MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES AMBIENTES
FAVORÁVEIS AO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO IN VITRO
DE *Microcyclus ulei* (P. HENN.) v. ARX., AGENTE DO MAL
DAS FOLHAS DA SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*) (MUELL.) ARG.

JOSÉ ANTONIO MARTINELLI

Engenheiro Agrônomo

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

Maio - 1986

À memória de meu pai,
à minha mãe e familiares,

OFEREÇO.

À MARCIA e BRUNA

com amor.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Expresso minha sincera gratidão às Instituições ou pessoas que, direta ou indiretamente, permitiram a realização deste trabalho e, em especial:

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que possibilitaram minha participação no Curso de Pós-Graduação;
- Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pela orientação desta pesquisa, pelas sugestões e sobretudo, amizade;
- Ao Dr. Ricardo Bohrer Sgrillo, pela colaboração nas análises estatísticas dos experimentos;
- A colega Regina Eli, pelos isolados de *M. ulmi* que me colocou à disposição;
- Aos demais colegas e, em especial, a Wagner Bettiol, pela colaboração nos trabalhos e sugestões;
- Ao Convênio FINEP-FEALQ, pelo auxílio financeiro prestado na execução deste trabalho;
- A Jorge Luiz Diorio, pelo trabalho datilográfico.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
3. MATERIAL E MÉTODOS	08
3.1. Influência de fontes de carbono e de nitro- gênio na esporulação e no crescimento de <i>M.</i> <i>ulei</i>	08
3.1.1. Origem do isolado e obtenção de inó- culo de <i>M. ulei</i>	08
3.1.2. Meios para ensaios sobre fontes de carbono e de nitrogênio	09
3.1.3. Plaqueamento e incubação	10
3.1.4. Determinação da esporulação e do cres- cimento	11
3.2. Influência da relação C/N na esporulação de <i>M. ulei</i>	11
3.3. Influência de requisitos nutricionais míni- mos na esporulação e no crescimento de <i>M.</i> <i>ulei</i>	12
3.3.1. Influência do extrato de levedura na esporulação de <i>M. ulei</i>	12
3.3.2. Efeito de algumas vitaminas adiciona- das ao meio mínimo de PONTECORVO mo- dificado na esporulação e no cresci- mento de <i>M. ulei</i>	13

3.3.3. Influência da quantidade de batata, na composição do meio BSA, na esporu- lação de <i>M. ulei</i>	14
3.4. Influência do período de incubação e do cho- que de luz branca na esporulação de <i>M. ulei</i> .	14
3.5. Influência da temperatura na esporulação e no crescimento de <i>M. ulei</i>	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Influência de fontes de carbono e de nitro- gênio na esporulação e no crescimento de <i>M. ulei</i>	17
4.2. Influência da relação C/N na esporulação de <i>M. ulei</i>	19
4.3. Influência de requisitos nutricionais míni- mos na esporulação e no crescimento de <i>M.</i> <i>ulei</i>	
4.4. Influência do período de incubação e do <u>co</u> - que de luz branca na esporulação de <i>M. ulei</i>	24
4.5. Influência da temperatura na esporulação e no crescimento de <i>M. ulei</i>	25
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	31
7. LITERATURA CITADA	33

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
1	Efeito de diferentes fontes de carbono na esporulação e no crescimento de <i>Microcycclus ulei</i>	18
2	Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na esporulação e no crescimento de <i>Microcycclus ulei</i>	19
3	Influência da relação C/N (galactose /soitone) na esporulação de <i>Microcycclus ulei</i>	20
4	Efeito do extrato de levedura adicionado ao meio GS, na esporulação de <i>Microcycclus ulei</i>	21
5	Efeito de algumas vitaminas adicionadas ao meio químico de PONTECORVO modificado, na esporulação e no crescimento de <i>Microcycclus ulei</i>	22
6	Influência da quantidade de batata, na composição do meio BSA, na esporulação de <i>Microcycclus ulei</i>	23
7	Efeito do período de incubação e do choque de luz branca na esporulação de <i>Microcycclus ulei</i>	24

TABELA Nº

Página

8	Efeito da temperatura na esporulação e no crescimento de <i>Microcyclops</i> <i>ulei</i>
---	--

MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES AMBIENTES FAVORÁVEIS AO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO *in vitro* DE *Microcyclus ulei* (P.HENN.) v. ARX., AGENTE DO MAL DAS FOLHAS DA SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg..

Autor: JOSÉ ANTONIO MARTINELLI

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

RESUMO

O presente trabalho versa sobre a obtenção de um meio de cultura equilibrado para proporcionar abundante esporulação e crescimento da fase imperfeita de *Microcyclus ulei* (P.Henn.) v. Arx., *Fusicladium macrosporum* Kuyper. Após a elaboração de um meio sintético basal determinou-se a melhor fonte de carbono, a melhor fonte de nitrogênio e a melhor relação C/N para as fontes testadas e a influência de requisitos nutricionais mínimos tais como vitaminas e aminoácidos.

No estudo visando obter abundante esporulação de *M. ulei*, verificou-se que a utilização de galactose e soitone, sobre um meio basal sintético, como fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente, ambas a 10,52 g/litro, mantendo uma relação C/N de 1:1 e incubadas a 23°C sob períodos de luz alternados a cada 24 horas durante 90 minutos, no estágio final de desenvolvimento da cultura, foram as condições que apresentaram os melhores resultados.

CULTURE MEDIA AND FAVOURABLE ENVIRONMENTAL CONDITIONS TO GROWTH AND ESPORULATION in vitro OF *Microcyclus ulei* (P. HENN.) v. ARX., CAUSATIVE AGENT OF SOUTH AMERICAN LEAF BLIGHT OF HEVEA RUBBER TREES (*Hevea brasiliensis* (Muel.) Arg.

Author: JOSÉ ANTONIO MARTINELLI

Adviser: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

SUMMARY

This work treats to obtain an equilibrated culture medium to give high sporulation of the imperfect stage of *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. (*Fusicladium macrosporum* Kuyper). After the elaboration of a basal syntetic medium, it was determined the best source of carbon, the best source of nitrogen, the best C/N relationship and the influence of the minimum nutritional requirements as vitamins and aminoacids. Temperatures, brightness and incubation time was studied too.

With the studies in order to get high sporulation of *M. ulei*, have been seen the utilization of galactose and soytone, in a sintetic basal medium, as sources of carbon and nitrogen, respectively, both at 10,52 g/l, with a relationship C/N of 1:1 and incubated at 23°C under alternated periods of light each 24 hours during 90 minutes, at the final stage of development of the culture, were the conditions that showed the best results.

1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores limitantes nas pesquisas do mal-das-folhas da seringueira tem sido a dificuldade de obtenção de inóculo, em condições de laboratório, do seu agente etiológico (*Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx.). Também a manutenção do inóculo tem-se mostrado difícil pela rápida perda de viabilidade dos conídios e pelo aparecimento de microorganismos contaminantes (JUNQUEIRA et alii, 1984). O domínio do conhecimento e da técnica de cultivo e esporulação desse fungo é essencial, para desenvolver trabalhos científicos, baseados em dados quantitativos, estatisticamente analisáveis. Uma abundante produção de esporos viáveis permitirá que pesquisas de desenvolvimento de clones resistentes (resistência horizontal e vertical), de comparação de patogenicidade de diferentes isolados de *M. ulei*, de comparação de eficiência de fungicidas (in vitro e em casa de vegetação), de fisiologia da resistência, possam ser feitas com maior rigor científico em menor espaço de tempo.

Vários meios de cultura tem sido sugeridos para o crescimento desse fungo (BASQUEZ e OWEN, 1957; LANGDON, 1966; HOLLIDAY, 1970; CHEE, 1978; LIEBEREI et alii, 1983 e JUNQUEIRA et alii, 1984), sem que, no entanto, uma abundante esporulação tenha sido conseguida. Como a composição do meio não é ainda hoje consenso, o trabalho dá ênfase as condições nutricionais e suas equilíbrações.

O presente trabalho objetiva estudar o crescimento e a esporulação da forma imperfeita de *M. ulai* (*Fusicladium macrosporum*) em diferentes meios de cultura juntamente com o efeito da temperatura, da luminosidade e do período de incubação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A demanda de borracha "isopropeno" para 1990 tem sido projetada ao redor de 10 milhões de toneladas por ano, três vezes a oferta atual (CHEE e WASTIE, 1980). Tem-se aí uma perspectiva muito boa para a produção de borracha natural. Entretanto, essa produção é dificultada, principalmente, por problemas fitossanitários que atingem a cultura da seringueira.

A doença conhecida como mal das folhas, causada pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) c. Arx., é a mais séria de todas as que atacam *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (CHEE e WASTIE, 1980; CHEE, 1978; LIEBERI et alii, 1983; BERGAMIN FILHO e CARDOSO, 1980; HOLLIDAY, 1970; ROCHA e VASCONCELOS FILHO, 1978) e é considerada o principal fator limitante para a expansão da produção de borracha natural (ROCHA e VASCONCELOS FILHO, 1978).

O fungo, nativo da região amazônica, tem-se mostrado um perigo potencial para o crescimento destas plantas em outros países além da América (HOLLIDAY, 1970) principalmente os da Ásia, onde novos clones foram desenvolvidos sem a presença do fungo e são muito suscetíveis.

M. ulei ataca folhas em desenvolvimento e a

doença se manifesta sob forma de pequenas manchas necróticas, circulares com 5-8 mm de diâmetro, resultando na desfolha repentina da planta, morte dos ponteiros e da planta, posteriormente (CHEE e WASTIE, 1980; BERGAMIN Fº e CARDOSO, 1980; HOLLIDAY, 1970; MILLER, 1966). Chee, 1969, citado por ROCHA e VASCONCELLOS FILHO, 1978, observou uma perda de 75% da folhagem no qual resultou num decréscimo na produção de látex na ordem de 30-50%.

M. ulei foi considerado, por muitos pesquisadores, um parasita obrigatório, entretanto, a partir de 1945, foi conseguido cultivá-lo em meio de cultura (BLASQUEZ e OWEN, 1957). Esses autores conseguiram cultivar o fungo em meios contendo extratos foliares de *H. brasiliensis* ou extratos de outras plantas, sobre meios sintéticos enriquecidos com combinações de cinco vitaminas e cinco aminoácidos. Os dois melhores meios foram do extrato de folha de seringueira (extrato de 20 g de folhas jovens de seringueira; extrato de malte, 2,5 g; ágar, 15 g e água, q.s.p. 1000ml) e de feijão lima + quebrachitol (Difco lima bean ágar, 23 g; quebrachitol, 200mg e água, q.s.p. 1000 ml). Observaram ainda, que dentre os aminoácidos testados, glicina e ácido glutâmico proporcionaram maior esporulação e crescimento linear e que as vitaminas tiveram pouco efeito diferencial sobre a esporulação mas que o crescimento foi maior com ácido para-aminobenzóico.

LANGDON (1966) observou que o extrato de malte do meio de extrato de folha de seringueira usado por BLASQUEZ

e OWEN (1957), podia ser substituído por maltose, glucose ou sacarose e além disso, que a quantidade ótima de folhas de se ringueira era 4 e não 20 g. Utilizando, então, esse meio contendo 3 g de sacarose substituindo 2,5 g de extrato de malte, observou que a adição de vitaminas não aumentava o crescimento mas a suplementação com glutamina, glicina e leucina simultaneamente e com peptona e sacarose fazia-o de maneira significativa. Os melhores resultados de crescimento obtidos por LANGDON (1966) em meio de BDA (Batata, Dextrose, Agar) suplementado simultaneamente com peptona ou fitone, extrato de malte e extrato de levedura (todos a 5 g/litro), produziram estromas com 2,6 cm de diâmetro, pesando 83,8 mg (peso de matéria seca) no tempo de 90 dias.

A partir de 1966 o meio de cultura preferencial utilizado no isolamento e caracterização de culturas de *M. ulei* tem sido o BSA (100 g de batata, 5 g de sacarose / litro) (HOLLIDAY, 1970; CHEE, 1978). Esse meio não apresenta os inconvenientes de meios ricos em malte, extrato de levedura e peptona que tendem a suprimir a esporulação apesar de aumentar o crescimento (HOLLIDAY, 1970).

Estudos detalhados do efeito da natureza e concentrações dos compostos de carbono e de nitrogênio sobre a esporulação e crescimento de *M. ulei* são poucos. Lilly e Barnett (1951), citados por KIMATI (1970), já salientavam que um equilíbrio apropriado entre os constituintes do meio seria de grande importância no crescimento e esporulação dos fungos.

Segundo HAWKER (1967) carboidratos são usualmente as melhores fontes de carbono para o crescimento de fungos, porém, as respostas a essas fontes podem ser muito específicas e, semelhantemente às fontes de carbono, fungos diferem em seus aproveitamentos com relação às fontes de nitrogênio. LANGDON (1966) obteve diferentes respostas no crescimento de *M. ulei* quando fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio foram suplementadas ao meio de extrato de folhas de seringueira. Este autor observou que as taxas de crescimento do fungo aumentaram grandemente quando foi suplementado peptona (10 g/litro) ou NH_4NO_3 (1 g/litro).

Estudando a influência das condições ambientes sobre o desenvolvimento de *M. ulei*, HOLLIDAY (1970) verificou que a exposição de culturas de *M. ulei* a luz próxima da ultra-violeta (três horas sob luz negra ou doze horas sob luz fluorescente) inibe o crescimento quando a cultura é jovem pois a germinação e o crescimento inicial a partir dos conídios são sensíveis. Entretanto, verificou que pequenas doses de até 60 minutos diários estimulam a esporulação.

LIEBERE et alii (1983) utilizando o meio BSA 0,5% (sacarose 5 g, ágar 12 g; extrato de 250 g de batata e água de torneira q.s.p. 1000 ml, pH 5,0) observaram que quando culturas de 14 ou mais dias de idade, desenvolvidas no escuro, foram submetidas por um ou dois dias a 90 minutos de luz fluorescente/dia, a esporulação é incrementada 13 a 24 vezes em relação às condições convencionais (90 minutos de luz fluorescente/dia desde o início da incubação).

JUNQUEIRA et alii (1983) conseguiram conspícua esporulação "in vitro" em batata-sacarose (5-8 g/l)-ágar e KH_2PO_4 (3 g/l) acrescido de um complexo vitamínico (Panvit 2,0 ml/l). Esses autores consideram condições ótimas de incubação, 24°C e regime de luz alternada (ciclos de 1 hora de luz de 2000 lux) a intervalos de 3 horas nas primeiras 9 horas, seguidos de 15 horas de escuro. Em prosseguimento aos estudos efetuados nessa linha de pesquisa JUNQUEIRA et alii (1984) verificaram que a produção máxima de conídios foi obtida de culturas com 12 dias de idade, mantidas no meio de cultura continha 6 g de neopeptona, 10 g de sacarose, 2 g de KH_2PO_4 , 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g de ágar e 2 ml de Panvit.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo.

3.1. Influência de fontes de carbono e de nitrogênio na esporulação e no crescimento de *Microcyclus ulei*

3.1.1. Origem do isolado e obtenção de inóculo de *M. ulei*

O isolado utilizado nos experimentos deste trabalho tem a sua origem no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo.

O inóculo constou de uma suspensão de esporos mais micélio estromático finamente macerado em almofariz de porcelana, obtido a partir de cultura desenvolvida em meio BSA

(Batata, 250 g; Sacarose, 5g; Ágar, 12 g, e água q.s.p. 1.000 ml), sob condições de temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz nos primeiros quinze dias. Nos 16º, 17º e 18º dias foram dados choques de luz branca de 90 minutos/dia. Acrescentou-se à suspensão espalhante Tween-20 (0,2 ml/l) e os antibióticos Terramicina (250 µg/ml) e Penicilina (240 µg/ml).

3.1.2. Meios para ensaios sobre fontes de carbono e de nitrogênio

Na determinação de melhor fonte de carbono, os meios de cultura estudados, a exceção de BSA, utilizado como testemunha, utilizaram um meio basal (KH_2PO_4 , 0,3 g; MgSO_4 , 0,3 g; solução de micronutrientes (723,4 mg de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 439,8 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 203,0 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 1.000 mililitros de água destilada e clarificada com ácido sulfúrico), 1 ml; ágar, 12 g; água, q.s.p. 1.000 ml) no qual variou-se a suplementação de oito diferentes fontes de carbono: sacarose, 5 g; amido, 5,26 g; glicose, 5,79 g; lactose, 5,26 g; maltose, 5,26 g; galactose, 5,26g; frutose, 5,26 g; mel 5,59 g. As diferentes doses dessas fontes equiparam-se em 2,1 g de carbono. Utilizou-se soitone (5,26 g/l) como fonte de nitrogênio. O pH dos meios, girou em torno de 6,6 após a autoclavagem.

Nos experimentos visando o estudo da melhor fonte de nitrogênio sete meios de cultura foram formulados. Uti-

lizou-se BSA como testemunha e ao meio basal foram adicionadas as seguintes fontes de nitrogênio: Soitone, 5,26 g; Bacto peptona, 2,1 g; neopeptona, 2,4 g; Caseína hidrolizada, 2,5 g; Bacto triptone, 2,5 g e NH_4NO_3 , 1 g. Essas fontes, nas doses mencionadas, equiparam-se em 0,35 g de nitrogênio. Utilizou-se sacarose (5,0 g/l) como fonte de carbono. O pH dos meios girou em torno de 6,6 após a autoclavagem.

Após autoclavados (20 minutos a 1 atmosfera), os meios foram resfriados até $\pm 48^\circ\text{C}$, acrescidos dos antibióticos Terramicina e Penicilina, para dar uma concentração final de 250 e 240 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, e vertidos em placas de Petri de plástico descartáveis.

Os tratamentos constaram de 5 repetições constituindo cada placa de Petri em uma repetição num delineamento estatístico inteiramente casualizado.

3.1.3. Plaqueamento e incubação

No estudo da esporulação, a suspensão de inóculo obtida pela mistura de esporos mais micélio estromático finamente macerado, conforme 3.1.1, foi plaqueada sobre os diferentes meios de cultura, na quantidade de 1 ml por placa, procurando-se distribuir uniformemente a suspensão através de movimento manual de rotação horizontal da placa de Petri. Esse processo desenvolveu-se sob condições de assepsia em câmara de fluxo laminar contínuo. As placas contendo os meios de

cultura inóculados foram mantidas em incubadoras, sob as mesmas condições descritas no item 3.1.1.

Nos experimentos em que foi avaliado o crescimento, a metodologia de inoculação consistiu em se depositar uniformemente o inóculo na superfície de ágar-ágar (ágar Difco, 12g; água, q.s.p. 1000 ml), contido em placa de Petri, e, através de um furador de rolha (0,5 cm de diâmetro), perfurou-se discos uniformes de ágar-ágar contendo quantidades equivalentes de inóculo. Tais discos foram transferidos aos diferentes meios de cultura em posição invertida, de modo que o inóculo ficasse em contato com os meios em estudo.

3.1.4. Determinação da esporulação e do crescimento

A avaliação da esporulação foi feita através da remoção dos esporos contidos em cada placa com o auxílio de um pincel mais 5 ml de água contendo espalhante Tween-20 (0,2 ml/l) e contagem em hemacitômetro.

O crescimento foi avaliado medindo-se o raio das colônias (em mm) da borda do disco original até a borda da colônia, depois de transcorridos 55 dias de incubação.

3.2. Influência da relação C/N na esporulação de *M. ulei*

Neste experimento utilizou-se um meio basal

(KH_2PO_4 , MgSO_4 , 0,3 g; solução de micronutrientes, 1 ml; ágar (Difco), 12 g; água q.s.p. 1000 ml) no qual foi combinado três diferentes doses de galactose (2,63 - 5,26 - 10,52 g/l), como sendo a melhor fonte de carbono, com três doses de Soitone (2,63 - 5,26 - 10,52 g/l) por ser a melhor fonte de nitrogênio. O pH dos meios girou em torno de 6,5 após a autoclavagem. O tratamento testemunha constou do meio BSA 0,5%.

O preparo do inóculo, plaqueamento e incubação, determinação da esporulação e o delineamento estatístico foram idênticos aos usados em 3.1.

3.3. Influência de requisitos nutricionais mínimos na esporulação e no crescimento de *M. ulei*

3.3.1. Influência do extrato de levedura na esporulação de *M. ulei*

Neste ensaio diferentes doses de extrato de levedura (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 g/l) foram adicionadas ao meio basal (descrito em 3.2) que utilizou 5,26 g/l de galactose e 5,26 g/l de Soitone, como fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente. O pH dos meios girou em torno de 6,7 após a autoclavagem.

O preparo do inóculo, plaqueamento e incubação, determinação da esporulação e o delineamento estatístico foram idênticos aos usados em 3.1.

3.3.2. Efeito de algumas vitaminas, adicionadas ao meio mínimo de PONTECORVO modificado na esporulação e no crescimento de *M. ulei*

Neste ensaio utilizou-se o meio mínimo (MM) de PONTECORVO et alii (1953) modificado por KIMATI (1975) através da substituição de traços de FeSO_4 e de ZnSO_4 por uma solução de micronutrientes de acordo com LILLY e BARNETT (1951), com o emprego de 723,4 mg de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 439,8 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 203,0 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 1000 mililitros de água destilada e clarificada com ácido sulfúrico (LOCH, 1978). Os demais constituintes do meio mínimo foram: glicose 10 g; NaNO_3 6 g; KH_2PO_4 1,5 g; KCl 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; solução de micronutrientes 1,0 ml; ágar 15 g e água q.s.p. 1000 ml. O pH dos meios girou em torno de 5,6 após a autoclavagem.

As vitaminas foram adicionadas ao meio mínimo a partir de soluções estoque contendo 20% de álcool, de forma que as concentrações finais, nos meios em estudo, ficaram: tiamina 100 $\mu\text{g/l}$; riboflavina 100 $\mu\text{g/l}$; piridoxina 100 $\mu\text{g/l}$; biotina 5 $\mu\text{g/l}$ e inositol 5 $\mu\text{g/l}$.

O inóculo para este experimento constou de uma suspensão de esporos, obtida pela remoção superficial das colônias, crescidas em meio BSA, com o auxílio de um pincel mais 5 ml de água destilada esterilizada. A concentração da suspensão foi ajustada para 1×10^5 esporos/ml. Desta suspensão transferiu-se 1 ml por placa de Petri.

Utilizou-se como testemunha os meios BSA e o meio galactose-soitone (GS), na sua melhor combinação, determinada em 3.2 (ambos 10,52 g/l).

Os métodos de avaliação da esporulação e do crescimento bem como o delineamento experimental foram idênticos aos utilizados em 3.1.4. O período de incubação para o ensaio de crescimento foi de 35 dias e para o ensaio de esporulação de 18 dias.

3.3.3. Influência da quantidade de batata, na composição do meio BSA, na esporulação de *M. ulei*

Neste ensaio utilizou-se como meio basal sacarose, 5 g/l; Ágar (Difco), 12 g/l e água q.s.p. 1000 ml, no qual variou-se cinco quantidades de batata (50, 100, 150, 200 e 250 g/l), da qual extraiu-se seus extratos através de fervura em água por um período de 10 minutos. O pH dos meios foi de 6,8, 6,9, 7,0, 7,0 e 7,0, respectivamente, após a autoclavagem.

O preparo do inóculo, plaqueamento e incubação, determinação da esporulação e o delineamento estatístico foram idênticos aos usados em 3.1.

3.4. Influência do período de incubação e do choque de luz branca na esporulação de *M. ulei*

Este experimento utilizou o meio basal descri-

to em 3.2, adicionado de galactose e soitone (ambos 10,52 g/l) e antibióticos conforme 3.1.1. O inóculo constou de 1 ml/placa de uma suspensão de esporos mais micélio finamente macerado. As placas inoculadas foram então submetidas aos seguintes regimes de luminosidade: 1) cinco dias no escuro seguido de três dias com choques diários de luz branca durante 90 min; 2) oito dias no escuro; 3) 7 dias no escuro seguido de três dias com choques de luz; 4) 10 dias no escuro; 5) 12 dias de escuro seguido de três dias de choques de luz; 6) 15 dias de escuro; 7) 15 dias de escuro seguido de três dias com choques de luz; 18 dias de escuro. O tratamento testemunha constou de meio BSA e utilizou também dois regimes de luminosidade: 15 dias de escuro seguido de choques de luz por três dias e 18 dias de escuro.

Para o período de escuro as placas foram colocadas em estufa comum e aquelas que sofreram choques de luz foram transferidas para câmaras BIOTRONETES, ambas com temperaturas controladas entre 23-24°C. As placas permaneceram a uma distância de 38 cm das lâmpadas fluorescentes (40 W GE). O pH dos meios BSA e GS (Galactose-Soitone) girou em torno de 7,0 e 6,5, respectivamente, após a autoclavagem.

A determinação da esporulação foi realizada segundo o método descrito em 3.1.4. O delineamento estatístico constou da análise fatorial entre luminosidade x períodos de incubação.

3.5. Influência da temperatura na esporulação e no crescimento de *M. ulei*

Neste ensaio estudou-se o efeito de diferentes regimes de temperatura (23, 25, 28 e 31°C com variações de 1°C) sobre a esporulação e o crescimento de *M. ulei*.

Os meios utilizados para os diferentes regimes de temperatura foram BSA e GS conforme 3.1.1 e 3.3.2, respectivamente.

O inóculo utilizado neste experimento consistiu de uma concentração de esporos numa densidade de 1×10^5 esporos/mililitro.

Os métodos para a avaliação da esporulação e do crescimento são idênticos aos descritos em 3.1.4 realizando a avaliação no 19º e 52 º dias, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1. Influência de fontes de carbono e de nitrogênio na esporulação e no crescimento de *M. ulei*

Os resultados mostraram que, com relação a esporulação de *M. ulei*, a melhor fonte de carbono é galactose, diferindo estatisticamente de todos os demais tratamentos (Tabela 1). Meios contendo substâncias de composição complexa como o mel e extrato de batata (meio BSA) apresentaram a segunda e a terceira melhores esporulações, respectivamente. Maltose, amido, frutose, sacarose, glicose e lactose proporcionaram pequena esporulação e em ordem decrescente (Tabela 1).

Para o crescimento do fungo em estudo, observa-se que, das fontes de carbono estudadas, nenhuma foi superior à testemunha. Os maiores crescimentos são conferidos por substâncias de composição complexa (mel e batata). As demais fontes pouco ou nada contribuíram para o crescimento (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de diferentes fontes de carbono na esporulação e no crescimento de *Microcycclus ulei*. Piracicaba, SP, 1986.

Tratamento	Esporulação (18 dias)	Crescimento (55 dias)
	Nº de esporos/ placa (10^4)	Raio das colônias (mm)
01. Meio BSA	121,37*bc **	1,0*
02. Meio Basal+Soitone+Sacarose	41,50 de	0,2
03. Meio Basal+Soitone+Amido	80,25 d	0,0
04. Meio Basal+Soitone+Glicose	36,62 e	0,0
05. Meio Basal+Soitone+Lactose	22,00 e	0,0
06. Meio Basal+Soitone+Maltose	81,37 cd	0,0
07. Meio Basal+Soitone+Galactose	229,62 a	0,0
08. Meio Basal+Soitone+Frutose	41,62 de	0,0
09. Meio Basal+Soitone+Mel	128,75 b	0,7

* Média de cinco repetições

** Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

Os resultados da Tabela 2 mostraram que bacto peptona, soitone, bacto triptone, caseína hidrolizada e neopectona não diferem estatisticamente entre si como fontes de nitrogênio para a esporulação, embora seus valores sejam inferiores à testemunha. A menor esporulação foi obtida por uma fonte inorgânica de nitrogênio (Tabela 2).

Com relação ao crescimento fato semelhante às

fontes de carbono (Tabela 1) ocorre com as fontes de nitrogênio em que somente soitone propiciou um certo crescimento e mesmo assim, inferior à testemunha. As demais fontes nitrogenadas não proporcionaram nenhum crescimento (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na esporulação e no crescimento de *Microcycclus ulei*. Piracicaba, SP, 1986.

Tratamentos	Esporulação (18 dias)	Crescimento (55 dias)
	Nº de esporos/ placa (10^4)	raio das colônias (mm)
01. Meio BSA	119,00*a**	1,0*
02. Meio Basal+Sacarose+Soitone	65,87 b	0,7
03. Meio Basal+Sacarose+Bactopeptona	66,00 b	0,0
04. Meio Basal+Sacarose+Neopeptona	45,62 bc	0,0
05. Meio Basal+Sacarose+Caseína Hidr.	48,25 bc	0,0
06. Meio Basal+Sacarose+Bacto triptone	64,12 b	0,0
07. Meio Basal+Sacarose+ NH_4NO_3	14,25 c	0,0

* Média de cinco repetições

** Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

4.2. Influência da relação C/N na esporulação de *M. ulei*

Os resultados mostram que a melhor esporulação de *M. ulei* foi obtida com 10,52 g/l para as fontes de carbono e nitrogênio (Tabela 3).

Tabela 3. Influência da relação C/N (galactose/soitone) na esporulação de *Microcycclus ulei*. Piracicaba, SP, 1986.

Galactose g/l)	Soitone (g/l)		
	2,63	5,26	10,52
2,63	100,78*ef**	22,18 f	564,84 c
5,26	161,87 ef	182,03 def	993,59 b
10,52	260,46 de	363,28 d	1.194,68 a
Testemunha BSA	27,96 f		

* Média do nº de esporos por placa de Petri ($\times 10^4$) de 5 repetições.

** Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%)

4.3. Influência de requisitos nutricionais mínimos na esporulação e no crescimento de *M. ulei*

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que as doses de 0,25 e 0,5 g/l de extrato de levedura (fonte complexa de vitaminas), desestimularam a esporulação enquanto que a dose de 1 g/l apresentou uma pequena tendência a aumentar a esporulação, não diferindo, porém, estatisticamente do tratamento sem fonte vitamínica.

Tabela 4. Efeito do extrato de levedura adicionado ao meio GS, na esporulação de *M. ulei*. Piracicaba, SP., 1986.

Tratamentos	esporulação
	Nº de esporos/placa (x10 ⁴)
01. Meio GS + Extr.Lev. 0,00g	848,00*a**
02. Meio GS + Extr.Lev. 0,25g	470,15 b
03. Meio GS + Extr.Lev. 0,50g	530,50 b
04. Meio GS + Extr.Lev. 1,00g	961,75 a
05. Meio BSA	171,50 c

* média de cinco repetições

** médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

Para a esporulação, em nada contribuíram as vitaminas tiamina, biotina, inositol, riboflavina e piridoxina quando adicionadas ao meio mínimo de Pontecorvo modificado (Tabela 5). Fonte complexa de vitaminas como extrato de levedura, propiciou certa esporulação não diferente estatisticamente da testemunha (BSA). A melhor esporulação foi obtida com o tratamento 10 (meio GS), significativamente diferente dos demais (Tabela 5).

Para o crescimento, semelhantemente à esporulação, tiamina, biotina, inositol, riboflavina e piridoxina

não proporcionaram nenhum crescimento. O uso de fonte complexa de vitaminas, no entanto, proporcionou crescimento significativamente superior ao tratamento testemunha sendo inferior porém ao meio GS que apresentou o melhor crescimento (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito de algumas vitaminas adicionadas ao meio mínimo de Pontecorvo modificado, na esporulação e no crescimento de *M. ulei*. Piracicaba, SP, 1986.

Tratamentos	Esporulação	Crescimento
	Nº esporos/placa (10 ⁴)	raio colônias (mm)
01. MM + T,R,I,R,P****	0,00*	0,00**
02. MM + ,B,I,R,P	0,00	0,00
03. MM + T, ,I,R,P	0,00	0,00
04. MM + T,B, ,R,P	0,00	0,00
05. MM + T,B,I, ,P	0,00	0,00
06. MM + T,B,I,R,	0,00	0,00
07. MM	0,00	0,00
08. MM + Ext.Lev. 0,5 g/l	72,20 b***	10,75 b***
09. Meio BSA	124,30 b	8,50 c
10. Meio GS	2404,40 a	17,12 a

* média de cinco repetições

** média de oito repetições

*** médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Os demais tratamentos não participaram da análise estatística.

**** MM = meio mínimo. T,B,R,I e P são as vitaminas Tiamina, Biotina, Inositol, Riboflavina e Piridoxina, respectivamente.

Sob determinadas concentrações de batata na composição do meio de cultura, o fungo pode responder positivamente ou não quanto a produção de esporos. Concentrações de 50 a 150 g de extrato de batata por litro proporcionaram baixas esporulações não diferindo estatisticamente entre si. Concentrações de 200 e 250 g de extrato de batata proporcionaram maiores esporulações, em ordem crescente, e estatisticamente diferentes entre si (Tabela 6).

Tabela 6. Influência da quantidade de batata, na composição do meio BSA, na esporulação de *M. ulmi*. Piracicaba, SP, 1986.

Tratamentos	Nº de esporos/placa (10 ⁴)
01. Extr. Bat. 50g	112,10*d**
02. Extr. Bat. 100g	669,10 c
03. Extr. Bat. 150g	233,30 d
04. Extr. Bat. 200g	1096,95 b
05. Extr. Bat. 250g	1335,70 a

* média de cinco repetições

** médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%)

4.4. Influência do período de incubação e do choque de luz branca na esporulação de *M. ulei*

Os resultados entre regimes de incubação e luminosidade são mostrados na Tabela 7. Sob regime de choques de luz, a medida que se aumenta o período de incubação até 18 dias, há um aumento na esporulação do fungo. As maiores esporulações, portanto, ocorreram com choque de luz e nos maiores períodos de incubação, não diferentes estatisticamente entre si (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito do período de incubação e do choque de luz branca na esporulação de *M. ulei*. Piracicaba, SP, 1986.

Meio/ incubação	Luminosidade		Média
	com luz	sem luz	
GS/8 dias	84,37*c**	58,79 b	71,58 c
GS/10 dias	123,37 c	105,37 b	114,37 c
GS/15 dias	1671,30 ab	1370,50 a	1520,90 a
GS/18 dias	1978,52 a	1372,60 a	1675,56 a
BSA/18 dias	1347,90 b	1057,40 a	1202,65 b
Média	1041,09 a	792,93 a	

*média de cinco repetições

**médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

4.5. Influência da temperatura na esporulação e no crescimento de *M. ulei*

Com relação a produção de esporos a temperatura exerce uma influência negativa a medida que aumenta a partir dos 23°C, para os meios GS e BSA. Sob condições de 25°C a produção de esporos diminui consideravelmente e acima desta não ocorre esporulação (Tabela 8).

Para crescimento, somente a temperatura de 23°C foi favorável sendo nulo nas demais temperaturas (Tabela 8).

Tanto no estudo da esporulação como no estudo do crescimento o meio GS foi significativamente superior ao meio BSA (Tabela 8).

Tabela 8. Efeito da temperatura na esporulação e no crescimento do *M. ulei*. Piracicaba, SP, 1986.

Tratamentos	Esporulação	Crescimento
	Nº de esporos/placa ($\times 10^4$)	Diâmetro das co- lônias (mm)
1. BSA - 23°C	386,00*b***	6,75**b
2. GS - 23°C	2243,25 a	24,37 a
3. BSA - 25°C	34,75 c	0,00
4. GS - 25°C	301,60 b	0,00
5. BSA - 28°C	0,00	0,00
6. GS - 28°C	0,00	0,00
7. BSA - 31°C	0,00	0,00
8. GS - 31°C	0,00	0,00

* média de cinco repetições

** média de oito repetições

*** médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). Os demais tratamentos não participaram da análise estatística.

5. DISCUSSÃO

Quando em meio de cultura, galactose foi utilizada como única fonte de carbono, observou-se que *Microcyclops ulei* apresenta uma boa esporulação (Tabela 1), sendo esta a primeira observação do efeito de galactose sobre a esporulação deste fungo. As esporulações obtidas com meio BSA e meio basal mais mel (Tabela 1), mesmo inferior a galactose, podem ser explicadas pela complexidade dos meios onde foram utilizadas várias fontes de carbono, que segundo HAWKER (1967) proporcionaram melhor crescimento, provavelmente devido ao complexo enzimático do fungo ser hábil em degradar pequenas quantidades de vários açúcares.

Discordando de LANGDON (1966), o qual verificou o efeito benéfico de NH_4NO_3 no crescimento de *M. ulei*, os resultados obtidos evidenciaram que nitrato de amônia não estimula o crescimento e nem a esporulação, provavelmente devido ao uso de um meio basal sintético (Tabela 2). Esse experi-

mento parece indicar, ainda, que fontes orgânicas de nitrogênio são bastante apropriadas para *M. ulei* (Tabela 2).

O estudo das melhores fontes de carbono e de nitrogênio (Tabela 2), vem confirmar as observações de Lilly e Barnett (1951), citados por KIMATI (1970), e as de HAWKER (1967) sobre o efeito positivo que o equilíbrio nutricional acarreta. Destaca-se o aumento da esporulação em relação ao aumento das fontes de carbono e de nitrogênio e a interação altamente significativa entre essas fontes (Tabela 3). Os dados sugerem ainda que a fonte nitrogenada é de grande importância no estímulo à esporulação.

A adição de extrato de levedura ao meio basal equilibrado com as melhores fontes de carbono e de nitrogênio evidencia que pequenas doses de vitaminas desestimulam a esporulação de *M. ulei* (Tabela 4) provavelmente porque fornecem melhores condições para o estabelecimento da forma vegetativa do fungo. Esses resultados confirmam as observações de HOLLIDAY (1970). Sugere-se, no entanto, que mais estudos sejam desenvolvidos principalmente com doses mais elevadas de extrato de levedura, uma vez que a 1 g/litro um pequeno estímulo na esporulação foi observado (Tabela 4).

As vitaminas Tiamina, Biotina, Inositol, Riboflavina e Piridoxina, no conjunto ou isoladamente, não são essenciais a *M. ulei*, quando adicionadas ao meio mínimo de Pontecorvo modificado. No entanto, quando substâncias complexas, ricas em vitaminas, são adicionadas ao meio, observa-se

pequeno estímulo na esporulação e no crescimento. Esse pequeno efeito estimulante de vitaminas quando adicionadas a meios de composição complexa também foi observado nos trabalhos de BLASQUEZ e OWEN (1957), JUNQUEIRA et alii (1983) e JUNQUEIRA et alii (1984). Tal fato deve-se à habilidade enzimática do fungo em degradar, ao mesmo tempo, pequenas quantidades do complexo de substâncias essenciais ao seu crescimento. Tendo em vista as observações anteriores e considerando os resultados das Tabelas 4 e 5 não há vantagem em adicionar vitaminas e/ou fatores de crescimento ao meio de cultura em estudo, possivelmente porque o uso de soítone como fonte de nitrogênio supre estas necessidades visto que é uma substância complexa e que naturalmente contém fatores de crescimento.

Estudos sobre o efeito nutricional de diferentes doses de extrato de batata no meio BSA 0,5% (Tabela 6), utilizado atualmente como meio padrão (LIEBERE et alii, 1983), teve origem quando observou-se um repentino aumento na esporulação de *M. ulei* no experimento apresentado na Tabela 7 em relação aos demais. A explicação provável apoia-se na técnica de inoculação de múltiplos pontos que utilizou, neste experimento, alta densidade de inóculo, não quantificado, porém visualmente diferente dos demais experimentos.

A determinação do período de incubação das colônias (Tabela 7) está de acordo com as observações feitas por JUNQUEIRA et alii (1984) e o efeito benéfico do choque de luz branca concorda com as observações de LIEBERE et alii

(1983). A análise dos dados mostra resultados positivos e altamente significativos para incubação e luminosidade (Tabela 7). A possibilidade da redução do período de 15 dias, antes de ser dado choques de luz, para 12 dias, sem perdas significativas do número de esporos produzidos, traz a vantagem de ainda possuírem esses esporos um alto percentual de viabilidade, segundo observações realizadas por CHEE (1978) e JUNQUEIRA et alii (1984).

Como ocorre para outros fungos, a esporulação e o crescimento de *M. ulei*, são muito influenciados pela temperatura, observando-se claramente a sensibilidade do fungo a temperaturas acima de 23°C (Tabela 8). Os melhores resultados, para ambos os meios BSA e GS, foram obtidos nas temperaturas de 23°C $\pm$ 1°C. Esses dados estão de acordo com as observações de JUNQUEIRA et alii (1984).

Analisando-se o trabalho de uma forma global, tem-se que sobre um meio relativamente simples e de fácil preparo, porém rico em fontes de carbono e de nitrogênio, sob determinadas condições ambientes, consegue-se obter grande produção de conídios de *M. ulei*. Sugere-se, no entanto, que trabalhos nessa linha tenham continuidade observando-se, principalmente, o comportamento de isolados de outras regiões para uma melhor compreensão e domínio da técnica.

6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

. Foi obtido um meio de cultura equilibrado, a base de galactose e soítone sobre um meio basal, que propicia abundante esporulação de *Microcycclus ulei* (P.Henn.) v. Arx., agente do mal das folhas da seringueira;

. A adição de vitaminas exerce pouco efeito na esporulação, sendo um pouco mais pronunciado no crescimento, não havendo, no entanto, necessidade de utilizá-las quando em meios de composição complexa.

. A luz em períodos alternados a cada 24 horas, durante 90 minutos, no estágio final da cultura, promove aumentos significativos na produção de confídios;

. A temperatura que promove a maior esporulação e crescimento é de 23°C.

7. LITERATURA CITADA

- BERGAMIN FILHO, A. e C.O.N. CARDOSO, 1980. Doenças da seringueira - *Hevea brasiliensis* L. In: GALLI, F., Coord. Manual de Fitopatologia. Vol. 2, São Paulo, Ceres, p.459-474.
- BLASQUEZ, C.H. e J.H. OWEN, 1957. Physiological studies of *Dothidella ulei*. Phytopathology, 47: 727-732.
- CHEE, K.H., 1978. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis* culture of *Microcyclus ulei*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 70: 341-344.
- CHEE, K.H. e R.L. WASTIE, 1980. The status and future prospects of rubber diseases in Tropical American. Review of Plant Pathology, 59(12): 541-548.
- HAWKER, L.E., 1967. Physiology of Fungi. London, University of London Press. 360p.
- HOLLIDAY, P., 1970. South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. Phytopathological Papers, 12: 1-31.

- JUNQUEIRA, N.T.V.; R.S. ROMEIRO; G.M. CHAVES e L. ZAMBOLIM, 1983. Esporulação "in vitro" do agente etiológico do mal das folhas da seringueira (*Microcyclus ulei*). XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA - 04 a 08 de julho de 1983. Belém, PA.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; G.M. CHAVES; L. ZAMBOLIM; A.C. ALFENAS e L. GASPAROTTO, 1984. Efeito do número de repicagens, idade da cultura armazenada e luminosidade sobre a esporulação e patogenicidade de *Microcyclus ulei*, agente do mal das folhas da seringueira. Fitopatologia Brasileira, 9: 328.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; G.M. CHAVES; L. ZAMBOLIM; R.S. ROMEIRO e L. GASPAROTTO, 1984. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. Revista Ceres, 31(177): 322-331.
- KIMATI, H., 1970. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld., et V.Schrenk. f. sp. *phaseoli* N.F., fase ascôgena do agente causal da antracnose do feijoeiro. Piracicaba, ESALQ/USP, 35p. (Tese de Doutorado).
- LANGDON, K.R., 1966. Development of a new medium for culturing *Dothidella ulei* in quantity. Phytopathology, 56: 564-565.
- LIEBEREII, R.; A. SCHRADER; B. BIEHL e R.H. CHEE, 1983. Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* cultures. J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 31(3): 227-235.
- LILLY, V.G. e H.L. BARNETT, 1951. Physiology of the Fungi. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc. 464p.

- LOCH, L.C., 1978. Exigências nutricionais e ambientes do fungo entomógeno *Nomureae nilegi* (Farlow) Samson e seu comportamento na presença de defensivos agrícolas. Piracicaba, ESALQ/USP, 65p. (Tese de Doutorado).
- MILLER, J.W., 1966. "In vitro" production of toxin by *Dothí della oleí*. Phytopathology, 56: 718-719.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMONS; K.D. McDONALD e A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 3: 142-238..
- ROCHA, H.M. e A.P. VASCONCELOS FILHO, 1978. Epidemiology of the South America Leaf Blight of rubber in the region of Ituberã, Bahia, Brazil. Turrialba, 28(4): 325-329.