FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS, PATOGENICIDADE E MORFOLOGIA DE
Hendersonula toruloidea NATTRASS, ASSOCIADA A ALGUMAS
PLANTAS FRUTÍFERAS

ANNE-LORE SCHROEDER

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo-Brasil
Dezembro, 1983

*Jesus Cristo disse: "Vinde a mim
todos os que estais cansados e
sobrecarregados, e eu vos aliviá
rei".*

(Mateus: 11:28)

A meus pais

Edelberth e Elise

irmãos

William, Rose e Carla

sobrinhos

Cintia e Humberto

MEU RECONHECIMENTO.

Aos meus afilhados

Thomas e Deborah

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa sinceros agradecimentos:

Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pela valiosa orientação e amizade.

Aos colegas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de aperfeiçoamento e apoio.

À Dr.^a Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, pela constante colaboração, importantes sugestões e amizade.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, pelos valiosos ensinamentos.

Aos Acadêmicos do Curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela compreensão e apoio.

A todos meus amigos, em especial, a Dorothea Porthun, Mônica Garcia, Marta Hiromi Taniwaki, Magali Valverde Gomes e Ana Maria Ferrari Tarallo, pelo estímulo e constante apoio.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação da ESALQ/USP, pela troca de idéias.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e da Biblioteca, especialmente, aos Srs. José Pereira Sobrinho, Armando A. de Oliveira, Pedro da Silva e Luís Carlos Veríssimo, pela amizade e colaboração prestada.

Ao Dr. Joaquim Teófilo Sobrinho, Chefe da Estação de Citricultura de Limeira, pelas facilidades concedidas para obtenção de amostras.

Ao Professor Dr. Vladimir Rodrigues Sampaio, do Departamento de Agricultura e Horticultura da ESALQ/USP, pelo material vegetal concedido e troca de idéias.

À Professora Maria Cristina Stolf Nogueira, do Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ/USP, pelas análises dos resultados dos experimento e amizade.

Ao Professor Dr. Tasso Leo Krügner, pela versão do resumo para o inglês.

Ao Dr. Francisco Benedito Libardi, pelas valiosas sugestões.

Ao Sr. Marcos Almazán Serrano, pela amizade e elaboração dos gráficos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior, pela bolsa outorgada.

À Sr.^a Tekla E. Klar, pelo serviço de datilografia.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta,
com sua colaboração, contribuíram para a realiza -
ção deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Levantamento de fungos associados à morte de ponteiros de goiabeira e figueira, e goiabas mumificadas	12
3.2. Influência de meios de cultura e ferimento do micélio no crescimento e formação de pic- nídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	13
3.3. Influência de três meios de cultura e da superposição de papel de filtro na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	15
3.4. Influência de seis meios de cultura e da su- perposição de papel de filtro na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	16
3.5. Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	18

3.6. Influência de diferentes fontes de carbono no crescimento e na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	19
3.7. Influência de diferentes níveis de carbono e nitrogênio na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	20
3.8. Efeito de temperaturas na taxa de crescimento de três isolados de <i>Hendersonula toruloidea</i> ...	21
3.9. Testes de patogenicidade com três isolados de <i>Hendersonula toruloidea</i>	22
3.10. Estudo morfológico de isolados de <i>Hendersonula toruloidea</i>	25
4. RESULTADOS	27
4.1. Levantamento de fungos associados à morte de ponteiros de goiabeira, figueira e goiabas mumificadas	27
4.2. Influência de meios de cultura e ferimento do micélio no crescimento e formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	28
4.3. Influência de três meios de cultura e da superposição de papel de filtro na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	31
4.4. Influência de seis meios de cultura e da superposição de papel de filtro na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	32

4.5. Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	33
4.6. Influência de diferentes fontes de carbono no crescimento e na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	36
4.7. Influência de diferentes níveis de carbono e nitrogênio na formação de picnídios de <i>Hendersonula toruloidea</i>	38
4.8. Efeito de temperaturas na taxa de crescimento de três isolados de <i>Hendersonula toruloidea</i> ...	40
4.9. Testes de patogenicidade com três isolados de <i>Hendersonula toruloidea</i>	42
4.10. Estudo morfológico de isolados de <i>Hendersonula toruloidea</i>	45
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	57
7. LITERATURA CITADA	58
8. APÊNDICE	69

FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS, PATOGENICIDADE E MORFOLOGIA DE
Hendersonula toruloidea NATTRASS, ASSOCIADA A ALGUMAS
PLANTAS FRUTÍFERAS

Candidata: Anne-Lore Schroeder

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Fungos do gênero *Hendersonula*, constantemente associados à mumificação de goiabas e morte dos ponteiros de figueira e goiabeira, foram estudados morfológicamente e identificados como sendo *H. toruloidea* Nattrass. Mediram-se os picnidiósporos hialinos de cinco isolados, variando em média de 14,1 a 18,9 μ m de comprimento e 4,8 a 6,9 μ m de largura. Alguns picnidiósporos bisseptados sempre foram encontrados nestes isolados.

A temperatura ótima para o crescimento micelial desta espécie em meio de BDA está entre 25-30°C, ocorrendo completa inibição aos 40°C. A luz fluorescente contínua favoreceu o crescimento do micélio, independentemente do meio de cultura utilizado.

A esporulação foi estimulada pelo ferimento no micélio com um fura-rolha, quando incubado sob luz fluorescente contínua. O maior número de picnídios ocorreu no meio sabouraud-maltose-água (SMA), quando se efetuaram ferimentos no micélio. A esporulação também foi aumentada pela superposição do papel de filtro na superfície dos meios. Nestas condições, os meios de Czapek e de batata-cenoura-água e as fontes de carbono e nitrogênio, maltose e nitrato de sódio, respectivamente, deram os melhores resultados. A relação C/N influenciou no tipo e número de picnídios.

Com relação à patogenicidade dos diferentes isolados testados, houve variação significativa entre eles. Os métodos de inoculações através de ferimentos nos hospedeiros (figueira) e de folha-destacada deram resultados satisfatórios. A mumificação de frutos de goiaba foi obtida somente em frutos destacados da planta.

PYCNIDIA FORMATION, PATHOGENICITY AND MORPHOLOGY OF
Hendersonula toruloidea NATTRASS, ASSOCIATED TO SOME
FRUIT TREES.

Candidate: Anne-Lore Schroeder

Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

Fungi of genus *Hendersonula*, constantly associated to mumification of guava fruits and to diebacks of guava and fig plants, were morphologically studied and identified as *H. toruloidea* Nattrass. Non-septate, hyaline pycnidiospores of 5 isolates measured in average 14.1 to 18.9 μm long and 4.8 to 6.9 μm in diameter. Some dark biseptate spores were also found.

The optimal temperature for micelial growth of this species in potato-dextrose-agar was observed to be within the range of 25-30°C. Complete inhibition of growth occurred at 40°C. Continuous fluorescent light favored micelial growth independently of the culture medium used.

Sporulation of *H. toruloides* was stimulated by cutting the micelium with a cork borer when incubation was performed under fluorescent light. The greatest number of pycnidia occurred in sabouraud maltose-agar (SMA) when micelium wounding was performed. Sporulation was also enhanced by placing a piece of paper on the medium surface. Under this condition, Czapek's and potato-carrot-agar were the best media for sporulation. The best sources of nitrogen and carbon were sodium nitrate and maltose, respectively. The C/N ratio influenced on the pycnidia type and number of pycnidio.

With respect to the pathogenicity of the different isolates tested, there was a significant variation among them. Inoculation techniques involving wounding of the fig branches of young plants and the method of the detached leaf gave satisfactory results. Mumification was reproduced only in detached guava fruits.

1. INTRODUÇÃO

Fungo do gênero *Hendersonula* tem sido relatado no Brasil, associado à morte de ramos e plantas, em *Pinus* (LASCA e ABRAHÃO, 1971), em pinheiro-do-Paraná (LASCA E CARDOSO, 1974) e em criptoméria (PITTA *et alii*, 1981). Fungo do mesmo gênero tem sido observado no Estado de São Paulo, associado a podridão da manga, podridão seca da goiaba e morte de ramos de goiabeira e figueira. Visando melhor caracterizar o fungo *Hendersonula* associado com essa síndrome nesses hospedeiros, foram feitos estudos morfológicos e fisiológicos sobre o mesmo. Ênfase foi dada aos estudos de esporulação visto que o ponto crítico da identificação é a obtenção dos picnídios e picnidiósporos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O fungo *Hendersonula toruloidea* descrito por NATTRASS (1933) no Egito, pertence a ordem Sphaeropsidales da classe dos Deuteromicetos. Este fungo foi isolado de ramos de ameixeira, damasqueiro e macieira que apresentavam sintomas de morte dos ponteiros e gomose. O fungo apresenta dois estágios de reprodução assexuada, picnidial e *Torula*, formando respectivamente picnidiósporos e artrósporos, sendo este último tipo o mais freqüente em meios de cultura bem como na natureza. O estágio picnidial segundo NATTRASS (1933) forma picnídios que podem ser agrupados ou isolados; picnidiósporos podem ser oblongos ou ovais, inicialmente hialinos sem septos e quando maduros com dois septos, raramente um septo, sendo a célula central mais escura e terminais hialinas. Devido essa variação de cor e número de septos dos picnidiósporos, o fungo pode ser facilmente confundido com outros gêneros. BRODRICK

e WESTHUIZEN (1978) classificaram o agente causal da podridão mole da manga, provisoriamente como *Hendersonia creberrima* em vista de existir a hipótese que *Hendersonula cypria* Nattrass e *Hendersonia creberrima* Sydow e Beutter, serem uma só espécie.

Segundo ROGER (1953) estes gêneros podem ser diferenciados pelo tipo de picnídio em que *Hendersonia* forma picnídios isolados, nunca acompanhados de um estroma e *Hendersonula* forma picnídios agrupados, tendo seus lóculos reunidos por um estroma comum. A diferença de *Hendersonula* em relação a *Hendersonia* baseia-se no fato de que o primeiro forma esporos de um só tipo e o segundo forma esporos elipsoidais filiformes. SUTTON (1973) na sua chave de classificação, nem considera *Hendersonia* e *Hendersonia*; inclui apenas o gênero *Hendersonula* e a espécie *Hendersonula toruloidea* Nattrass.

Na literatura entre espécies de *Hendersonula* são citadas na literatura como: *H. pini* (PETRAK e SYDON, 1927), *H. macrosperma* (HÖHNEL, 1927), *H. pinicola* (DEARNESS, 1930), *H. cypria* (NATTRASS, 1937), *H. agathi* (YOUNG, 1948) e *H. opuntiae* (VERGARA, 1967); porém sem dúvida, a espécie mais citada é *H. toruloidea* Nattrass.

No Brasil, a primeira constatação do gênero *Hendersonula* foi em *Pinnus elliottii* por LASCA e ABRAHÃO

(1971), porém sem especificar a espécie.

Hendersonula toruloidea foi constatada em diversas partes do mundo: Califórnia (CALAVAN e WALLACE, 1954; OGAWA, 1954; SOMMER, 1955; FOOT *et alii*, 1955; PAXTON *et alii*, 1964); em Israel (ACHILEA e SZTEJNBERG, 1976); na Jamaica (MEREDITH, 1963), no Estado de Washington (DAVINSON, 1972); no Sudão (GIHA, 1975); no Iraque (NATOUR e EL-HAIDERI, 1967; AL-HANSSAN *et alii*, 1970; SHAWKAT *et alii*, 1979); no Paquistão (KHAN, 1955 e 1959; KHAN e BOKHRI, 1970; AL-ZARARI *et alii*, 1979); no Líbano (HARTMANN e NIENHAUS, 1974); na Índia (MATHUR e SINGH, 1959 e 1964; WANGIKAR *et alii*, 1969; LAXMINARAYANA e REDDY, 1975, SINGH e MISRA, 1980).

Entre as culturas econômicas citadas como hospedeiras desse fungo encontram-se *Citrus* spp (CALAVAN e WALLACE, 1954; KHAN, 1959; HARTMANN e NIENHAUS, 1974), noqueira da Pérsia (*Juglans regia*) (WILSON, 1949; FOOT *et alii*, 1955; PAXTON, 1964), amendoeira (*Prunus amygdalus*) (ENGLISH *et alii*, 1975; AL-ZARARI *et alii*, 1979), figueira (*Ficus carica*) (PAXTON *et alii*, 1964), goiabeira (*Psidium guajava*) (MATHUR e SINGH, 1959), videira (*Vitis vinifera*) (NATOUR e EL-HAIDERI, 1967; WANGIKAR *et alii*, 1970), pessegueiro (*Prunus persica*) (AL-ZARARI *et alii*, 1979), amoreira (*Morus alba*) (KHAN, 1955) e ameixeira (*Prunus* spp) (NATTRASS, 1933; AL-ZARARI, 1979), damasqueiro (*Prunus armeniaca*) (NATTRASS, 1933), mangueira

(*Mangifera indica*) (PANDEY *et alii*, 1981), inhame (*Discorea* spp) (OKAFOR, 1965), caquizeiro (*Diospyros kaki*) (AL-ZARARI *et alii*, 1979), macieira (*Malus domestica*) (AL-HASSAN *et alii*, 1970 e LAXMINARAYANA e REDDY, 1975), cajueiro (*Anacardium occidentale*) (SINGH e MISRA, 1980), *Arbutus menziesii* (DAVINSON, 1972), *Pinus elliottii* (LASCA e ABRAHÃO, 1971); *Araucaria angustifolia* (LASCA e CARDOSO, 1974); *Cryptomeria japonica* (PITTA *et alii*, 1981); *Ficus benghalensis* (GIHA, 1975); e *Eucalyptus* spp. (AL-ZARARI *et alii*, 1979).

CAMPBELL (1976) relatou ter encontrado *H. toruloidea* em pele e unhas de pacientes humanos.

Os principais sintomas associados a *H. toruloidea* são: gomose (NATTRASS, 1933, CAVALAN e WALLACE, 1954; HARTMANN e NIENHAUS; 1974), morte dos ponteiros (NATTRASS, 1933; CAVALAN e WALLACE, 1954; MATHUR e SINGH, 1959; SINGH e MISRA, 1980), murcha de ramos (WILSON, 1949; PAXTON *et alii*, 1964; NATOUR e EL-HAIDERI, 1967; SHAWKAT, *et alii*, 1979), cancro (ENGLISH *et alii*, 1975; DAVINSON, 1972), apodrecimento de raiz (LASCA e ABRAHÃO, 1971), podridão de armazenamento (MEREDITH, 1963; OKAFOR, 1966; LAXMINARAYANA e REDDY, 1975) e manchas foliares (PANDEY, 1981).

A espécie *H. toruloidea* tem sido associada a diferentes hospedeiros, entretanto, existem poucos relatos a

respeito da patogenicidade do fungo. A comprovação da patogenicidade foi feita pela primeira vez em noqueira da Pêrsia (WILSON, 1947) e, depois, em outras plantas tais como pessegueiro e damasqueiro (WILSON, 1949), citros (CALAVAN e WALLACE, 1954), figueira (PAXTON *et alii*, 1964), videira (NATOUR e EL-HAIDERI, 1967); *Arbutus menziesii* (DAVINSON, 1972), amendoeira (ENGLISH *et alii*, 1975) e amoreira (SINGH e MISRA, 1980).

Para o isolamento do fungo e obtenção do estágio *Torula*, diversos meios de cultura foram utilizados tais como: extrato de ameixa seca-ágar (NATTRASS, 1933), BDA (NATOUR e EL-HAIDERI, 1967; GIHA, 1975; ENGLISH *et alii*, 1975) glucose-extrato de levedura-ágar (OKAFOR, 1965) e farinha de milho-ágar (WILSON, 1949).

O estágio picnidial foi encontrado em ramos de damasqueiro e por inoculação de artrósporos em ramos de salgueiro e algodoeiro sob condições de câmara úmida (NATTRASS, 1933). Em ramos de noqueira da Pêrsia, na Califórnia (WILSON, 1949), obteve-se o estágio picnidial por inoculações de artrósporos após 5 meses. CALAVAN e WALLACE (1954) obtiveram apenas alguns picnídios em meio de BDA, após 20 semanas sob temperatura ambiente e também em troncos de plantas cítricas. PAXTON *et alii* (1964) citam a obtenção de picnídios, mas não mencionaram se foi em meio de cultura ou na natureza.

Os fatores de predisposição à penetração e colonização ainda foram pouco estudados. SOMMER (1955) ao estudar diversos fatores, considerou que a injúria solar em ramos de nogueira teve efeito maior na severidade da doença, confirmando as observações anteriores de WILSON (1947) e CALAVAN e WALLACE (1954). PAXTON e WILSON (1965) consideraram a injúria solar mais importante do que a simples ruptura do periderma, além de concluírem que o ferimento é essencial para a penetração do fungo. Segundo DAVINSON (1972) quando existe um ótimo de temperatura, ocorre a formação de cancro em ramos não injuriados em *Arbutus menziesii*, embora tenha observado uma relação direta entre injúria e severidade da doença. ENGLISH *et alii* (1975) observaram alta severidade da doença em amendoeira somente em épocas quentes. FAWCETT (1936) associou injúria por geadas como fator predisponente à doença em citros. PAXTON e WILSON (1965) observaram que temperaturas noturnas altas exerciam um desenvolvimento maior e mais rápido de cancos em nogueira da Pérsia. SOMMER (1955) observou que a germinação dos esporos ocorria somente a uma umidade superior de 90 por cento, num ótimo de temperatura (30°C) e para explicar a ocorrência da doença em épocas quentes, essa umidade necessariamente seria fornecida pelo próprio tecido do hospedeiro.

Para o crescimento do micélio, o ótimo de temperatura foi constatado entre 30-35°C por diversos pesqui-

sadores (NATTRASS, 1933; WILSON, 1947; CALAVAN e WALLACE, 1954; PAXTON *et alii*, 1964; e AL-HASSAN *et alii*, 1970). Entretanto, DAVINSON (1972) obteve o ótimo de 20-25°C e inibição aos 35°C, discordando dos dados obtidos por NATTRASS (1933) e CALAVAN e WALLACE (1954) que obtiveram um crescimento vigoroso aos 40°C. Nas temperaturas mais baixas (14-15°C) AL-HASSAN *et alii* (1970) e DAVINSON (1972) concordam quanto ao lento crescimento nestas temperaturas.

Fatores ambientais influenciam na reprodução dos fungos agindo sobre estágios sucessivos que vão desde o início do desenvolvimento até a completa maturação dos corpos de frutificação e esporos (HAWKER, 1966). As condições que permitem a formação de esporos são quase sempre em faixas mais estreitas do que aquelas para crescimento micelial.

As injúrias mecânicas no micélio, como ferimento por agulha ou outro material cortante e, bem assim, raspagem no mesmo, podem intensificar a esporulação. No caso de *Alternaria solani*, com tais ferimentos a que se seguiu exposição à luz ultravioleta, notou-se incremento na produção de conídios (COCHRANE, 1958).

O efeito da luz na esporulação de fungos é excessivamente complexo (HAWKER, 1957). A luz não somente estimula ou inibe a iniciação e desenvolvimento dos esporos e

esporóforos em muitos fungos, como pode, também, influenciar na taxa de crescimento micelial ou na taxa de crescimento de esporos e esporóforos, alterando assim sua morfologia. No caso de algumas espécies de *Fusarium*, a luz incrementou o comprimento dos macroconídios, mas propiciou diminuição no número de septos. Segundo COCHRANE (1958) a luz visível e próxima a ultravioleta, pode refletir em três aspectos na esporulação de fungos: efeito indutor, inibitório ou neutro. O efeito indutor da luz fluorescente na esporulação de muitos fungos, se deve à presença do espectro ultravioleta em quantidade relativamente pequena (LEACH, 1962). Este estímulo somente ocorre se outros fatores não forem limitantes (LEACH, 1971).

A nutrição é talvez um dos fatores mais importantes no crescimento e reprodução (HAWKER, 1957). A influência do elemento nutritivo pode variar dependendo da quantidade total, de sua natureza ou de sua concentração no meio (HAWKER, 1976). A concentração inicial do material alimentar favorecendo esporulação, raramente corresponde ao ótimo de crescimento vegetativo, como por exemplo, o tipo de fonte de carbono que dá o máximo crescimento é raro que seja o mais adequado para produção de esporos (HAWKER, 1957). O tipo de fonte de carbono, segundo COCHRANE (1958) influi fortemente na forma de estruturas reprodutivas sexual ou assexual. Altas concentrações de nitrogênio suprimem a esporulação (COCHRANE, 1958) e esse efeito pode estar frequentemente relacionado se-

gundo HAWKER (1976) ao acúmulo de produtos metabólicos tóxicos. Com relação à fonte de nitrogênio, muitos dos fungos são capazes de utilizar nitratos e sais de amônia. Alguns requerem algumas formas de nitrogênio orgânico como aminoácidos específicos, devido serem incapazes de sintetizá-los (HAWKER, 1976). O fato de formas de nitrogênio como a peptona, serem superiores aos compostos inorgânicos na indução de estruturas reprodutivas, se deve à presença de traços de vitaminas nos compostos orgânicos (HAWKER, 1957). A relação C/N pode influenciar no tipo e forma de esporos produzidos. O fato de *Botrytis cinerea* produzir quantidade maior de conídios quando a relação glucose e peptona é alta e inibir essa produção quando há alta concentração de glucose, favorece a formação de escleródios e não conídios (HAWKER, 1957).

Sabe-se que a presença de papel de filtro favorece a esporulação de diversos fungos. SEALL (1976) utilizando os meios de farinha de aveia, farinha de soja, V-8 e BDA, notou que o papel de filtro, favorecia a esporulação de *Phomopsis sojae*. Também MACHADO (1980) estudando fatores que influem na esporulação de *Macrophomina phaseolina* constatou este efeito benéfico e levantou a hipótese de que o fungo utilizava a celulose do papel de filtro para sua nutrição e de ser este o responsável pelo incremento de picnídios. A celulose é um composto de disponibilidade lenta para a maioria dos fungos, entretanto, pode ser a melhor fonte de carbono pa

ra alguns (COCHRANE, 1958).

Com relação a *Hendersonula toruloidea* nenhum trabalho foi encontrado quanto à fisiologia de reprodução deste fungo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Levantamento de fungos associados à morte de ponteiros de goiabeira e figueira, e goiabas mumificadas

As amostras do presente trabalho, foram coletadas nos pomares da Estação Experimental do IAC, em Limeira, Estado de São Paulo.

As coletas de ramos e goiabas mumificadas foram realizadas em dois períodos: abril de 1982 e julho de 1983. No primeiro levantamento, foram utilizados apenas frutos mumificados, num total de 100 frutos e, no segundo levantamento, ramos com morte de ponteiros e os respectivos frutos mumificados. Destes, 25 frutos e 20 ramos foram utilizados no isolamento. A desinfecção foi feita imergindo fragmentos em álcool 96º GL por alguns segundos, para logo a seguir serem flambadas. O meio de cultura utilizado foi o de ágar-água

(água 15 g e água destilada q.s.p. 1000 ml), segundo TUI_{TE} (1969), e as placas incubadas a 25°C em estufa. Para sua identificação, os isolados foram cultivados em meio de BDA (extra_{to} de batata 200 g; dextrose 20 g; água 12 g; água destilada q.s.p. 1000 ml) conforme TUI_{TE} (1969) e colocados sob quatro lâmpadas fluorescentes de 40 watts, a 40 cm das placas. Outros meios entre os quais o meio de Czapek's, meio mínimo de Pontecorvo, meio farinha de aveia-água, meio de farinha de milho-água, também foram empregados para a caracterização dos isolados.

3.2. Influência de meios de cultura e fermento do micélio no crescimento e formação de picnídios de *Hendersonula toruloides* na presença e ausência de luz

Foram testados os meios de BDA, Czapek's, suco V-8 e SMA, na presença e ausência de luz, com e sem fermento do micélio. O isolado 22, proveniente de goiabas mumificadas, foi utilizado neste e nos demais experimentos.

O meio de BDA foi feito conforme descrito no experimento anterior. O meio de Czapek foi feito segundo KELMAN (1967) e tinha a seguinte constituição: NaNO₃, 3 g; KH₂PO₄, 1 g; MgSO₄ . 7H₂O, 0,5 g; FeSO₄ . 7H₂O, 0,01 g; sacarose 30g; água 15g; e água destilada, q.s.p. 1000 ml. O meio suco V-8-água constituído de suco V-8, 200 ml; CaCO₃, 3 g; água 15 g e

água destilada q.s.p. 800 ml foi obtido conforme o descrito por DIENER (1955). O meio de Sabouraud-maltose-água (SMA) constituiu-se de peptona, 10g; extrato de levedura, 10g; maltose, 40g; água, 15 g e água destilada q.s.p. 1000 ml, conforme FARROW (1954). Tais meios, após esterilizados em autoclave a uma atmosfera de pressão por 20 minutos, foram vertidos em placas de Petri, tipo Pyrex Cover de 9 cm de diâmetro, usando-se o mesmo procedimento nos demais meios utilizados nos experimentos a seguir.

A inoculação de fungo foi feita através de micélio de 5mm de diâmetro, estes obtidos dos bordos das colônias cultivadas em meio de BDA e transferidos para o centro das placas. Após a inoculação, todas as placas foram colocadas sob luz fluorescente contínua em temperatura ambiente de aproximadamente 28°C. As placas pertencentes aos tratamentos ausência de luz, foram envolvidos com papel aluminizado e colocados junto aos demais tratamentos.

Após 72 horas de incubação, realizou-se ferimentos do micélio com um fura-rolha de 5 mm de diâmetro em quatro direções, a partir do centro para os bordos, formando assim quatro ferimentos por direção, denominando-se de P₁, P₂, P₃ e P₄ para os ferimentos 1, 2, 3 e 4, sendo os P₁ próximos ao centro.

Nos tratamentos sem ferimento seguiu-se o mesmo método, porém demarcando na hora da avaliação as direções e os respectivos ferimentos. Nesta ocasião efetuou-se medições das colônias do micélio nos tratamentos.

A formação dos picnídios foi avaliado após 21 dias de incubação, através da contagem do número de picnídios em cada posição de ferimento. Utilizou-se do microscópio estereoscópico com 60 vezes de aumento.

Os dados foram analisados pelos testes não paramétricos conforme CAMPOS (1983) sendo o delineamento estatístico inteiramente ao acaso, com 32 tratamentos e três repetições, sendo cada repetição representada por uma placa.

3.3. Influência de três meios de cultura e da superposição de papel de filtro na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea*

Foram testados os meios SMA, suco V-8-água e meio Czapek's. A composição, preparo dos meios e autoclavagem foram descritos no experimento anterior. O papel de filtro utilizado era do tipo Whatman nº 1 de 9 cm de diâmetro e esterilizado em autoclave por 20 minutos a uma atmosfera de pressão. O inóculo constituiu-se de discos de micélio de 5 mm, cultivado em meio de BDA. Para iluminação neste experimento

foi utilizado o mesmo suporte de lâmpadas fluorescentes, conforme descrito no experimento anterior, bem como nos demais ensaios. A temperatura ambiente era de aproximadamente 28°C.

A formação dos picnídios foi avaliada após 19 dias de incubação, contando-se o número de picnídios em seis campos de observação por placa, utilizando-se do mesmo microscópio estereoscópico do ensaio anterior, com 60 vezes de aumento.

O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso, com seis tratamentos e três repetições, e os dados foram submetidos a testes não paramétricos.

3.4. Influência de seis meios de cultura e da superposição de papel de filtro na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea*

Foram testados os meios de farinha de soja-água; batata-cenoura-água; farinha de aveia-água, polpa de goiaba com casca; polpa de goiaba sem casca e extrato de malte-água. Estes foram submetidos a luz fluorescente, com ou sem superposição do papel de filtro Whatman nº 1 de 9 cm de diâmetro, previamente esterilizado em autoclave, conforme descrição do ensaio anterior.

O meio de farinha de soja-ágar, constitui-se de farinha de soja, 60g; ágar, 12 g e água destilada q.s.p. 1000 ml, sendo preparado conforme a descrição de MACHADO (1980). O meio batata-cenoura-ágar (PCA), constituído de batata, 20 g; cenoura, 20 g; ágar, 20 g e água destilada, q.s.p. 1000 ml, foi feito segundo BRODRICK e WESTHUIZEN (1976). O meio de farinha de aveia-ágar foi preparado segundo TUIE (1969) tendo a seguinte composição: farinha de aveia, 60g; ágar, 12 g; água destilada, q.w.p. 1000 ml.

Para o preparo dos meios de polpa de goiaba, com e sem casca, utilizou-se um fruto verdoengo, medindo-se sua textura através de um pressômetro de 6 mm de diâmetro dando a média de 4,5 em cinco leituras efetuadas. A composição dos meios era de 40 g de polpa de goiaba, 15g de ágar e 1000 ml de água destilada q.s.p. sendo que um continha a casca e outro não. O pH foi de 5,5 a 6,0, para os meios de goiaba com e sem casca, respectivamente. O extrato de malte-ágar constituiu-se de extrato de malte 15 g; ágar 20 g e água destilada q.s.p. 1000 ml, conforme BRODRICK e WESTHUIZEN (1976).

A autoclavagem, inóculo e tipo de incubação foram semelhantes ao experimento anterior, sendo que a temperatura ambiente era de 28 a 30°C, aproximadamente.

A formação dos pincídios foi avaliada aos 18

dias de incubação, em 10 campos de observação, ao acaso, com o aumento e tipo de microscópio estereoscópico anteriormente citado.

O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso, com 12 tratamentos e quatro repetições, sendo cada uma, representada por uma placa. Os dados foram também submetidos a testes não paramétricos.

3.5. Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e formação de picnídios de *Hendersonula toruloides*

Foram testadas quatro fontes de nitrogênio, tendo como meio basal, o meio mínimo de Pontecorvo modificado (KIMATI; 1975). As fontes utilizadas foram nitrato de sódio (6 g/l) peptona (6,05 g/l); caseína hidrolizada (6,1 g/l); e sulfato de amônio (4,6 g/l).

Estes meios de cultura foram superpostos ou não com papel de filtro esterilizado e inoculados com discos de micélio, submetidos à luz fluorescente contínua, em temperatura ambiente, aproximadamente a 27°C.

O meio mínimo de Pontecorvo modificado, constituiu-se de NaNO_3 6,0 g; KH_2PO_4 1,5 g; KCl 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,5 g; solução de micronutrientes 1 ml; ágar 15 g e água destilada q.s.p. 1000 ml.

As medições do diâmetro das colônias foram feitas a cada 12 horas, através de duas leituras. Somente foram avaliadas as placas sem papel, em vista da dificuldade de visualização dos bordos das colônias nas placas que continham o papel de filtro.

A avaliação dos picnídios foi realizada após 21 dias de incubação, através da contagem do número de estruturas picnidiais em 10 campos de observação por placa, utilizando-se o mesmo microscópio estereoscópico e aumentos descritos no ensaio anterior.

O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso, com oito tratamentos e três repetições. A análise dos dados foi realizada através dos testes não paramétricos.

3.6. Influência de diferentes fontes de carbono no crescimento e formação de picnídios de *Hendersonula toruloides*

Foram testados cinco fontes de carbono, tendo como meio basal o meio mínimo de Pontecorvo modificado, descrito no experimento anterior. As fontes de carbono utilizadas

foram: glucose, sacarose, maltose, amido e lactose na dosagem de 6 g/l. Estes meios foram superpostos ou não com papel de filtro, esterilizados e inoculados com discos de micélio, e submetidos à luz fluorescente contínua, em temperatura ambiente de aproximadamente 27°C.

A avaliação do crescimento micelial, foi feita através de duas leituras do diâmetro das colônias a cada 12 horas, somente nas placas sem a superposição do papel, pela mesma razão já explicada no experimento anterior.

Aos 21 dias, avaliou-se o número de picnídios, através da contagem em 10 campos por placa, utilizando-se o microscópio estereoscópico já citado e caracterizado no experimento anterior.

O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso, com 10 tratamentos e três repetições. A análise dos dados foi feita através de testes não paramétricos.

3.7. Influência de diferentes níveis de carbono e nitrogênio na formação de picnídios de *Hendersonula toruloides*

Foram usados como fonte de carbono e nitrogênio a maltose e o nitrato de sódio, respectivamente, em três

níveis de concentração, tendo como meio basal, o meio mínimo de Pontecorvo modificado, já descrito anteriormente.

Os níveis de concentração foram 5, 10 e 20 gramas de maltose e 3g, 6g e 12g de nitrato de sódio, por litro de meio de cultura.

Todos os tratamentos tiveram a superposição do papel de filtro sobre o meio, inoculados com discos de micélio submetidos à luz fluorescente contínua em temperatura ambiente de aproximadamente 32°C.

Realizaram-se duas avaliações do número de picnídios, aos 21 e 36 dias após a inoculação, a fim de verificar diferenças consideráveis em relação ao período de incubação. Tais avaliações basearam-se no número de picnídios simples ou agrupados e no fato de ter ocorrido ou não a exsudação, visto que, em alguns tratamentos, foi bem nítida esta diferença. Efetuou-se a avaliação através da contagem ao acaso em 10 campos por placa no microscópio estereoscópico BAUSCH e LOMB, com aumento de 21 vezes.

O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso, com 9 tratamentos e quatro repetições. A análise dos dados se fez através de testes não paramétricos.

3.8. Efeito de temperaturas na taxa de crescimento de três isolados de *Hendersonula toruloides*

Foram utilizados três isolados, 22, 82 e H₁; sendo que os isolados 22 e 82 eram provenientes de goiabas mumificadas, isoladas em abril de 1982, do primeiro levantamento de fungos associados a goiabas mumificadas. O isolado H₁ foi obtido de fruto de mangueira com podridão peduncular, este gentilmente cedido por Raquel Ghini e Hiroshi Kimati, do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP.

As temperaturas utilizadas foram: 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C e o meio de cultura foi o de BDA, na ausência de luz. O inóculo consistia de discos de micélio de 5 mm, obtidos dos bordos das colônias, incubados no meio BDA a 15°C na ausência de luz. Após a inoculação de discos de micélio no centro de cada placa, colocou-se todas as placas em posição invertida, para se evitar a condensação de água nas temperaturas mais elevadas.

As avaliações do diâmetro da colônia, foram efetuadas duas vezes por dia, fazendo-se duas leituras do diâmetro da colônia em cada placa. Calculou-se a taxa de crescimento para cada isolado. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e cinco repetições, tendo-se aplicado o teste Tukey. Como não houve crescimento a

40°C em nenhum dos isolados, o referente a esse grau não foi incluído para análise estatística. Foi feita análise de regressão para obtenção da curva de crescimento de cada isolado.

3.9. Testes de patogenicidade de três isolados de *Hendersonula toruloidea*

Nos diversos testes patogênicos, utilizaram-se os três isolados (22, H₁ e 82), em diferentes tipos de inoculações em plantas ou partes, de figueira e goiabeira.

Em goiabeiras adultas, inoculou-se suspensão de esporos (10^5 esporos/ml) e de micélio nos estágios de: botão floral, estágio de pétalas abertas, fruto de 1 cm e 2 cm de diâmetro, aproximadamente, com e sem ferimento. Estas inoculações foram realizadas periodicamente, em vista da dificuldade de encontrar número suficiente desses estágios de desenvolvimento, no momento das inoculações; assim, inoculou-se periodicamente entre julho de 1982 a fevereiro de 1983. Neste ensaio, foi utilizado apenas o isolado 22, obtido de goiabas mumificadas.

Utilizaram-se também, plantas novas de goiabeiras de 60 cm de altura, inoculando-se no lenho, através de dois cortes e a inserção de discos de micélio de 5 mm, obtidos dos bordos das colônias, cultivados em meio de BDA, após

72 horas de incubação. Os ferimentos foram a seguir vedados com fita crepe Scotch de 19 mm e cobertos com saco plástico para formar uma câmara úmida. Para cada isolado foram utilizadas três plantas. As plantas testemunhas receberam o mesmo tipo de ferimento, porém, sem inoculação do fungo. Paralelamente, folhas de goiabeira foram inoculadas, com micélio aéreo em três pontos, por folha, utilizando-se 5 folhas por planta. Os pontos inoculados eram cobertos com pedaços de fita crepe de aproximadamente 1 cm². As folhas haviam sido previamente desinfectadas, passando-se-lhes levemente algodão embebido em álcool 96 GL. Estas plantas foram cobertas, também, com saco plástico, tendo-se utilizado duas plantas para cada isolado. O mesmo procedimento se deu para plantas de figueira, utilizando-se, entretanto, apenas 3 folhas por planta da variedade Roxo de Valinhos, de um ano de idade aproximadamente.

Para os testes de patogenicidade, aplicados através do método de folha destacada, foram utilizadas folhas novas de goiabeira, conforme recomenda TUIE (1969), e, para isso, três folhas foram previamente desinfectadas, para cada isolado, sendo inoculadas em três pontos da seguinte maneira: P₁ - entre nervuras; P₂ - na nervura secundária; e P₃ na nervura principal, próximo ao pecíolo. A extremidade do pecíolo da folha foi coberta com algodão umedecido em água esterilizada. Como inóculo, foram utilizados picnídios formados no meio de BDA, com três semanas de incubação sob luz fluorescente.

As folhas foram colocadas em cubas de vidro redondas de 20 cm de diâmetro e 10 cm de profundidade. A câmara úmida preparada, consistia de uma camada de algodão de 2 cm, umedecida com água esterilizada e sobreposta por lâminas microscópicas, previamente flambadas. A incubação se deu a uma temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, no laboratório de Fitopatologia; a avaliação consistia em medir-se o tamanho da lesão através do maior comprimento e largura, após 7 dias da inoculação. O mesmo procedimento foi realizado para folhas de figueira, para as quais, entretanto, não foram feitas as devidas medições das lesões. Neste caso, apenas o aspecto qualitativo foi registrado através de fotografia.

Além dos testes acima mencionados, foram inoculadas plantas de figueira de um ano aproximadamente, da variedade Roxo de Valinhos. Estas plantas, bem como, as anteriores, foram cedidas pela Seção de Fruticultura da ESALQ/USP, pelo Prof. Vladimir Rodrigues Sampaio. Procedeu-se inoculações através de ferimento do lenho, seja por corte ou apenas com estilete. Os cortes foram feitos na região apical (C1) e na região basal (C2) e entre estes, mais ou menos no meio do ramo, o ferimento por punção com agulha histológica (M). Nos Cortes, feitos em bise1 no tecido da casca, introduziu-se um disco de micélio de 5 mm, cultivado em meio de BDA a 25°C em estufa. No ferimento M, foi utilizado micélio aéreo nos pontos inoculados os quais foram vedados com fita Scotch de 19mm

de largura. Antes de cada inoculação desinfectou-se a região do lenho com algodão embebido em álcool 96º GL. As plantas testemunhas receberam o mesmo procedimento, porém sem a inoculação do micélio. Foram utilizadas 5 plantas para cada isolado. Neste ensaio, as plantas não foram cobertas com saco plástico e a avaliação das lesões foi feita medindo-se o seu comprimento com régua, após 15 dias da inoculação. De todas as lesões formadas reisolou-se o fungo em estudo neste e nos demais testes de patogenicidade.

3.10. Estudo morfológico de isolados de *Hendersonula toruloides*

Observou-se aspectos de colônias em relação a sua coloração, tipo de crescimento e período de iniciação da formação de picnídios.

A avaliação do tamanho dos picnidiósporos foi feita através de 25 medições de comprimento e largura para cada isolado. Foram utilizados cinco isolados, que apresentaram alguns picnidiósporos bisseptados; entretanto, as avaliações foram feitas apenas de esporos não septados e hialinos, pelo fato destes ocorrerem com maior frequência. A origem destes isolados é a seguinte: H₁ e H₂ fruto de mangueira; 22 e 83 - goiabas mumificadas; 13 de figueira.

A obtenção dos picnídios foi através de inoculações em ramos de goiabeira esterilizados e em meio de cultura. Os isolados 13 e 83 obteve-se em meio de BDA, sob luz contínua a temperatura ambiente aproximadamente 27°C. Os demais isolados se obteve inoculando micélio em ramos novos de goiabeira. Estes ramos foram envolvidos com algodão nas duas extremidades e colocados em tubos de ensaio e a seguir autoclavados a uma atmosfera de pressão por vinte minutos. Após autoclavados foram inoculados com micélio e deixados sob luz fluorescente contínua, adicionando-se água destilada o suficiente para deixar o algodão umedecido. Picnídios com exsudação de esporos ocorria normalmente após dois meses da inoculação, os quais utilizou-se para avaliação do tamanho no presente trabalho.

4. RESULTADOS

4.1. Levantamento de fungos associados à morte dos ponteiros de goiabeira, figueira e goiabas mumificadas

Aproximadamente 50% dos fungos associados as goiabas mumificadas e ramos de goiabeira com morte de ponteiros, corresponderam ao isolado de *Hendersonula*. Os fungos que se apresentaram com menor frequência foram os dos gêneros *Fusarium*, *Pestalotia* e *Colletotrichum* (Tabela 1).

Também em ramos de figueira, com morte dos ponteiros, o gênero *Hendersonula* foi o mais frequente entre os isolados.

Tabela 1 - Frequência dos fungos em amostras¹ de goiabas mumificadas e de ramos secos de figueira

Fungos	Goiabeira		Figueira	Total
	Fruto ²	Ramo	Ramo	Plaqueado
<i>Hendersonula</i> ³	64	11	14	89
<i>Pestalotia</i>	12	2	2	16
<i>Colletotrichum</i>	5	0	0	5
<i>Fusarium</i>	32	3	3	38
<i>Trichoderma</i>	4	0	0	4
<i>Aspergillus</i>	4	0	0	4
Outros ⁴	12	7	3	22

¹ Cada amostra representa 4 a 5 sub-amostras.

² Número total de amostras nos dois levantamentos.

³ Identificação baseada em aspectos morfológicos das colônias. Parte destes isolados foram estudados quanto às características dos esporos.

⁴ Fungos não identificados.

4.2. Influência de meios de cultura e fermento do micélio no crescimento e formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea* na presença e ausência de luz

Os resultados deste ensaio estão apresentados resumidamente nas Tabelas 2 e 3, e os dados originais no Apêndice 2.

Tabela 2 - Efeito da luz no crescimento micelial de *H. toruloides* em diferentes meios de cultura

	Diâmetro da colônia (mm) ¹	
	ausência de luz	presença de luz
BDA	63,5	89,3
Czapek	53,3	81,4
V-8	73,8	89,8
SMA	51,0	88,9

¹ Média de duas leituras de três repetições após 72 horas de inoculação, em temperatura ambiente de aproximadamente 28°C

Na ausência da luz, o diâmetro das colônias foi menor, independentemente do meio de cultura utilizado (Tabela 2) e também não houve formação de picnídios seja nos tratamentos com ou sem fermento do micélio.

Na presença da luz, além de um crescimento micelial mais rápido, portanto um maior diâmetro das colônias, houve efeito favorável dos fermentos do micélio, formando maior quantidade de picnídios, em todos os meios de cultura testados. No meio SMA formou-se maior quantidade ainda de picnídios, máxime nos tratamentos com fermento.

Quanto à distribuição de picnídios nos meios de cultura, houve gradativo aumento destes para os bordos

das placas, sendo este fato bem caracterizado no meio Cazapek, por outro lado, no meio de BDA, houve uma concentração maior de picnídios na região central da placa, principalmente, nos tratamentos sem ferimento do micélio.

Tabela 3 - Efeito de meios de cultura e ferimento do micélio na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea* na presença de luz

Meios de Cultura	Nº de picnídios nos tratamentos								Médias
	sem ferimento				com ferimento				
	P ₁ ¹	P ₂	P ₃	P ₄	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	
BDA	12,0 ²	4,0	2,3	2,3	12,3	8,3	9,3	16,7	8,4
Czapek	1,3	2,3	5,3	23,3	3,7	6,3	12,3	24,3	9,9
V-8	4,3	4,7	8,0	9,6	7,3	11,3	14,7	22,0	10,3
SMA	22,0	28,3	36,3	38,3	73,7	68,3	72,0	67,0	50,7
Médias	9,9	9,8	13,0	18,4	24,3	23,6	27,1	32,5	-

¹ P₁, P₂, P₃ e P₄ correspondem à posição dos ferimentos a partir do centro aos bordos da placa.

² Média correspondente a três repetições, cada uma constituída de 4 observações ao microscópio estereoscópio Wild M5 63207, de 60 vezes de aumento, avaliação feita 3 semanas após a instalação do experimento.

4.3. Influência de três meios de cultura e da superposição de papel de filtro na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea*

Os resultados deste ensaio, estão apresentados resumidamente na Tabela 4 e os dados originais no Apêndice 2.

Tabela 4 - Efeito de três meios de cultura e da superposição de papel de filtro Whatman nº 1 na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea*

Meios de Cultura	Nº de picnídios nos tratamentos ¹		Médias
	sem papel	com papel	
SMA	4,5	16,0	10,3
V-8	5,2	12,4	8,8
Czapek	5,3	34,5	19,9
Médias	5,0	21,0	

¹ Média de três repetições, cada uma representada por uma placa; as observações foram efetuadas em seis campos do microscópio estereoscópio Wild M5 - 63207, com 60 vezes de aumento, após 19 dias de inoculação.

A presença de papel, aumentou consideravelmente a formação de picnídios. Pelo teste de Wilcoxon, o efeito foi significativo ao nível de 0,05%.

Pelo teste de Kruskal-Wallis, os meios, na ausência de papel, não diferiram estatisticamente entre si.

Na presença de papel, o meio de Czapek produziu maior quantidade de picnídios e esta diferença em relação o meio V-8 de menor produção foi significativa ao nível de 1% pelo teste de Kruskal-Wallis. Entre os meios de Czapek e SMA não constatou-se diferenças significativas.

4.4. Influência de seis meios de cultura e da superposição de papel de filtro na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea*

Os resultados deste ensaio estão apresentados resumidamente na Tabela 5 e os dados originais no Apêndice.

Tabela 5 - Efeito de seis meios de cultura e superposição do papel de filtro Whatman nº 1, na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea*

Meios de cultura	Nº de picnídios nos tratamentos ¹		Médias
	sem papel	com papel	
Farinha de soja-ágar	2,5	7,4	5,0
Batata-cenoura-ágar	6,6	25,7	16,2
Farinha de aveia-ágar	3,5	15,5	9,5
Polpa de goiaba c/casca	1,5	15,3	8,4
Polpa de goiaba s/casca	0,0	13,3	6,7
Extrato de malte-ágar	0,0	9,7	4,9
Médias	2,4	14,5	

¹ Média de 10 observações por placa com quatro repetições, cada uma, constituída por uma placa. Uma observação corresponde ao número de picnídios por campo ao microscópio estereoscópio Wild M5-63207, com 60 vezes de aumento.

O efeito do papel nos meios na formação dos picnídios foi significativo ao nível de 05,% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Na ausência de papel de filtro, o meio batata-cenoura-ágar, produziu quantidade significativamente maior de picnídios, ficando em segundo lugar os meios de farinha de aveia-ágar e farinha de soja-ágar, sendo que estes últimos não diferiram estatisticamente entre si. No meio de polpa de goiaba com casca, a produção de picnídios foi inferior à verificada nos meios acima referidos, enquanto que nos meios com polpa de goiaba sem casca e de extrato de malte, não foi observada a formação dessas estruturas.

Quanto à produção de picnídios em meios de cultura, na presença de papel, o melhor foi o de batata-cenoura-ágar; os de produção a nível intermediário foram os meios de farinha de aveia-ágar, polpa de goiaba com casca e polpa de goiaba sem casca; os menos eficientes foram os de extrato de malte-ágar e farinha de soja-ágar.

Pelo teste de Kursbal-Wallis, foram constatados essas diferenças significativas ao nível de 1% seja nos meios com ou sem papel.

4.5. Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e esporulação de *Hendersonula toruloidea*

Os resultados deste ensaio estão apresentados na Figura 1 e Tabela 6. Os dados originais encontram-se no Apêndice.

Figura 1 - Crescimento do micélio de *Hendersonula toruloidea* em quatro fontes de nitrogênio na 5a. avaliação (60 h)

Nas diversas fontes nitrogenadas testadas para o crescimento do fungo, através de leituras a cada 12 horas, feitos dos diâmetros das colônias, pode-se afirmar que houve um menor crescimento no meio com nitrato de sódio com também observa-se na Figura 1. Porém, os dados não foram submetidos à análise estatística.

Tabela 6 - Efeito de fontes de nitrogênio e da superposição do papel de filtro (Whatman nº 1) na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea* na formação de luz

Fontes de Nitrogênio ¹	Nº de picnídios nos tratamentos ²		Médias
	sem papel	com papel	
Nitrato de sódio	18,7	34,5	26,6
Peptona	0,5	9,5	5,0
Caseína hidrolisada	1,0	12,7	6,9
Sulfato de amônia	1,6	13,7	7,7
Médias	5,5	17,6	-

¹ O meio basal é constituído pelo meio mínimo de Pontecorvo modificado.

² Média de 3 repetições, sendo cada uma representada por uma placa, com 10 campos de observação ao microscópio estereoscópio Wild M5-63207, com 60 vezes de aumento.

Já na formação de picnídios, ocorreu o inverso, ou seja, o nitrato de sódio produziu maior número de estruturas reprodutivas significativas ao nível de 5% na ausência do papel de filtro, entretanto na presença do papel não foram constatadas diferenças significativas entre as fontes nitrogenadas, pelo teste de Kruskal-Wallis.

A superposição do papel de filtro nos meios, influenciou numa maior esporulação, independente do meio utilizado, sendo significativo pelo teste de Wilcoxon ao nível de 0,6%.

4.6. Influência de diferentes fontes de carbono no crescimento e formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea*

Os resultados deste ensaio estão apresentados resumidamente na Figura 2 e Tabela 8 e os dados originais no Apêndice 5.

Figura 2 - Crescimento do micélio de *Hendersonula toruloidea* em cinco fontes de carbono na 5a. avaliação (60 h)

Tabela 7 - Efeito de diferentes fontes de carbono e superposição do papel de filtro na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea*

Fontes de Carbono ¹	Nº de picnídios nos tratamentos ²		Médias
	sem papel	com papel	
Glucose	7,7	12,4	10,1
Sacarose	5,7	13,2	9,5
Maltose	7,1	35,6	21,0
Amido	2,3	22,3	21,3
Lactose	2,1	24,4	13,3
Médias	5,0	21,6	

¹ O meio basal é constituído pelo meio mínimo de Pontecorvo modificado.

² Média de 10 campos (aumentos de 60 vezes) no microscópio estereoscópio Wild M5-63207/placa, média de 3 repetições, avaliado após 3 semanas de incubação.

Como mostra a Figura 2, o crescimento micelial foi levemente menor na fonte de glucose. O micélio nas diversas fontes de carbono era de coloração cinzenta e nos meios com glucose e sacarose na presença do papel era mais esbranquiçado.

Na ausência do papel, o número de picnídios formados era significativamente menor ao nível de 0,5% pelos testes de Kruskal-Willis, bem como eram menos desenvolvidos.

As melhores fontes de carbono nesse caso foram a maltose e a glucose; com níveis intermediários a sacarose e por último, o amido e a lactose. Essas diferenças são significativas ao nível de 2,5% pelos testes estatísticos.

Na presença do papel, não foram constatadas diferenças significativas entre as fontes de carbono. Entretanto foi observado variação no tamanho dos picnídios bem como a frequência de exsudação de esporos. Assim, a fonte de maltose favorecia um maior tamanho e maior número de picnídios com cirros. Nos meios com sacarose e glucose, praticamente só ocorreram primórdios de picnídios.

4.7. Influência de diferentes níveis de carbono e nitrogênio na formação de picnídios de *Hendersonula toruloidea*

Os resultados deste ensaio estão apresentados resumidamente nas Tabelas 8 e 9 e os dados originais no Apêndice 6 e 7.

Nos picnídios agrupados sem exsudação, a relação 5:3 difere significativamente ao nível de 5% da relação 10:12. Entre os demais tratamentos não foram constatadas diferenças significativas, o mesmo ocorrendo nos picnídios agrupados.

Tabela 8 - Efeito da relação maltose e nitrato de sódio (C/N) na formação de picnídios agrupados de *Hendersonula toruloidea*

NaNO ₃ (g/l)	Nº de picnídios nas dosagens de maltose (g/l) ¹					
	sem exsudação			com exsudação		
	5	10	20	5	10	20
3	19,0	5,3	16,5	8,5	22,8	17,0
6	7,7	3,0	7,0	10,8	19,8	14,0
12	3,0	0,5	6,5	9,0	6,5	23,0

Média de quatro repetições, cada uma representada por uma placa, sendo o meio total em 10 campos de observação ao microscópio estereoscópico Bauch e Lomb, modelo 0,7 x 3x, com 21 vezes de aumento, após 21 dias de incubação.

Tabela 9 - Efeito da relação maltose e nitrato de sódio (C/N) na formação de picnídios simples de *Hendersonula toruloidea*

NaNO ₃ (g/l)	Nº de picnídios nas dosagens de maltose (g/l)					
	sem exsudação			com exsudação		
	5	10	20	5	10	20
3	36,5	37,5	22,5	17,3	19,0	17,3
6	59,5	49,8	31,3	11,5	27,3	10,8
12	90,5	46,0	30,8	13,3	21,5	5,5

Média de quatro repetições, cada uma representada por uma placa, sendo observado o nº total em 10 campos ao microscópio estereoscópico Bauch e Lomb modelo 0,7 x 3x, com 21 vezes de aumento, após 21 dias de incubação.

Nos picnídios simples sem exsudação a relação 5/12 difere significativamente ao nível de 5% da relação 20/3. Entre os demais tratamentos não se constataram diferenças significativas. Para os picnídios simples com exsudação não foram constatadas diferenças entre as várias relações carbono/nitrogênio.

Nas avaliações aos 35 dias, somente foi constatada diferença significativa para picnídios simples com exsudação.

4.8. Efeito de Temperaturas na taxa de crescimento de três isolados de *Hendersonula toruloidea*

A taxa de crescimento a 15°C para os três isolados testados difere significativamente ao nível de 1% de todas as taxas correspondentes a 20°, 25°, 30°, e 35°C, sendo que entre eles não constou-se diferenças significativas.

Como não houve crescimento a 40°C em nenhum dos isolados, o referente a esse grau não foi incluído na análise estatística.

A análise de regressão revelou os seguintes resultados.

Figura 3 - Taxa de crescimento de três isolados de *Hendersonula toruloidea* em 6 temperaturas

a) Isolado H₁ constatou-se significância ao nível de 1% para a regressão quadrática, sendo a equação $\hat{y} = 60,4421 + 6,4464x - 0,1183x^2$.

b) Isolado 82 constatou-se alta significância para a regressão linear e quadrática ao nível de 1%, sendo a equação $\hat{y} = 51,7518 + 5,5144x - 0,1010x^2$.

c) Isolado 22 constatou-se significância ao nível de 5% para a regressão quadrática, sendo a equação $\hat{y} = -64,4371 + 6,4967x - 0,1187x^2$

Os dados originais e as análises encontram-se no Apêndice 8.

4.9. Testes de patogenicidade com três isolados de *Hendersonula toruloidea*

Os resultados deste experimento estão apresentados nas Tabelas 10 e 11 e os dados originais no Apêndice.

Tabela 10 - Patogenicidade de três isolados de *Hendersonula toruloidea* em plantas de figo

Tratamentos	Comprimento das lesões (mm)			Médias ²
	C ₁ ¹	M	C ₂	
Isolado 22	73,6 ²	43,4	59,0	58,7
Isolado H ₁	66,0	74,8	73,2	71,5
Isolado 82	17,6	7,0	17,0	13,9
Testemunha	8,9	1,6	9,2	6,4

¹ C₁, M e C₂ correspondem aos pontos de inoculação, sendo C₁ e C₂ ferimentos com corte na casca da região apical e basal, respectivamente e M ferimento com estilete na região mediana da planta.

² Média de 5 repetições correspondendo cada uma delas a uma planta incubada por 15 dias.

Figura 4. Características culturais e patogênicas de *Hendersonula toruloidea*. A. Crescimento micelial e esporulação em BDA. B. Patogenicidade em folha destacada de goiabeira. C e D em folhas e ramos de figueira.

Conforme a Tabela 10 observou-se que os isolados H₁ e 22 apresentaram maiores lesões no ramo de figo (Figura 4D) e não diferiram estatisticamente entre si quando inoculadados com discos de micélio através de corte, mas constatou-se diferença significativa ao nível de 1% quando inoculados com micélio aéreo no tratamento com ferimento Tipo M, onde o isolado H₁ apresentou lesão de comprimento maior.

Em relação ao isolado 82, as lesões foram bastante menores sendo essa diferença significativa ao nível de 1% em relação aos isolados H₁ e 22 (Tabela 10).

Em relação ao teste patogênico em folhas destacadas de figueira (Figura 4C), os resultados foram semelhantes.

No que se refere a folhas destacadas de goiabeira (Tabela 11), o isolado H₁ foi o mais patogênico. considerando os pontos de inoculações no P₁ (entre nervuras) os isolados H₁ e 82 apresentaram lesões de maior tamanho, não diferindo estatisticamente entre si; no P₂ (na nervura secundária) os isolados 22 e 82 não diferem estatisticamente entre si, o mesmo acontecendo no P₃. Em relação ao isolado H₁, porém, constatou-se diferença significativa ao nível de 1% (Ta-bela 11).

Tabela 11 - Patogenicidade em folhas de goiabeira, com três isolados de *Hendersonula toruloidea*, pelo método de folha destacada

Tratamentos	Pontos e inoculação ¹			Médias
	P ₁	P ₂	P ₃	
Isolado 22	12,7 ²	18,3	12,0	14,3
Isolado H ₁	115,3	84,3	63,0	87,5
Isolado 82	122,3	49,3	20,7	64,1
Testemunha	0,0	0,0	0,0	

¹ P₁ - entre nervuras; P₂ - na nervura secundária; e P₃ - na nervura principal próximo ao pecíolo.

² Tamanho da lesão, em mm². Média de três repetições após 8 dias de incubação.

Nas goiabeiras adultas, inoculadas em diversos estádios de florescimento e frutificação, não ocorreu a mumificação de frutos.

Nas plântulas de goiabeira, inoculadas através de ferimentos no lenho com inserção de discos de micélio, não houve aparecimento de sintomas.

Pelo método de inoculação em folhas de figueira e goiabeira mantidas na casa de vegetação, formaram-se após dois meses de inoculação pequenas lesões de até 1 cm de diâmetro; não porém, em todas as inoculações efetuadas.

4.10. Estudo morfológico de isolados de *Hendersonula toruloidea*

Os isolados de *Hendersonula toruloidea* apresentaram colônias de cor variável, sendo geralmente branca a acinzentada nas culturas jovens e, escurecendo na medida que iam envelhecendo, atingindo tons cinza escuro a preto e, ocasionalmente, esverdeado. Em meio de BDA, o micélio aéreo era profuso, com superfície irregular, à medida que se iniciava a formação de picnídios (Figura 4A).

Tabela 12 - Tamanho de picnidiósporos *Hendersonula toruloidea* (em micrômetros).

Isolados ¹	Comprimento (μm)		Desvio padrão (μm)	Largura (μm)		Desvio padrão (μm)
	Média	Variação		Média	Variação	
H ₁	16,8	(19,0-13,8)	1,2	6,5	(7,6-5,0)	0,6
22	16,6	(18,4-13,8)	1,4	6,4	(7,4-5,0)	0,6
H ₂	14,1	(16,6-10,7)	1,6	4,8	(5,5-3,8)	0,5
13	17,9	(19,9-16,3)	1,0	8,1	(9,2-7,1)	0,6
83	18,9	(20,2-15,8)	1,6	6,9	(9,0-5,7)	0,8

¹ Os picnidiósporos dos isolados H₁, 22 e H₂ foram obtidos de picnídios formados em ramos de goiabeira esterilizados enquanto os isolados 13 e 83 originaram-se em meio de BDA. Todos foram obtidos sob luz fluorescente contínua.

Quanto ao aspecto de tipos de picnídios, observaram-se picnídios simples e agrupados, ocorrendo exsudação de esporos em alguns meios utilizados e isolados estudados. O início da formação de picnídios variava segundo as condições de meio de cultivo.

Em relação ao tamanho dos picnidiósporos de *Hendersonula*, as medições do comprimento e largura estão apresentados resumidamente na Tabela 12. As médias de comprimento e largura foram variáveis, dependendo do isolado sendo H₁ e 22 semelhantes entre si e o H₂ menor. Os isolados 13 e 83 foram diferentes dos outros três isolados estudados, apresentando maior comprimento e/ou largura.

5. DISCUSSÃO

Dos gêneros de fungos encontrados no levantamento (Tabela 1), observa-se que os mais freqüentes (*Hendersonula*, *Fusarium*, *Pestalotia* e *Colletotrichum*) podem ser eventuais agentes patogênicos associados aos sintomas de seca dos ramos (goiabeira e figueira) e mumificação dos frutos (goiabeira).

Efetivamente, *Hendersonula* é citada como agente dessa síndrome em goiaba (SINGH, 1959) e em figueira (PAXTON, 1964); *Colletotrichum* é citado como agente da antracnose da goiabeira, que afeta principalmente folhas e ramos novos e frutos em qualquer fase de desenvolvimento (GALLI, 1980) e da antracnose dos frutos da figueira (KIMATI, 1980); *Pestalotia* é tida como fungo parasítico (BARNETT, 1972), e VALDEBENITO (comunicação pessoal) provou a patogenicidade em frutos maduros de goiabeira. Com Relação ao *Fusarium* não foi encontrada

nenhuma referência. Tendo em vista o maior índice de ocorrência de *Hendersonula* e a maior semelhança da síndrome da doença, presumiu-se-lhe a identidade etiológica. O fungo *Hendersonula*, embora relatado com certa frequência em outros países (CALAVAN e WALLACE, 1954; KHAN, 1955; OKAFOR, 1966; DAVINSON, 1972), principalmente pelo estágio *Torula*, no Brasil foi constatado somente a partir de 1971 e apenas em quatro hospedeiros: *Pinus* (*Pinus elliottii*) por LASCA e ABRAHÃO, 1971; pinho-do-paraná (*Araucaria angustifolia*) por LASCA e CARDOSO, 1974; criptoméria (*Cryptomeria japonica*) por PITTA *et alii*, 1981; fruto de mangueira por GHINI (comunicação pessoal). O fato de ter sido tão pouco pesquisado no Brasil, pode ser devido a sua difícil classificação, pois nas condições usuais de laboratório, é com dificuldade que o fungo atinge esporulação. Além disso, é facilmente confundido com outros gêneros.

Com relação aos resultados obtidos nos experimentos sobre esporulação de *H. toruloidea*, observa-se concordância com as afirmações genéricas que se fazem em livros textos de fisiologia de fungos (LILLY e BARNETT, 1951; HAWKER, 1957; COCHRANE, 1958; GRIFFIN, 1981), isto é, meios de cultura, luz, ferimento e outros fatores podem ter grande influência na esporulação. Segundo COCHRANE (1958), a mais abrangente generalização sobre esses efeitos é que a reprodução é iniciada por fatores que paralizam o crescimento de um micélio estabelecido, sem prejudicar tão drasticamente o seu metabo-

lismo; sendo a mais importante evidência os estudos sobre o efeito da luz, especialmente o da radiação ultravioleta. Nesse aspecto, os resultados do primeiro experimento sobre esporulação de *H. toruloidea*, mostrando que só na presença de luz ocorre esporulação, podem ser interpretados como tendo a mesma explicação, pois conforme LEACH (1971), a luz fluorescente visível comum, abrange espectro de luz ultravioleta. Por outro lado, o crescimento, contrariamente ao que se esperava, não foi inibido e sim estimulado na presença de luz. Isto pode ser devido, porém, ao incremento da temperatura.

A influência favorável da luz na esporulação de muitos fungos imperfeitos é amplamente conhecida (MARSH *et alii*, 1959; LILLY e BARNETT, 1951; HAWKER, 1957; COCHRANE, 1958; LEACH, 1971). Apesar do reconhecido efeito da luz na esporogênese, não se conhecem os mecanismos de ação. Segundo LEACH (1965), em fungos fotossensíveis por ele estudados, substâncias esporogênicas são induzidas a se formarem pela ação de luz ultravioleta. É possível que *H. toruloidea* se enquadre dentro deste grupo, uma vez que a análise do espectro de radiação das lâmpadas fluorescentes e luz do dia, revela presença de radiações com comprimento de onda de 310 nm (LEACH, 1971), pico de absorção de substâncias esporogênicas isoladas por TRIONE *et alii* (1966).

Outra evidência apontada por COCHRANE (1958)

para a generalização anteriormente feita é que a mutilação grosseira por raspagem ou corte, induz esporulação em alguns fungos, como na *Alternaria solani*. Na presente pesquisa, conseguiu-se resultado semelhante com *H. toruloidea*, porém, somente quando as culturas feridas foram submetidas à luz.

Em todos os ensaios subsequentes de esporulação de *H. toruloidea*, a influência mais evidente foi a da superposição do papel de filtro no meio agarizado (Tabelas 4, 5, 6 e 7). Era esperado o efeito favorável do papel em conformidade com os relatos da literatura em outras espécies fúngicas (LUKENS, 1960; Mc DONALD e MARTENS, 1963; REIS, 1973), se bem que KIMATI (1975) tivesse concluído que o efeito favorável ou desfavorável do papel de filtro, depende da concentração do meio de cultura. A presença de celulose no papel de filtro foi especulada como sendo a responsável pelo aumento da superfície de esporulação (REIS, 1973). Pode, entretanto, ter outras explicações, pois o efeito indutor do papel de filtro na esporulação de *Alternaria zinniae* foi conseguido por Mc DONALD e MARTINS (1963) cobrindo com ágar-água discos de papel de filtro impregnados de suco V-8. NAKAMURA (1975) levantou a hipótese de o papel de filtro fornecer nutrientes ausentes no meio BDA.

Segundo HAWKER (1957), nutrição é, talvez, o mais importante fator individual no controle de crescimento e

reprodução dos fungos, e a natureza, a concentração e quantidade total do suprimento alimentar desempenham papel importante na determinação do início da formação dos esporóforos ou esporos, na quantidade destes, e na sua forma e tamanho. Nos experimentos do presente trabalho, os resultados confirmam essas afirmações genéricas e, dentre os meios naturais utilizados, o que satisfizesse melhor as exigências nutricionais foi o de batata-cenoura-ágar.

Na análise nutricional não é de estranhar o fato de se ter encontrado maltose como a melhor fonte de carbono (Tabela 7) e nitrato de sódio como a melhor de nitrogênio (Tabela 6), pois, conforme HAWKER (1957), a natureza do suprimento alimentar é importante para influenciar a esporulação e, segundo COCHRANE (1958), cada organismo deve ser estudado individualmente pois não existe nenhuma "fórmula" para esporulação. Com relação à melhor fonte de carbono, entretanto, foge à regra apontada por HAWKER (1966) de muitos fungos que para formarem esporos assexuais são favorecidos por hexoses.

Segundo LILLY e BARNETT (1957), é muito importante um equilíbrio apropriado entre os constituintes do meio no crescimento e esporulação de fungos. Neste sentido, a quantidade relativa de uma fonte nitrogenada em função da quantidade da fonte de carbono agindo pelo fator carbono/nitrogênio,

desempenha importante papel na esporulação dos fungos em geral (HAWKER, 1957). Os resultados do ensaio C/N se ajustam nesse contexto geral e mostram, especificamente, que a relação C/N pode influenciar na maior ou menor quantidade de picnídios simples e/ou agrupados a serem obtidos (Tabelas 8 e 9).

Com relação ao ótimo de temperatura (em torno de 25 a 30°C) determinado pela sua taxa de crescimento, para três isolados de *Hendersonula toruloidea*, o fungo se assemelha àquele estudado por DAVINSON (1972), porém, outros autores (NATTRASS, 1933; WILSON, 1949; e CALAVAN e WALLACE, 1954) obtiveram o ótimo de temperatura, entre os 30 e 35°C. Na temperatura máxima testada no presente trabalho, 40°C, nenhum dos isolados se desenvolveu, porém, todos se desenvolveram a 35°C, o que vai contra os resultados de DAVINSON (1972), cujo fungo foi inibido a 35°C, e de NATTRASS (1933) e de CALAVAN e WALLACE (1954), cujos isolados tiveram crescimento vigoroso a 39-40°C. Não obstante estas diferenças apontadas, é preciso lembrar que, como já chamava atenção COCHRANE (1958), os ótimos e os espectros de temperaturas, são válidos somente sob condições especificadas de tempo, meio e método de medidas.

Com relação aos testes de patogenicidade levados a efeito no presente trabalho, o fato de o fungo não se ter mostrado patogênico em flores, frutos e ramos novos de goiabeira com e sem fermento, pode ser devido ao seu hábito

de parasita facultativo, conforme é considerado por PAXTON e WILSON (1965). Esses autores, considerando, ainda, que a associação desse fungo a muitos hospedeiros, nos quais frequentemente cresce sobre ramos mortos, não tinha sido complementado com testes de inoculação, chamam a atenção para a necessidade de satisfazer todos os postulados de Koch. Os resultados positivos da inoculação em ramos de figo, com ferimento e em folhas destacadas de goiabeira e figueira, vem comprovar que realmente *H. toruloides* é um parasita facultativo. Esses resultados estão de acordo com trabalhos mais recentes de ENGLISH et alii (1975) que, em amendoeira, consideram *H. toruloides* como um invasor secundário, muito sensível a temperatura e capaz de causar infecção apreciável somente no verão. Esta afirmativa encontra respaldo no trabalho de DAVINSON (1972) que estudando a influência do tipo de ferimento e de temperatura na relação *H. toruloides* encontrou grande efeito dos tratamentos, sendo que somente a 25°C, testemunhas sem ferimento desenvolveram lesão.

O método de folhas destacadas tem sido empregado em testes de patogenicidade, estudo de raças, avaliação de fungicidas entre outros; pois além de apresentar a vantagem de economia de espaço, material vegetal, inóculo, facilita a observação (YARWOOD, 1946 e TUIE, 1969). O método tem sido empregado em diversos hospedeiros e para diferentes patógenos, conforme relata MORAES e SALGADO (1982). A importância

do uso de folhas novas para os testes, recomendado por TUIITE (1969) é retificado por diversos autores (MISRA e MISRA, 1976; MELOUK e BANK, 1978; e FOSTER *et alii*, 1980). O apodrecimento e a senescência relativamente rápida das folhas destacadas de várias espécies vegetais, tem sido considerado como fatores mais limitantes para estudos que requerem período de tempo mais longo (YARWOOD, 1946). No presente trabalho, para a prova de patogenicidade o método se mostrou bastante satisfatório.

Hendersonula toruloidea descrito por NATTRASS (1933), apresenta a característica de ter dois tipos de conídios, os artrósporos (estágio *Torula*) e os picnidiósporos (estágio picnidial). Este autor, após dois anos de levantamentos periódicos encontrou somente em alguns ramos mortos de abricoeiros o estágio picnidial. Considerou ser o estágio *Torula* o mais frequente e não obteve picnídios em meios de cultura. Além dos artrósporos do tipo *Torula*, WILSON (1949), observou que seus isolados são semelhantes ao descrito por NATTRASS (1933) e denominou *Exosporina fawcetti* como estágio conidial de *H. toruloidea* para ramos de nogueira de Pérsia. Mais recentemente, PANDEY (1981) observou o estágio *Scytalidium* de *H. toruloidea* causando manchas foliares da mangueira. Dos inúmeros isolamentos realizados na presente pesquisa, não se constatou artrósporos dos tipos acima mencionados. Entretanto, considera-se os isolados obtidos serem *H. toruloidea* pelas

suas características morfo-fisiológicas, visto que no relato de PUNITHALIGAM e WATERSTON (1970) do CMI da Inglaterra citam que "eventualmente" o micélio forma o estágio *Torula*.

Diversos fatores podem influir nos aspectos morfológicos de esporos e corpos frutíferos segundo HAWKER (1957), tais como temperatura, conteúdo de água no substrato, pH do meio, etc. Isso talvez justifique as variações dos caracteres morfológicos encontrados na literatura e no presente trabalho. É possível que, pelo fato de *Hendersonula toruloidea* formar um maior quantidade picnidiósporos hialinos, raramente do tipo escuro com dois septos, tenha proporcionado confusões com outros gêneros. Assim como *Macrophoma allahabadensis* descrita por KAPOOR e TANDON (1970) como sendo uma nova espécie causando podridão de frutos de goiabeira seja a *H. toruloidea*, pois não diferem muito nas suas dimensões e os mesmos tipos de picnídios (simples ou agrupados) estão presentes.

6. CONCLUSÕES

O fungo estudado é *Hendersonula toruloidea* Nattras. Apresenta picnidiósporos sem septos e com 1 ou 2 septos; de dimensões 14,1 a 18,9 μm de comprimento e 4,8 a 6,9 μm de largura; picnídios isolados ou agrupados. É patogênico a folhas-destacadas de goiabeira e figueira em ramos de figueira, frutos verdes e maduros de goiaba destacadas da planta. A melhor esporulação se deu em meios de Sabouraud-maltose-água com ferimento do micélio e nos meios de Czapek e de batata-cenoura-água na presença de papel de filtro, sob luz fluorescente contínua. Cresce melhor na faixa de 25-30°C, sendo completamente inibido a 40°C. Sua melhor esporulação é com maltose como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, tendo a relação C/N influência no tipo e número de picnídios formados.

7. LITERATURA CITADA

ACHILEA, O. e A. SZTEJNBERG, 1976. A gummosis disease on lemon trees caused by fungus *Hendersonula toruloidea* Nat. (Horticultural Abstracts, East Mailing, 47:3021).

AL-HASSAN, K.K.; S.A. AL-HASSAN e F. HUSSAIN, 1970. Outbreaks and new records. Plant Protection Bulletin, FAO. Roma, 18:114.120.

AL-ZARARI, A.J.; A.A. ATTRACKCHI; A. M. TARABEIB e S.H. MICHAIL, 1979. New hosts for *Hendersonula toruloidea*. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research. 22:251. (Review of Plant Pathology, California, 60:138).

BARNETT, H.L. e B.B. HUNTER, 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 3a. ed. 241p.

- BRODRICK, H.T. e G.C.A. van der WESTHUIZEN, 1978. *Hendersonia creberrima*, the cause of soft brown rot of mango in South Africa. The Citrus and Subtropical Fruit Journal, Johannesburg, 532:3-5.
- CALAVAN, E.C. e J.M. WALLACE, 1948. Exosporina branch blight of grapefruit in Southern California. Phytopathology, Saint-Paul, 38:913.
- CALAVAN, E.C. e J.M. WALLACE, 1954. *Hendersonula toruloidea* Nattrass on citrus in California. Phytopathology. Saint-Paul, 44:635-639.
- CAMARGO, M., 1981. Crescimento e esporulação do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em diferentes meios de cultura. Piracicaba, ESALQ/USP, 51p. (Dissertação).
- CAMPBELL, C.K., 1976. Hyphal wall swelling in *Hendersonula toruloidea*. Transactions of the British Mycological Society, London, 66:158-159.
- CAMPOS, H., 1983. Estatística Experimental não Paramétrica. Piracicaba, Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ/USP. 4a. ed. 349p.
- COCHRANE, V.W., 1958. Physiology of fungi. John Wiley and Sons., Inc., New York. 526p.
- DAVINSON, A.D., 1972. Factors affecting development of madrone canker. Plant Disease Reporter, Washington, 56:50-52.

- DEARNESS, J., 1928. New and noteworthy fungi. Deuteromycetes sphaeropsidales. Mycologia, New York, 20:235-246.
- DIENER, U.L., 1955. Sporulation in pure culture by *Stemphylium solani*. Phytopathology, Saint-Paul, 45:141-145.
- ENGLISH, H.; J.R. DAVIS e J.E. DE VAY, 1975. Relationship of *Botryosphaeria dothidea* and *Hendersonula toruloidea* to a canker disease of almond. Phytopathology, Saint-Paul, 65:114-122.
- FAWCETT, H.S., 1936. Citrus diseases and their control. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York. 656p.
- FARROW, W.M., 1954. Tropical soil fungi. Mycologia, New York. 46:632-646.
- FOOTT, J.H., A.H. HENDRICKSON e E.E. WILSON, 1955. Walnut branch wilt. California Agriculture. Berkeley, 9:11.
- FOSTER, D.J.; J.C. WYNNE e M.K. BEUTE, 1980. Evaluation of detached leaf culture for screening peanuts for leaf-spot resistance. Peanut Science, 7:98-100.
- GALLI, F., 1980. Doenças da goiabeira *Psidium guajava* L. In: GALLI, F. Coord. Manual de Fitopatologia. São Paulo, Ceres, V. 2, p. 335-337.
- GIHA, O.H., 1975. *Hendersonula toruloidea* associated with a serious wilt disease of shade trees in the Sudan. Plant Disease Reporter. Washington, 59:899-902.

- GRIFFIN, D.H., 1981. Fungal Physiology. New York, John Wiley Sons, 383p.
- HARTMANN, G. e F. NIENHAUS, 1974. Gummos-Erreger Phytophthora citrophthora (Smith & Smith) Leonian und *Hendersonula toruloides* Nattrass an *Citrus limon* in Libanon. I. Identifizierung und symptomatologie. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Göttingen, 81:269-286.
- HAWKER, L.E., 1957. The physiology of reproduction in Fungi. Cambridge, University Press, 128p.
- HAWKER, L.E., 1966. Environmental influences on reproduction. In: AINSWORTH, G.C. e A.S. SUSSMAN, Ed. The Fungi. New York, Academic Press, V. 2, p.435-469.
- HÖHNEL, F. von, 1927. Über *Hendersonula macrosperma* Cav. Mitteil. Bot. Inst. Tech. Hochschule Wien. 4:94-96. (Biological Abstract. Menasha. 16802).
- KAPOOR, I.J. e R.N. TANDON, 1970. A new species of *Macrophoma* causing fruit rot of guava. Indian Phytopathology, New Delhi, 23:122-125.
- KELMAN, A. Org., 1967. Sourcebook of laboratory exercises in plant pathology. San Francisco, Freeman, 387p.
- KHAN, A.H., 1955. A new disease of mulberry in the forest plantations of the Punjab. Pakistan Journal Science Research, 7:92-97.

- KHAN, A.H. e A.S. BOKHARI, 1970. Damage due to fungus diseases in Bhagat reservoir plantation. Lyallpur forest division. Pakistan Journal Forester, 20:293-311. (Biological Abstracts 52:45185).
- KIMATI, H., 1975. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu Arx. 1957). Piracicaba, ESALQ/USP, 103p (Tese de Livre-Docência).
- KIMATI, H., 1980. Doenças de figueira *Ficus carica* L. In: GALLI, F. Coord. Manual de Fitopatologia. São Paulo, Ceres, V. 2, p.319-323.
- LASCA, C.C. e J. ABRAHÃO, 1971. *Hendersonula* (Speg.) sp., agente causal da morte de plantas de *Pinus elliottii*. O Biológico. São Paulo, 37:91-95.
- LASCA, C.C. e R.M.G. CARDOSO, 1974. Estudo da patogenicidade do fungo de *Hendersonula* Speg. sp. a *Pinus* spp. e *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Ktze. In: Resúmenes de los Trabajos Presentados en la XIII Reunión Anual de la División del Caribe de la Sociedad Americana de Fitopatologia; San José de Costa Rica. 1973.
- LAXMINARAYANA, P. e S.M. REDDY, 1975. Hitherto unrecorded post-harvest disease of apple. Current Science, 44:442. (Review of Plant Pathology, California, 55:1350).

- LEACH, C.M., 1962. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 40:151-161.
- LEACH, C.M., 1965. Detection of ultraviolet absorbing substances in living mycelium of fungi. Mycologia, Lancaster, 57:291-300.
- LEACH, C.M., 1971. A practical guide to the effect of visible and ultraviolet light on fungi. In: NORRIS, J.R. e D.W. RIBBONS, Ed. Methods in Microbiology V.4. New York, Academic Press, p.609-664.
- LILLY, V.C. e H.L. BARNETT, 1951. Physiology of the fungi. New York, Mc-Graw Hill Book Co., Inc. 464p.
- LUKENS, R.L., 1960. Conidial production from filter paper cultures of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. Phytopathology, Saint-Paul, 50:867-868.
- MACHADO, C.C., 1980. Esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. e viabilidade do método de inoculação de esporos em estudos de seleção de germoplasma resistente. Piracicaba. ESALQ/USP, 66p. (Dissertação).
- MATHUR, R.L. e R.D. SINGH, 1959. Torula stage of *Hendersonula toruloidea* Nattrass on twigs of *Psidium guajava* L. Current Science. Bangalore, 28:124-125.

- MATHUR, R.L. e R.D. SINGH, 1964. Pycnidial stage of *Hendersonula toruloidea* on twigs of *Psidium guajava* in artificial culture. Indian Phytopathology, 17:216-217. (Review of Plant Pathology, California, 60:1629).
- MARSH, P.B. e E.E. TAYLOR, 1959. A guide to the literature on certain effects of light on fungi: reproduction, morphology, pigmentation and phototropic phenomena. Plant Disease Reporter, Washington, Supple 261, p.251-312.
- MCDONALD, W.C. e J.W. MARTENS, 1963. Leaf and stem spot of sunflower caused by *Alternaria zinniae*. Phytopathology, Saint-Paul, 53:93-96.
- MELOUK, H.A. e D.J. BANKS, 1978. A method of screening peanut genotypes for resistances to *cercospora* leaf spot. Peanut Science, 5:112-114.
- MEREDITH, D.S., 1963. Tip rot of banana fruits in Jamaica. I. *Hendersonula toruloidea* on dwarf cavendish bananas. Transactions of the British Mycological Society, London, 46:473-481
- MISRA, A.K. e A.P. MISRA, 1976. Groundnut in Birharvarietal reaction. Indian Phytopathology, New Delhi, 28:557-559.
- MORAES, S.A. e C.L. SALGADO, 1982. Utilização da técnica de folhas destacadas de amendoim (*Arachis hypogae* L.) para inoculações com *Cercospora arachidicola* (Hori) e *Cercospora personata* (Berk & Curt) Ell. e Ev. Summa Phytopathologica Piracicaba, 8:39-55.

- NAKAMURA, A.M., 1975. Fisiologia da reprodução e patogenicidade de *Ascochyta phaseolorum* Saccardo, Piracicaba, ESALQ/USP, 121p. (Dissertação).
- NATOUR, R.M. e H. EL-HAIDERI, 1967. Occurrence of branch wilt disease caused by *Hendersonula toruloidea* in Iraq. Plant Disease Reporter, Washington, 51:371-373.
- NATTRASS, R.M. 1933. A new species of *Hendersonula* (*H. toruloidea*) on deciduos trees in Egypt. Transactions of the British Mycological Society, London, 18:189-198.
- NATTRASS, R.M., 1937. A first list of *Cyprus fungi*. Nicosia, Cyprus Department of Agriculture, 87p. (Review of Applied Mycology, California, 17:346).
- OGAWA, J.M., 1954. The occurrence of *Hendersonula toruloidea* Nattrass on *Populus* species in California. Plant Disease Reporter. Washington, 38:238.
- OKAFOR, N., 1966. Microbial rotting of stored yams (*Discorea* spp.) in Nigeria. Experimental Agriculture, London, 2: 179-182.
- PANDEY, R.S.; S.N. BHARGAVA; D.N. SHUKLA e D.V.S. KHATI, 1981. A new leaf spot disease of mango. Plant Disease. New York, 65:441-442.

- PAXTON, J.D.; E.E. WILSON e J.R. DAVIS, 1964. Branch wilt disease of fig caused by *Hendersonula toruloidea*. Plant Disease Reporter. Washington, 48:142.
- PAXTON, J.D. e E.E. WILSON, 1965. Anatomical and physiological aspects of branch wilt disease of Persian walnut. Phytopathology, Saint-Paul, 55:21-26.
- PETRAK, F. e H. SYDON, 1927. Die Gattungen der Pyrenomyzeten. Sphaeropsideen und Melanconieen, Berlin, Verlag des Repertoriums. V. 1. 551p.
- PITTA, G.P.B.; J.V. SANCHES, 1981. *Hendersonula* (Speg) sp agente da morte de plantas de *Cryptomeria japonica* D. Don *Elegans*. In: IV Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas (47. (Resumos).
- PUNITHALIGAM, E. e J.M. WATERSTON, 1970. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, nº 274. Kew, Commonwealth Agriculture Bureaux, nº 274.
- REIS, E.M., 1973. Efeito da concentração de inóculo de *Colletotrichum dematium* f. *truncata* (Schw.) Merrill, Piracicaba, ESALQ/USP, 48p (Dissertação).
- ROGER, L., 1953. Phytopathologie des Pays Chauds. Paris, Paul Lechevalier Éditeur. V. 2. 2256p.
- SEALL, P.J., 1976. Esporulação e patogenicidade de *Diaporthe phaseolorum* (Cke) Ell. var. *sojae* (Lehman) Wehmeyer. Piracicaba, ESALQ/USP, 60p. (Dissertação).

- SHAWKAT, A.L.B., A.M. TARABEIH; A.A. ATTRACKCHI e J.M. AHMED, 1979. Species of populus and pinus as new hosts of *Hendersonula toruloidea* Nattrass in Minevah. Iraq. Mesopotamia Journal of Agriculture, 14:99-106. (Review of Plant Pathology. California, 60:48).
- SINGH, S. e B.M. MISRA, 1980. Gummosis and canker in cashew (*Anacardium occidentale* Linn.). Indian Forester, Calcutta. 106:220-223.
- SOMMER, N.F., 1955. Sunburn predisposes walnut trees to branch-wilt. Phytopathology, Saint-Paul, 45:607-613.
- SUTTON, B.C., 1973. Coelomyces. In: AINSWORTH, G.C.; F.K. SPARROW e A.S. SUSSMAN (Ed.). The Fungi an advanced treatise. New York, Academic Press, V. 4 a, p.513-621.
- TRIONE, E.J.; C.M. LEACH e J.T. MUTCH, 1966. Sporogenic substances isolates form fungi, Nature, London, 212: 163-164.
- TUITE, J., 1969. Plant pathological methods. Fungi and Bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 239p.
- VERGARA, C.C., 1967. Nuevas determinaciones de organismos patógenos que afectan cultivos de importancia para Chile. Fitopatologia, Santiago, 2:46-48.
- WANGIKAR, P.D.; J.D. RAUT e N. GOPALKRISHNA, 1969. Drying of grape vines caused by *Hendersonula toruloidea*. Indian Phytopathology, New Delhi, 22:403-404.

- WILSON, E.E., 1947. The branch wilt of Persian walnut trees and its cause. Hilgardia, 17:413-436.
- WILSON, E.E., 1949. The picnidial stage of walnut branch wilt fungus. *Exosporina fawcetti*. Phytopathology, Saint-Paul, 39:340-346.
- YARWOOD, C.E., 1946. Detached leaf culture. The Botanical Review, Lancaster, 12:1-56
- YOUNG, H.E., 1948. *Hendersonula agathi* n. sp., the cause of leaf cast of Kauri Pine in Queensland. Queensland Journal Science, Queensland, 5:9-12.

8. APENDICE

1. Dados originais referentes às Tabelas 3.

Posição do ferimento na placa ²	Nº de picnídios em diferentes meios ¹											
	BDA			Czapek's			V-8			SMA		
	Sem ferimento											
P ₁	17	10	9	0	3	1	2	3	8	14	27	25
P ₂	7	2	3	2	4	1	2	6	6	24	27	34
P ₃	2	2	3	5	5	5	6	4	14	36	38	35
P ₄	1	3	3	23	16	31	8	9	12	41	42	32

Posição do ferimento na placa ²	Nº de picnídios em diferentes meios ¹											
	BDA			Czapek's			V-8			SMA		
	Com ferimento											
P ₁	11	12	14	6	5	0	5	6	11	78	82	61
P ₂	6	8	11	7	12	0	9	12	13	67	67	71
P ₃	7	10	11	12	10	15	12	20	12	70	70	76
P ₄	22	13	15	18	20	35	27	19	30	74	66	61

¹ Nº total de picnídios de 4 leituras para cada posição por repetição.

² Posição das leituras efetuadas nas placas, onde P₁ é o ponto mais central e P₄ nos bordos das placas.

2. Dados originais referentes à Tabela 4 e sua análise estatística

	Nº de picnídios nos tratamentos/repetição ¹					
	sem papel			com papel		
SMA	3,7	4,8	5,0	15,8	16,8	15,2
V-8	5,2	5,8	4,7	11,5	13,2	12,5
Czapek's	4,8	5,0	6,2	34,8	37,0	31,7

¹ Média do nº de picnídios por repetição/tratamento em 6 campos de observação.

- a) A presença do papel de filtro foi significativo ao nível de 1%, onde $H_1 = 15,16$ e $x^2 = 15,09$, pelo teste Kruskal-Wallis.
- b) Aplicando o teste de Wilcoxon, para verificar a formação dos picnídios, com ou sem papel independente do meio utilizado, verificou-se que há diferença significativa ao nível de 0,05% onde $W = 45$, sendo $R(i) = 45$ e $R(i) = 126$, sem e com papel, respectivamente.
- c) Analisando os meios entre si na ausência de papel, não se constatou diferenças entre os meios pelo teste Kruskal-Wallis.
- d) Analisando os meios entre si na presença de papel, foi significativo ao nível de 0,4%, pelo teste Kruskal-Wallis, onde $H_1 = 7,2$ pelo teste de comparações múltiplas, ao nível de 1% e d.m.s. = 17,0 há diferenças significativas entre V-8 e Czapek's.

3. Dados originais referentes à Tabela 5 e sua análise estatística

Meios de cultura	Nº de picnídios nos tratamentos/repetição							
	sem papel				com papel			
Farinha de soja-ágar	25	28	26	22	98	55	61	83
Batata-cenoura-ágar	75	65	54	70	173	268	259	327
Farinha de aveia-ágar	52	34	31	21	140	159	129	192
Polpa de goiaba c/casca	15	18	13	12	169	178	142	124
Polpa de goiaba s/casca	0	0	0	0	166	105	155	104
Extrato de malte-ágar	0	0	0	0	112	89	99	86

- a) A presença do papel de filtro Whatman nº 1 foi significativo ao nível de 0,5%; $H_1 = 58,37$ e $x^2 = 26,76$, pelo teste Kruskal-Wallis.
- b) Formação de picnídios sem papel de filtro, foi significativo ao nível de 0,5%, sendo $H_1 = 22,1$ e $x^2 = 16,75$ para o teste Kruskal-Wallis. Pelo teste de comparações múltiplas, ao nível de 1%, onde d.m.s. = 16,8, foi significativo para todos tratamentos, exceto o meio farinha de soja-ágar e farinha de aveia-ágar, quando comparados entre si.
- c) Formação de picnídios com papel de filtro, foi significativo ao nível de 0,5%, onde $H_1 = 18,89$ e $x^2 = 16,76$ pelo teste de Kruskal-Wallis. Pelo teste comparações múltiplas, ao nível de 1%, onde d.m.s. = 16,8, não diferem entre si os meios farinha de aveia-ágar, polpa de goiaba com e sem casca-ágar.

4. Dados originais referentes à Tabela 6 e sua análise estatística

Meios de cultura	Nº de picnídios nos tratamentos/repetição ¹					
	sem papel			com papel		
Nitrato de sódio	139	231	192	312	378	-
Peptona	13	1	1	116	90	78
Cas. hidrolizada	3	19	9	115	128	138
Sulfato de amônia	12	14	23	169	173	69

¹ Nº total de picnídios por repetição/tratamento em 10 campos de observação.

- a) A presença do papel de filtro foi significativo ao nível de 1% e o $H_1 = 19,77$ e $x_7^2 = 18,48$.
- b) Pelo teste de Wilcoxon, os tratamentos com papel são superiores em relação aos tratamentos sem papel ao nível de 0,6% onde $W^* = 2,52$.
- c) Analisando-se os meios entre si na ausência de papel, foi significativo ao nível de 5%, onde $H_1 = 8,11$ e $x_3^2 = 7,81$. Pelo teste de comparações múltiplas, ao nível de 5% onde d.m.s. = 7,56, foi significativo a diferença para nitrato de sódio em relação à peptona.
- d) Analisando-se meios entre si na presença de papel, onde $H_1 = 5,65$ e $x_3^2 = 4,11$, não se constatou diferenças significativas entre os tratamentos.

5. Dados originais referentes aos resultados apresentados na Tabela 7 e Figura 2 e sua análise estatística

Número de leitura	Diâmetro das colônias nos tratamentos ¹ (mm)				
	Glucose	Sacarose	Maltose	Amido	Lactose
1	18,2	21,4	16,7	22,8	19,6
2	30,2	37,2	28,8	39,0	36,8
3	38,2	46,2	41,0	50,2	50,8
4	50,8	59,2	56,8	67,4	69,0
5	63,0	68,2	68,8	76,6	81,2
6	76,4	79,2	79,4	88,6	88,2
7	83,4	84,4	86,4	90,0	90,0
8	88,0	88,0	89,0	-	-

¹ Média de duas leituras do diâmetro da colônia a cada 12 horas em cinco repetições, sem papel de filtro sob luz contínua. Foi utilizado para o gráfico a 5a. leitura do diâmetro das colônias.

Fontes de carbono	Nº de picnídios nos tratamentos ¹					
	sem papel			com papel		
Glucose	63	92	77	157	65	150
Sacarose	52	72	47	160	131	104
Maltose	73	70	69	196	402	469
Amido	16	31	23	310	118	241
Lactose	28	16	20	258	217	258

¹ Nº total de picnídios em 10 campos de observação por repetição, cada uma, representa uma placa.

Os dados foram submetidos à análise estatística não paramétrica.

- a) A presença de papel foi significativa ao nível de 0,5% pelo teste Kruskal-Wallis, sendo o valor $H_1 = 25,87$.
- b) O comportamento das diferentes fontes de carbono na ausência de papel foi significativo ao nível de 2,5%, sendo o valor de $H_1 = 11,21$ e $\chi^2 = 11,14$. Pelo teste de comparações múltiplas, não há diferença significativa entre glucose e maltose; sacarose e maltose; amido e lactose; entre as demais comparações há significância ao nível de 1%, onde d.m.s. = 11,9.

6. Dados originais referentes à Tabela 8 e sua análise estatística

Relação C/N (g/l)	Nº de picnídios agrupados em estroma/repetição ¹							
	sem exsudação				com exsudação			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5:3	27	15	11	23	4	19	3	8
10:3	6	3	9	3	31	11	27	22
20:3	46	10	3	7	8	22	25	13
5:6	7	9	4	11	7	14	6	16
10:6	1	5	1	5	22	11	19	27
20:6	3	3	17	5	13	14	15	14
5:12	0	10	1	1	2	13	19	2
10:12	0	1	1	0	11	1	8	6
20:12	11	7	5	3	10	20	52	10

¹ Nº total de picnídios observados em 10 campos de observação.

a) Picnídios agrupados em estroma sem exsudação pelo teste

Kruskal-Wallis foi significativo ao nível de 5%, onde $H_1 = 18,99$ e $\chi^2_8 = 16,92$ e pelo teste comparações múltiplas, constatou-se diferenças significativas ao nível de 1% entre a relação C/N 3:5 e 12:10, entre os demais tratamentos não foi constatado diferenças significativas, sendo o d.m.s. 23,11.

b) Picnídios agrupados em estroma com exsudação, pela análise do teste Kruskal-Wallis, não foi significativo e o valor de $H_1 = 14,58$ e $\chi^2_8 = 15,51$ para $\alpha = 0,05$.

7. Dados originais referentes à Tabela 9 e sua análise estatística

Relação C/N (g/l)	Pictídios simples							
	sem exsudação				com exsudação			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5:3	32	34	42	38	21	10	37	1
10:3	37	21	52	40	20	38	7	21
20:3	43	20	19	8	19	26	15	9
5:6	80	35	87	36	17	18	8	3
10:6	65	61	49	24	35	48	23	3
20:6	30	27	36	32	11	12	11	9
5:12	139	64	67	92	10	23	15	5
10:12	44	24	46	70	32	14	30	10
20:12	46	9	52	16	1	7	10	4

a) Sem exsudação, pelo teste Kruskal-Wallis, foi significativo ao nível de 5%, onde $H_1 = 16,46$ e $\chi^2_8 = 15,51$ e pelo teste de comparações múltiplas constatou-se diferenças significativa entre os tratamentos 12:5 e 3:20, entre os demais tratamentos não foi constatado diferenças significativas e o d.m.s. = 23,11.

b) Com exsudação, pelo teste Kruskal-Wallis, não foi constatado diferença significativa, pois, $H_1 = 9,78$ e $\chi^2_8 = 10,22$ para $\alpha = 0,25$.

8. Dados originais referentes à Figura 3 e sua análise estatística

1) Taxa de crescimento do isolado H₁ em diferentes temperaturas em mm/dia

Repe- tições	Temperaturas (°C)				
	15	20	25	30	35
1	8,63 ¹	26,25	35,63	19,13	24,38
2	9,18	19,13	20,43	25,88	14,06
3	9,75	21,38	27,38	32,70	21,75
4	6,38	16,50	22,50	23,25	19,80
5	13,88	21,75	32,25	26,25	22,88

¹ Média de 4 repetições por temperatura.

Análise de variância

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Temperaturas	4	973,254	243,3135	11,94 ^{**}
Resíduos	20	407,6097	20,3805	
Total	24	1380,8637		

Comparações múltiplas (Teste de Tukey)

5% = 8,540

1% = 10,680

Análise de regressão

	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	350,9130		72,06*
Regressão quadrática	1	612,0018		125,79**
Desvio da regressão	2	9,7399	4,8699	
Total	4	973,2547		
Equação $\hat{Y} = -60,4421 + 6,4464x - 0,1183x^2$				

2) Taxa de crescimento do isolado 82 em diferentes temperaturas em mm/dia

Repetições	Temperaturas (°C)				
	15	20	25	30	35
1	6,75	19,50	28,50	19,88	21,75
2	9,19	15,94	21,19	22,31	17,07
3	9,38	21,00	20,62	18,00	18,75
4	8,19	15,38	22,50	22,88	17,81
5	7,12	22,50	24,00	34,88	16,88
6	7,50	15,56	20,25	19,12	13,12
Total	49,13	109,88	137,06	137,07	105,38
Médias	8,19	18,31	22,84	22,84	17,56

* Média de 4 repetições/temperatura.

Análise de variância

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Temperaturas	4	860,8630	215,2158	15,48**
Resíduos	24	333,6606	13,9025	
Total	28	1194,5236		

Comparações múltiplas (Teste de Tukey)

5% = 6,348

1% = 7,870

Análise de regressão

	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	325,2216		1898,00**
Regressão quadrática	1	535,3000		3124,02**
Desvio da regressão	2	0,3427	0,1714	
Total	4	860,8643		

$$\text{Equação } \hat{Y} = -51,7518 + 5,5144x - 0,1010x^2$$

3) Taxa de crescimento do isolado 22 em diferentes temperaturas em mm/dia

Repe- tições	Temperaturas (°C)				
	15	20	25	30	35
1	1,875	17,625	26,250	18,000	26,250
2	5,440	14,250	23,625	21,940	19,313
3	7,125	19,875	28,875	18,000	19,875
4	5,250	11,375	19,875	23,250	20,250
5	5,625	27,375	27,000	16,875	20,625
6	6,188	13,690	-	26,060	12,570
7	8,250	26,250	-	22,875	10,500
Total	39,753	130,440	125,6250	147,000	129,383
Média	5,679	18,634	25,125	21,000	18,483

Análise de variância

Causas da variação	GL	SQ	QM	F
Temperaturas	4	1369,5284	342,3821	17,59**
Resíduos	28	545,0892	19,4675	
Total	32	1914,6176		

Comparações múltiplas (Teste de Tukey)

5% = 6,871

1% = 8,472

Análise de regressão

	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	78,2545		15,13
Regressão quadrática	1	123,3738		23,85*
Desvio de regressão	2	10,3468	5,1734	
Total	4	211,9751		

Equação: $\hat{Y} = -64,4371 + 6,4967x - 0,1187x^2$

9. Dados originais referentes à Tabela 10 e sua análise estatística

Tratamentos		Comprimento das lesões (mm)					Médias
		I	II	III	IV	V	
Isolado 22	C ₁	33	80	95	60	100	73,6
	M	59	7	14	47	90	43,4
	C ₂	43	27	55	75	95	59,0
Isolado H ₁	C ₁	78	42	46	90	74	66,0
	M	90	67	37	110	70	74,8
	C ₂	85	84	53	70	74	73,2
Isolado 82	C ₁	10	22	13	23	20	17,6
	M	9	4	4	7	11	7,0
	C ₂	17	13	16	18	21	17,0
Testemunha	C ₁	7	7	10	11	7	8,4
	M	1	2	2	2	1	1,6
	C ₂	9	8	12	9	8	9,2

- a) Considerando-se C₁, M e C₂, constatou-se diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 0,5%, sendo H₁ = 48, e $\chi^2 = 26,76$, pelo teste de Kruskal-Wallis. Pelo teste de comparações múltiplas de grandes amostras, o d.m.s.=41,3 ao nível de 1%.
- b) Considerando-se somente C₁, constatou-se diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 0,5%, sendo H₁ = 15,87 e $\chi^2 = 12,84$, pelo teste Kruskal-Wallis. Pelo teste de compa

rações múltiplas de grandes amostras, o d.m.s. = 11,6 ao nível de 1%.

- c) Considerando-se somente M, constatou-se diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 0,5%, sendo $H_1 = 14,63$ e $x^2 = 12,84$. Pelo teste de comparações múltiplas de grandes amostras, o d.m.s. = 11,6 and nível de 1%.
- d) Considerando-se somente C_2 , constatou-se diferenças significativas ao nível de 0,5%, sendo $H_1 = 16,24$ e $x^2 = 12,84$. Pelo teste de comparações múltiplas de grandes amostras, o d.m.s. = 11,6 ao nível de 1%.

10. Dados originais referentes à Tabela 11

Trata- mentos		Tamanho das lesões (mm)			Médias
		I	II	III	
Isolado 22	P ₁	9	9	20	12,7
	P ₂	28	9	18	18,3
	P ₃	6	9	21	12,0
Isolado H ₁	P ₁	156	100	90	115,3
	P ₂	56	80	117	84,3
	P ₃	100	45	44	63,0
Isolado 82	P ₁	143	42	182	122,3
	P ₂	42	16	90	49,3
	P ₃	12	25	25	20,7
Testemunha	P ₁	0	0	0	0
	P ₂	0	0	0	0
	P ₃	0	0	0	0

- a) Constatou-se diferenças significativas ao nível de 0,5%, sendo $H_1 = 31,6$ e $x^2 = 26,76$, quando foi considerado as posições independentemente dos isolados, pelo teste de Kruskal-Wallis. Pelo teste de comparações múltiplas de grandes amostras, o d.m.s. = 32,2 ao nível de 1%.
- b) Considerando-se somente P₁, constatou-se diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 2,3%, onde $H_1 = 9,63$ e $x^2 = 9,35$. Pelo teste de comparações múltiplas de grandes

amostras, o d.m.s. = 9,2 ao nível de 1%.

- c) Considerando-se somente P_2 , constatou-se diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 3,3%, onde $H_1 = 8,87$ e $x^2 = 7,81$. Pelo teste de comparações múltiplas de grandes amostras, o d.m.s. = 9,2 ao nível de 1%.
- d) Considerando-se somente P_3 constatou-se diferenças significativas ao nível de 1,9% onde $H_1 = 10,15$ e $x^2 = 9,35$. Pelo teste de comparações múltiplas de grandes amostras, o d.m.s. = 9,2 ao nível de 1%.