sementes.

Isolados ¹	Porcentagem de plântulas doentes ²		Média ³
	CULTIVARES		
	Nu-15	IAC-17	
Testemunha	31,60	20,40	26,00 d
5-R	70,00	54,80	62,40 c
19-R	97,60	82,40	90,00 a
15-A	82,40	77,60	80,00 b
22-A	98,40	92,80	95,60 a
Média ³	76,00 A	65,60 B	

CV = 11,15%.

¹ R = isolado de ramulose; A = isolado de antracnose

² Média de 5 repetições de 50 sementes. Avaliação realizada aos 20 dias após a semeadura.

³ Para efeito de análise estatística os dados foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (Δ Tukey 5% = 8,62), ou pela mesma letra maiúscula na linha (Δ Tukey 5% = 3,86) não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

ticamente iguais e mais patogênicos que os outros dois; o isolado 15-R foi intermediário e o isolado 5-R foi o menos patogênico. Todos diferiram da testemunha.

O cultivar Nu-15 apresentou uma maior porcentagem de plântulas doentes e diferiu estatisticamente de IAC-17.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos conídios

A presença de apenas um núcleo em conídios de *Colletotrichum* isolados de lesões de ramulose e antracno se torna-os semelhantes sob esse aspecto. Diversos autores também observaram um único núcleo em conídios de diferentes espécies de *Colletotrichum*: *C. atramentarium* (GRIFFITHS & CAMPBELL, 1973), *C. graminicola* (POLITIS & WHEELER, 1973), *C. lagenarium* (SUZUKI *et alii*, 1982) e *C. circinans* (RUSSO & PAPPELIS, 1984).

TEBEEST *et alii* (1989), realizando um estudo mais detalhado sobre a quantidade de núcleos presentes em conídios de 5 isolados de *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, *C. gloeosporioides* f. sp. *jussiaeae*, *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae*, *C. malvarum* e *C. coccodes*, mostraram que em todos os 5 isolados, quando cultivados em meio YPSS ágar de Emerson, 97,7% ou mais dos conídios eram uninucleados, 0,4% a 2,2% binucleados e menos de 1% continham três núcleos. Também verificaram uma maior variação no número de núcleos, quando os isolados foram cultivados em meio líquido.

Estudos preliminares com *C. gloeosporioides* realizados por TEBEEST *et alii* (1989) demonstraram que o nú

mero de núcleos desta espécie era dependente das condições culturais. Isso pode explicar a não observação de mais de um núcleo nos conídios dos isolados estudados neste trabalho.

Com relação a dimensão de conídios os resultados obtidos neste trabalho mostram que ocorre uma variação entre comprimentos de conídios de isolados de *Colletotrichum* obtidos de lesões de ramulose e de lesões de antracnose. Comparando-se os dados da Tabela 2 com os dados da Tabela 3, pode-se verificar que todos os isolados do fungo causador de ramulose apresentaram um comprimento médio maior que os isolados do fungo causador de antracnose. Mas, alguns isolados do fungo causador de ramulose, de menor comprimento médio de conídios, podem ser difíceis de serem distinguidos de isolados do fungo causador de antracnose de maior comprimento médio de conídios.

FOLLIN & MANGANO (1983) compararam um isolado de *Colletotrichum* causador de ramulose com um de antracnose e observaram que os fungos foram semelhantes, com comprimento médio de 15 a 16 μ m variando de 10 a 20 μ m. Neste trabalho não foram encontrados conídios de comprimento menor de 12 μ m ou maior de 19 μ m em isolados de antracnose; e menor de 12 μ m ou maior de 16 μ m em isolados de ramulose.

Foram observadas três classes de medidas de comprimento de conídios com variações marcantes na frequência (média de 10 isolados) e que poderiam auxiliar na diferenciação desses fungos (Tabela 2 e 3). Essas medidas fo-

ram: 13, 14 e 16µm. O fungo causador de ramulose apresentou apenas 1,5% de conídios com comprimento de 13µm enquanto o causador de antracnose apresentou 20,1% de conídios com esse comprimento; o primeiro teve 11,7% de conídios com comprimento de 14µm enquanto o segundo teve 36,2%; o primeiro teve 33,4% de conídios com comprimento de 16µm e o segundo apenas 9,2% de conídios com esse comprimento. Apenas o *Colletotrichum* causador da ramulose apresentou 18,7% dos conídios com comprimento acima de 16µm.

Com relação à largura dos conídios, os fungos apresentaram uma variação de 3 a 5µm (Tabelas 4 e 5) sendo muito semelhantes entre si, não podendo, portanto, ser usada essa característica para separação dos isolados do fungo causador da ramulose e da antracnose.

Baseado nas dimensões dos conídios, os dois fungos estudados neste trabalho podem ser encaixados na espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, caracterizada por ARX (1957). Esse autor agrupou nessa espécie todas as espécies de *Colletotrichum* de conídios elipsóides com comprimento de 12 a 19µm e largura de 1 a 6µm.

Os apressórios do agente causal da ramulose foram muito semelhantes aos do agente causal da antracnose. Não foi observada nenhuma característica marcante que os pudesse diferenciar e foram também semelhantes aos descritos por ARX (1957) para a espécie *C. gloeosporioides*. Não se repetiu aqui a importância da morfologia do apressório na se-

paração das espécies, como aconteceu em *Colletotrichum graminicola* (SUTTON, 1968).

5.2. Caracterização auxanográfica

As comparações auxanográficas mostraram que os isolados de lesões de ramulose não cresceram em meio mínimo. O crescimento desses isolados em meio mínimo com caseína hidrolisada foi muito semelhante, e estatisticamente igual, a meio completo. Isto indicou uma deficiência em aminoácidos (Tabela 6).

O meio mínimo suplementado com asparagina ou ácido aspártico promoveu o crescimento dos isolados do fungo da ramulose (Tabela 10). Portanto, esses isolados comportaram-se como deficientes em asparagina ou ácido aspártico, o que difere dos resultados obtidos por FOLLIN & MANGANO (1983), pois esses autores observaram que um isolado de ramulose foi parcialmente deficiente em tiamina e biotina.

Para os isolados de lesões de antracnose os resultados foram semelhantes: tanto o isolado utilizado por FOLLIN & MANGANO (1983) como os três isolados utilizados neste trabalho foram auxoautotróficos para fatores de crescimento. A comparação dos resultados deste trabalho com o resultado obtido por FOLLIN & MANGANO (1983), para os isolados do fungo causador da ramulose, deve ser feita com ressalvas pois uma deficiência parcial como a observada pelos autores pode ser relativamente pronunciada, dependendo dos fatores externos. No entanto, uma deficiência completa, nor

malmente, não é dependente de condições culturais (FRIES, 1965).

A maioria dos autores concorda que asparagina e ácido aspártico são as duas melhores fontes de nitrogênio para fungos (COCHRANE, 1958). CARVALHO (1971), estudando fontes de nitrogênio para *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, verificou que a asparagina foi uma das melhores para o crescimento vegetativo desse fungo.

O ácido aspártico e a asparagina foram capazes de promover o crescimento dos isolados de *Colletotrichum* causador da ramulose, todavia diferentes doses desses aminoácidos promoveram crescimentos diferentes. A asparagina, geralmente, foi superior ao ácido aspártico e doses decrescentes desses aminoácidos proporcionaram crescimentos decrescentes (Tabela 10). Segundo COCHRANE (1958) é conhecido que a asparagina é mais ativa do que o aspartato como um doador de grupo amina na reação de transaminação. A dosagem de 0,4g/l de nitrogênio fornecido pelo ácido aspártico mostrou-se tóxica ao fungo, pois impediu o seu crescimento. Toxicidade de ácido aspártico também foi detectada por VISHNIAC (1955) em um isolado de *Labyrinthula* sp.

Com relação à taxonomia, de acordo com FRIES (1965), estudos realizados por vários autores mostraram que, geralmente, as espécies de fungos são homogêneas quanto ao tipo de auxoheterotrofia e essa característica pode ser usada auxiliando a identificação de espécies de fungos. Alguns trabalhos mostram essa característica (GEORG, 1952; VISH-

NIAC, 1955; GEORG & CAMP, 1957 e KIMATI, 1975). Outros trabalhos (ANDES & KEITT, 1950 e Robbins, citado por ZENTMYER, 1980) não confirmam a suposição de FRIES (1965). Mas segundo esse autor, a capacidade de sintetizar um certo fator de crescimento pode mudar com o tempo em um isolado como uma mudança na genética ou mecanismos metabólicos das células. A biossíntese de cada fator de crescimento é controlada por numerosos genes e qualquer mutação nesses genes pode, portanto, impedir ou bloquear a produção do fator em questão. Nesse caso, os isolados de *Glomerella cingulata*, um parcialmente deficiente em tiamina e outro parcialmente deficiente em biotina, detectados por ANDES & KEITT (1955), poderiam ser mutantes de isolados auxoautotróficos. Tanto nesse caso como no caso de *Phytophthora cinnamomi* (Robbins, citado por ZENTMYER, 1980) onde a deficiência em tiamina é comum a outras espécies de *Phytophthora*, não se poderia utilizar a característica de auxoautotrofia ou auxoheterotrofia para a identificação das espécies.

Neste trabalho os três isolados de *Colletotrichum* da ramulose mostraram uniformidade quanto a auxoheterotrofia em asparagina ou ácido aspártico. Segundo FRIES (1965), a reversão de auxoheterotrofia para auxoautotrofia parece ser um fenômeno muito raro e essa característica pode auxiliar na identificação de espécies de fungos. Portanto, baseado nesse autor pode-se dizer que essa deficiência detectada no agente causal da ramulose pode ser uma evidência biológica de diferenciação desse fungo com o agente cau

sal da antracnose.

Essa característica não basta para definir-se esses dois fungos como de espécies diferentes. A diferenciação fisiológica entre eles não inviabiliza a hipótese de que o fungo causador da ramulose tenha se originado do causador da antracnose, podendo esses isolados auxoheterotróficos serem mutantes daqueles auxoautotróficos. COSTA & FRAGA JUNIOR (1939), quando denominaram o agente causal da ramulose, já haviam considerado essa possibilidade.

5.3. Caracterização patogênica

Verificou-se, na Tabela 11, que no cultivar mais resistente à ramulose (IAC-17), um isolado do fungo causador da antracnose (22-A) foi o mais patogênico e um da ramulose (5-R) o menos patogênico, mas os outros dois, um isolado da antracnose (15-A) e outro da ramulose (19-R) apresentaram uma patogenicidade intermediária.

Portanto, os resultados coincidiram apenas parcialmente com os obtidos por FOLLIN & MANGANO (1983) que observaram que um isolado do fungo causador da antracnose foi mais patogênico a maçãs destacadas de algodoeiro, que um da ramulose. Mas, quando se trabalhou com maçãs destacadas de um cultivar suscetível à ramulose (Nu-15), os resultados deste trabalho foram semelhantes aos de FOLLIN & MANGANO (1983). Os dois isolados do fungo causador da antracnose foram mais patogênicos do que os dois isolados do causa-

dor da ramulose.

As maçãs do cultivar IAC-17 apresentaram lesões maiores do que do cultivar Nu-15, mostrando que a resistência à ramulose não indica resistência de maçãs ao agente da doença (Tabela 11).

Baseado na porcentagem de germinação de sementes inoculadas ou não (Tabela 12), verificou-se que a germinação das sementes oriundas do tratamento inoculado com o isolado 15-A foi igual a testemunha não inoculada, não afetando portanto, a emergência das plântulas. Os isolados 22-A e 19-R tiveram um efeito na diminuição da germinação das sementes, causando "damping-off" de pré-emergência. O isolado 5-R apresentou uma patogenicidade intermediária, causando uma pequena diminuição na germinação das sementes. Sendo assim, neste trabalho houve um efeito dos dois isolados do fungo causador da ramulose e de um isolado do causador da antracnose na germinação das sementes, fato não observado por FOLLIN & MANGANO (1983).

Pelos dados apresentados na Tabela 13 pode-se verificar que houve outros fatores influenciando no aparecimento das lesões nas plântulas do ensaio pois a testemunha apresentou 26% de plântulas doentes no final do experimento (média entre os dois cultivares). O isolado 22-A continuou sendo o mais patogênico com 95,6% de plântulas doentes, seguido do isolado 19-R. O menos patogênico foi o isolado 5-R seguido do isolado 15-A. Como estatisticamente não houve interação entre efeito de isolados e cultivares, as médias re

fletiram as características dos tratamentos.

Verificou-se, portanto, uma variação de patogenicidade, com isolados do fungo causador da ramulose intercalando-se com isolados do fungo causador da antracnose tanto no cultivar Nu-15 como no cultivar IAC-17.

De acordo com os dados apresentados neste trabalho, os resultados obtidos por FOLLIN & MANGANO (1983) onde um isolado do agente causador de antracnose foi mais patogênico a plântulas de algodoeiro do que um isolado do agente causador de ramulose, não pode ser utilizado como regra para identificação desses fungos.

ULLSTRUP (1938), estudando patogenicidade de isolados monoconidiais de *Colletotrichum gossypii*, avaliou "damping-off" de pré e pós-emergência e observou uma grande variação de índice de doença causada por diferentes isolados desse fungo. Essa mesma variação foi observada por LIMA (1981) quando estudou *C. gossypii* var. *cephalosporioides*.

Uma planta resistente ao superbrotamento não é necessariamente, resistente ao tombamento, segundo LIMA (1981). No presente trabalho foi observado que o cultivar Nu-15 apresentou maior porcentagem de plântulas doentes em todos os tratamentos inoculados com dois isolados de ramulose e dois isolados de antracnose (Tabela 13). Os sintomas em maçãs, ao contrário, foram mais fortes em 'IAC-17' do que em 'Nu-15' (Tabela 11).

Com relação a taxonomia verificou-se que é

possível utilizar patogenicidade em maçãs destacadas do cul
tivar Nu-15 (suscetível à ramulose) para auxiliar na iden-
tificação dos agentes causais de ramulose e antracnose.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. Os agentes causadores da ramulose e antracnose estudados aqui são semelhantes nos seguintes aspectos:

- a) número de núcleos nos conídios;
- b) morfologia dos apressórios;
- c) patogenicidade em maçãs destacadas do cultivar IAC-17 e em plântulas dos cultivares de algodoeiro Nu-15 e IAC-17.

2. Os agentes causadores da ramulose e antracnose são diferentes nos seguintes aspectos:

- a) o fungo causador da ramulose apresenta conídios de comprimentos maiores que o causador da antracnose;
- b) o fungo causador da ramulose é deficiente em asparagina ou ácido aspártico e o causador da antracnose é auxoautotrófico para fatores de crescimento;
- c) o fungo causador da antracnose é mais patogênico a maçãs destacadas do cultivar Nu-15 do que o fungo causador da ramulose;

O estudo das características morfológicas, fi

siológicas e patogênicas, isoladamente ou em conjunto, permite a caracterização de isolados dos agentes causadores da antracnose e da ramulose do algodoeiro, todavia os dados obtidos são insuficientes para a separação dos dois em duas espécies de *Colletotrichum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, J. A manifestação tardia da "ramulose" ou "superbrotamento" do algodoeiro. *O Biológico*, São Paulo, 18: 135-138, 1952.
- ABRAHÃO, J. Combate à ramulose tardia do algodoeiro. *O Biológico*, São Paulo, 27:121-123, 1961.
- ABRAHÃO, J. & COSTA, A.S. Instruções para conhecimento da "ramulose" do algodoeiro. *O Biológico*, São Paulo, 15: 59-60, 1949.
- ANDES, J.O. & KEITT, G.W. Variability of *Glomerella cingulata* (Stonem.) S. & V. S. from apples. *Phytopathology*. Lancaster, 40:915-925, 1950.
- ARX, J.A. von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 29:413 - 468, 1957.
- BALMER, E.; SALGADO, C.; CIA, E.; CAMPOS, H. Efeito do potencial de inóculo de *Colletotrichum gossypii* South. sobre o tombamento das mudinhas do algodoeiro. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz*, Piracicaba, 23:325-328, 1966.

- BARROS, J.P. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidem) Winter. Piracicaba, 1977. 81p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP).
- BEADLE, G.W. & TATUM, E.L. *Neurospora*. II. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. *American Journal of Botany*, Baltimore, 32:678-686, 1945.
- BITANCOURT, A.A. A anthracnose e as falhas no plantio de algodão. *O Biológico*, São Paulo, 1:402-404, 1935.
- CARVALHO, I. Aspectos fisiológicos do fungo *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Piracicaba, 4: 1-2, 1971.
- CARVALHO, L.P.; CAVALCANTI, F.B.; LIMA, E.F.; CARVALHO, J. M.F. Determinação de método de amostragem na avaliação de ramulose no algodoeiro em condições de campo sob infecção natural. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 6: 403-407, 1981.
- CARVALHO, L.P. de & LIMA, E.F. Influência da ramulose nas características de produção e fibra do algodoeiro *G. hirsutum* L. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 2., Salvador, 1982. *Resumo dos trabalhos*. Campina Grande. EMBRAPA-CNPA, 1982. p. 233.

- CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, E.F. CARVALHO, O.S.; CARVALHO, L. P. de. Identificação de fonte de resistência à ramulose em linhagens de algodoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 4., Belém, 1986. *Resumo dos trabalhos*. Campina Grande, EMBRAPA-CNPA, 1986. p. 105.
- CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, E.F.; VIEIRA, R. de M.; CARVALHO, L.P. de. Controle do tombamento do algodoeiro através do tratamento de sementes com fungicidas sistêmicos em pó e dissolvidos em água. *Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão - 1983/1984*. Campina Grande, EMBRAPA-CNPA, 1985. p. 178-181.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Oxford, 66:283-284, 1939.
- CIA, E. ; FUZATTO, M.G.; GRIDI-PAPP, I.L.; SOAVE, J.; CIONE, J. Avaliação da incidência de ramulose do algodoeiro através de inoculação artificial. In: REUNIÃO NACIONAL DO ALGODÃO, 2., Salvador, 1982. *Resumo dos trabalhos*. Campina Grande, EMBRAPA-CNPA, 1982. p. 241.
- COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1958. 524 p.
- COSTA, A.S. & FRAGA JÚNIOR, C.G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. *Boletim Técnico. Instituto Agrônomo de Campinas*. Piracicaba 29:1-15, 1937.

- COSTA, A.S. & FRAGA JÚNIOR, C.G. Sôbre a natureza da ramulose ou superbrotamento do algodoeiro. *Jornal de Agronomia*, São Paulo, 2:151-160, 1939.
- CRUZ, B.P.B.; SILVEIRA, A.P.da; ABRAHÃO, J.; SILVEIRA, S.G.P. da. Comportamento de variedades de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) com vistas aos fungos *Colletotrichum gossypii* South. e *Rhizoctonia solani* Kuehn., causadores do estiolamento das sementeiras. *O Biológico*, São Paulo, 36: 221-228, 1970.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método Castellani para a conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, 33:9-15, 1967.
- FOLLIN, J.C. & MANGANO, V. Etude sur la ramulose du cotonnier. Comparasion du *Colletotrichum* responsable à *C. gossypii* South. Conditions d'attaques. *Cotton et Fibres Tropicales*, Paris, 38:209-213, 1983.
- FRIES, N. The chemical environment for fungal growth. 3 Vitamins and other organic growth factors. In: AINSWORTH G.C. & SUSSMAN, A.S., ed. *The Fungi An Advanced Treatise, The Fungal Cell*. New York, Academic Press, 1965, vol. 1. cap. 19, p. 491-523.
- GEORG, L.K. Cultural and nutritional studies of *Trichophyton gallinae* and *Trichophyton megnini*. *Mycologia*, Lancaster, 44:470-492, 1952.

- GEORG, L.K. & CAMP, L.B. Routine nutritional test for the identification of dermatophytes. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 74:113-121, 1957.
- GRIFFITHS, D.A. & CAMPBELL, W.P. Fine structure of conidial germination and appressorial development in *Colletotrichum atramentarium*. *Transactions of the British Mycological Society*, Cambridge, 61:529-536, 1973.
- KIMATI, H. Doenças do algodoeiro, In: GALLI, F., coord. *Manual de Fitopatologia*. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres, 1980. v.2, p. 29-48.
- KIMATI, H. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (*sensu* Arx, 1957). Piracicaba, 1975. 103p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP).
- LILLY, V.G. & BARNETT, H.L. *Physiology of the fungi*. New York McGraw Hill Book Co., 1951. 464p.
- LIMA, E.F. Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* A.S. Costa e avaliação da resistência de linhagens de algodoeiro à ramulose. Viçosa, 1981. 47p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa/UFRV).
- MARSH, P.B.; GUITHRIE, L.R.; BOLLENBACHER, K.; HARRELL, D. C. Observations on microbiological deterioration of cotton fiber during the period of boll opening in 1949. *Plant Disease Reporter*. Beltsville, 34:165-175, 1950.

- PELLETIER, R.L. & KEITT, G.W. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. VI. Aminoacids as sources of nitrogen. *American Journal of Botany*, Baltimore, 41:362-371, 1954.
- POLITIS, D.J. & WHEELER, H. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Physiological Plant Pathology*, Londres, 3:465-471, 1973.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics*, New York, 5:141-238, 1953.
- RUSSO, V.M. & PAPELLIS, A. Application of quantitative transmitted interference microscopy to study changes in non-germinating and germinated fungal spores. *Transactions of the British Mycological Society*. Cambridge, 83: 245-250, 1984.
- SOUTHWORTH, E.A. Anthracnose of cotton. *Journal of Mycology*, Columbus, 6:100-105, 1891.
- SUTTON, B.C. *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Fr.) Grove and *C. trichellum* (Fr. ex Fr.) Duke. *The British Mycological Society Transactions*, Cambridge, 45 :222 - 232, 1962.
- SUTTON, B.C. The appressoria of *Colletotrichum graminicola* *C. falcatum*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 46: 873-876, 1986.

- SUZUKI, K.; KUBO, Y.; FURRESAWA, I.; ISHIDA, N.; YAMAMOTO, M. Behavior of colorless appressoria in an albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 28:1210-1213, 1982.
- TEBEEST, D.O.; SHILLING, C.W.; RILLEY, L.H.; WEIDEMANN, G. J. The number of nuclei of three species of *Colletotrichum*. *Mycologia*, Lawrence, 81:147-148, 1989.
- ULLSTRUP, A.J. Variability of *Glomerella gossypii*. *Phytopathology*, Lancaster, 28:787-798, 1938.
- VISHNIAC, H.S. The nutritional requirements of isolates of *Labyrinthula* spp. *Journal of General Microbiology*, Cambridge, 12:455-463, 1955.
- ZENTMYER, G.A. Environmental and nutritional factors. In: ZENTMYER, G.A. ed. *Phytophthora cinnamomi and the Diseases It Causes*. Monograph n° 10. St. Paul, the American Phytopathological Society, 1980. p. 48-55.