

REGINA MELO SARTORI CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DE *Phomopsis* E *Phoma* OBTIDOS DE  
SEMENTES DE ESPÉCIES FLORESTAIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Hilário Antonio de Castro

Cast

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1995

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Corrêa, Regina Melo Sartori

Caracterização de *Phomopsis* e *Phoma* obtidos de sementes de espécies florestais / Regina Melo Sartori Corrêa.--Lavras : UFLA, 1995.

72 p. : il.

Orientador: Hilário Antônio de Castro

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Sementes florestais - Fungos fitopatógenos. 2. *Phomopsis* - Reprodução. 3. *Phoma* - Reprodução. 4. *Phomopsis* - Meios de cultura. 5. *Phoma* - Meios de cultura. 6. *Phomopsis* - Patogenicidade. 7. *Phoma* - Patogenicidade. 8. Fungos fitopatógenos - Sementes florestais - Elasmobrânquios. 9. Fungos fitopatógenos - Sementes florestais - Esterase. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título

CDD-632.44


634.9562

REGINA MELO SARTORI CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DE *Phomopsis* E *Phoma* OBTIDOS DE  
SEMENTES DE ESPÉCIES FLORESTAIS

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Lavras como parte das exigências  
do Curso de Mestrado em Agronomia, área  
de concentração em Fitossanidade, para  
obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 13 de janeiro de 1995

  
Prof. Antonio Claudio Davide

  
Prof. José da Cruz Machado

  
Prof. Hilário Antonio de Castro  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em todos os momentos;

Aos meus pais, Rildo Sartori Barbosa Coelho e Josete de Albuquerque Melo Coelho, pela minha formação e incentivo concedidos ao longo da minha vida, pelo afeto e amizade;

Ao meu esposo, Marcus Metri Corrêa, pelo apoio, amizade, paciência, solidariedade e críticas positivas feitas durante o curso e pelo auxílio nas análises estatísticas;

Aos professores pelo conhecimento e amizade, em especial ao Prof. Hilário Antonio de Castro e Prof. Maria Menezes pela orientação segura e constante em todas as fases da realização deste trabalho e pela assistência e apoio concedidos no decorrer do curso;

Aos funcionários pela amizade e desprendimento nos auxílios prestados, em especial a Cleber Maximiliano, Engenheiro Agrônomo responsável pelo laboratório de Nematologia, onde foi executado grande parte deste trabalho;

A Regina Coeli, pelo auxílio na análise eletroforética dos isolados fúngicos.

Aos meus irmãos, Ricardo, Rilda e Luciana, à minha sobrinha Ana Caroline, cunhados e sogros, Ivonilzo e Conceição pelo afeto e amizade;

A todos os amigos que fiz durante o curso e aos amigos de sempre pelo apoio e amizade

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

### AGRADECIMENTOS

INTRODUÇÃO GERAL.....01

### REFERENCIAL TEÓRICO

Taxonomia do Gênero *Phoma*.....03

Taxonomia do Gênero *Phomopsis*.....05

Ocorrência de *Phoma* e *Phomopsis* em Sementes de Espécies Florestais.....06

Patogenicidade de *Phoma* e *Phomopsis* à Sementes de Espécies Florestais.....09

Caracterização Isoenzimática de Fungos Fitopatogênicos.....10

INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA, LUMINOSIDADE E TEMPERATURA NA REPRODUÇÃO DE ISOLADOS DE *Phomopsis* E *Phoma* OBTIDOS DE SEMENTES DE ESPÉCIES FLORESTAIS.....15

VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS DE *Phomopsis* E *Phoma* EM CINCO MEIOS DE CULTURA E SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E LUMINOSIDADE.....29

CARACTERIZAÇÃO DE <i>Phomopsis</i> E <i>Phoma</i> OBTIDOS DE SEMENTES DE ESPÉCIES FLORESTAIS POR ESTERASE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	46
PATOGENICIDADE DE <i>Phomopsis</i> E <i>Phoma</i> OCORRENDO EM SEMENTES DE IPÊ AMARELO ( <i>Tabebuia serratifolia</i> ) E ANGICO VERMELHO ( <i>Anadenanthera perigrina</i> ).....	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69

## INTRODUÇÃO GERAL

Os fitopatógenos podem estar associados às sementes na sua superfície, no seu interior ou em mistura. Eles se apresentam nas mais variadas formas de propagação, desde o simples esporo até órgãos de resistência (os escleródios), micélios, e outras estruturas específicas dos diversos grupos de fungos, bactérias, nematóides e vírus (Baker e Smith, 1966; Campacci e Pessanha, 1970; Neergaard, 1977).

Como referido por Menten (1991), a interferência dos patógenos associados às sementes, pode promover redução da população de plantas, debilitação das plantas e desenvolvimento de epidemias.

Na área florestal pouco têm-se estudado sobre a disseminação de patógenos via semente. No entanto, alguns trabalhos têm evidenciado a frequente contaminação fúngica das sementes, especialmente em espécies nativas (Ferreira, 1989). Em termos gerais, a maioria dos trabalhos sobre a disseminação de patógenos de espécies florestais foram realizados na Índia, Canadá, Estados Unidos e África, sendo as coníferas as espécies mais estudadas. Estes trabalhos referem-se a população fúngica associada às sementes e ao efeito desta população na germinação e desenvolvimento das plantas (Sales, 1992).

Dentre os fungos isolados de sementes de espécies florestais se encontram os gêneros *Phoma* e *Phomopsis* (Carneiro, 1986, 1990;

Fosco Mucci e Lasca, 1986; Homechin, Pizziano e Menten, 1986; Martins, 1991; Urban, Metzger e Cícero, 1982). No entanto, poucos pesquisadores estudaram a patogenicidade destes fungos (Carneiro, 1986; Maschio, Maceda e Ramos, 1990; Sales, 1992), não tendo, nenhum deles, determinado a espécie dos isolados. Esta situação ocorre não só devido a problemas na germinação de sementes de espécies selvagens com grande desuniformidade e alta variabilidade na qualidade de sementes que muda de ano para ano, mas também pela dificuldade de se identificar correctamente os fungos destes gêneros, trazendo problemas na determinação da patogenicidade dos isolados que são tratados ora como saprófita, ora como patógenos.

De modo geral, a associação de fungos às sementes pode gerar vários tipos de doenças e desordens tais como aborto, enrugamento e redução do tamanho das sementes, perdas do poder germinativo, podridões, morte em pré-emergência, manchas necróticas, tombamento, deformações e descolorações (Neergaard, 1977). Entretanto, os danos causados por fungos presentes nas sementes de espécies florestais ainda não são bem conhecidos.

Diante disso, este trabalho visou a caracterização e identificação de isolados fúngicos do gênero *Phomopsis* e *Phoma*, obtidos de lotes de sementes de ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*), jacarandá da bahia (*Dalbergia nigra*) e tachi branco (*Triplaris surinamensis*) cedidos pelo Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras, bem como o estudo da sua patogenicidade a sementes de ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e angico vermelho (*Anadenanthera perigrina*).

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Taxonomia do Gênero *Phoma*

Numa primeira citação sobre fungos patogênicos e saprofíticos, Wollenweber e Hochapfel publicaram, em 1936, um artigo sobre taxonomia de fungos *Sphaeropsidales*, no qual foram descritas espécies de *Phoma* e *Ascochyta* (Boerema e Dorenbosch, 1973). Estes autores deram uma descrição comparativa de 20 espécies, as quais foram isoladas a partir de frutos, folhas, ramos, caule e madeira de várias plantas. De acordo com estes pesquisadores Wollenweber e Hochapfel não foram críticos o suficiente quando identificaram e nomearam seus isolados atribuindo o erro ao fato deles não terem considerado a literatura que engloba a antiga sistemática sobre sinonímias.

Um estudo comparativo de isolados considerados como sendo do gênero *Phoma* retirados a partir de várias fontes, feito por Dennis (1946), citado por Boerema e Dorenbosch (1973) constitui-se um excelente exemplo da maneira na qual a revisão da taxonomia de *Sphaeropsidales* deve ser realizada, considerando o grupo de gêneros que apresenta esporos pequenos. Os vários espécimes coletados por este pesquisador foram estudados comparativamente quanto aos caracteres morfológicos tanto *in vivo*, como *in vitro*; não deixando de ser considerado o grau de patogenicidade dos isolados. O autor divide os

espécimes em 17 grupos, que posteriormente foram comparados e revisados por Boerema (1976) que reconheceu a divisão e acrescentou duas espécies a dois grupos. Neste trabalho o autor mostra que a maioria das espécies descritas entre os gêneros *Phoma*, *Phyllosticta*, *Ascochyta* e *Diplodina* são, na verdade, espécies de *Phoma* Sacc. De acordo com o autor, somente estudos culturais em comparação com características *in vivo* podem acabar com os problema de sinonímia e nomenclatura de espécies de *Phoma*. Neste artigo, o autor descreve sete espécies de *Phoma* e três de *Ascochyta* observando também características do desenvolvimento conidial, com auxílio de fotomicrografias eletrônicas.

De acordo com Dorenbosch (1970), os isolados devem ser comparados em placas de Petri contendo meio de cultura Oatmeal-ágar e malt-ágar, preparados segundo Ainsworth (1961), quanto aos caracteres morfológicos. No entanto, é necessário para identificação, a determinação da morfometria de picnídios e esporos. Quanto a temperatura a serem submetidos os espécimes, estas divergem entre 20-22°C (Dorenbosch, 1970) e 25°C (Sutton, 1980).

Segundo observação de Boerema e Dorenbosch (1973) em um sistema artificial de classificação entre os Coelomycetes sempre deve ser considerado o substrato no qual o isolado é desenvolvido, devido às variações que podem ocorrer na morfometria e caracteres morfológicos do fungo estudado, promovidas pela disponibilidade de diferentes nutrientes.

### Taxonomia do Gênero *Phomopsis*

O gênero *Phomopsis* tem recebido considerável atenção por parte dos patologistas e micologistas devido ao largo número de patógenos que inclui e ao fato de que muitas de suas espécies produzem dois tipos de conídios, alfa e beta (Hahn, 1930).

De acordo com Hahn (1930), em 1905, esta característica foi considerada, por Saccardo, como suficiente para classificar os isolados fúngicos, antes classificados como *Phoma*, em um novo gênero, *Phomopsis*. Logo depois, Diedicke (1911) definiu a posição deste gênero descrevendo seus caracteres morfológicos. Grove, em 1917, citado por Hahn (1930), considerou como principal diferença entre *Phomopsis* e *Phoma* a presença, no primeiro gênero chamado esporo *B* que aparentemente pode ser considerado como um corpo não-funcional por ter resistido a todos os métodos comuns usualmente empregados para induzir a germinação.

Uma grande contribuição dada para o conhecimento da morfologia deste gênero foi feita por Archer (1926), que fez um estudo crítico do estroma e da cavidade de formação de picnídios em 2 espécies de *Phomopsis*. Este autor observou que substrato e umidade favoreceram a formação de estroma e influenciaram na largura dos picnídios, tendo a umidade favorecido a confluência dos mesmos.

De acordo com Wehmeyer (1927), citado por Hahn (1930), existem espécies que produzem só esporos alfa por condições que reprimem a formação de esporos beta, podendo ser confundido com o gênero *Fusicoccum*.

Além da fotomicrografia eletrônica de secções de picnídios e esporos (Upadhyay, 1990), sistemas de padrões isoenzimáticos estão sendo

utilizados como auxílio na identificação de espécies fúngicas (Soares, Fonseca e Lopes, 1993; Elliott, Des Jardin e Henson, 1993; Christensen *et al.*, 1993; Crous, Wingfield e Alfenas, 1993). Estes métodos podem vir a facilitar a diferenciação e agrupamento dos gêneros *Phoma* e *Phomopsis*.

### Ocorrência de *Phoma* e *Phomopsis* em Sementes de Espécies Florestais.

Na área florestal pouco se estudou sobre a disseminação de patógenos via semente. No entanto, alguns trabalhos têm evidenciado a frequente contaminação fúngica, especialmente em espécies nativas (Ferreira 1988). Entre estes microrganismos, encontrados associados as sementes, muitos gêneros de fungos são causadores de problemas em culturas agrônômica (Homechin, Pizzinano e Menten, 1986). No Brasil, os poucos trabalhos existentes (Lasca, Sampaio e Cintra, 1972, 1978; Urban, Metzler e Cícero, 1982; Homechin, Pizziano e Menten, 1986; Fosco Mucci e Lasca, 1986; Carneiro, 1986, 1990) têm apenas relacionado os microrganismos que ocorrem nas sementes, sem verificar contudo, os seus efeitos sobre a germinação e desenvolvimento das plantas.

O primeiro trabalho de levantamento de fungos causadores de doenças associados à sementes realizado no país, foi desenvolvido por Lasca, Sampaio e Cintra (1972) em sementes importadas de *Pinus* spp., no qual foi detectado vários fungos fitopatogênicos. Posteriormente, outros trabalhos realizados determinaram que diversos microrganismos, patogênicos ou não, incluindo os gêneros *Phoma* e *Phomopsis*, podem estar associados às sementes de espécies florestais, tendo sido

observado que os fungos foram o grupo mais numeroso (Lasca, Sampaio e Cintra, 1978; Urben, Metzel e Cícero, 1982; Homechin, Pizziano e Menten, 1986; Fosco Mucci e Lasca, 1986; Carneiro, 1986, 1990; Maschio, Maceda e Ramos 1990; Martins 1991). Nestes levantamentos muitos pesquisadores têm constatado a frequente associação de fungos do gênero *Phomopsis* e *Phoma* à sementes de espécies florestais.

Em 1978, Lasca, Sampaio e Cintra verificaram que sementes de *Pinus* sp. produzidas no estado de São Paulo, quando submetidas à teste de sanidade, apresentavam com associação de *Phoma* e *Phomopsis*, dentre outros gêneros de fungos.

Dentre os fungos observados em sementes de seringueira (*Hevea brasilienses*), diversos são patógenos deste hospedeiro, como é o caso de *Phomopsis heveae* (Petch) Boedijn. isolado a partir de amostras de sementes procedentes dos Estados do Pará e Bahia, no período de janeiro a junho de 1981, por Urben, Metzel e Cícero (1982).

Homechin, Pizziano e Menten (1986) conduziram estudos sobre a sanidade de sementes de *Pinus elliotti* var. *elliotti* e *Pinus taeda* e constataram a presença de *Phoma* sp.

No mesmo ano, diante da escassez de informações sobre a sanidade de sementes das espécies florestais nativas, Fosco Mucci e Lasca (1986), iniciaram um levantamento de fungos associados às sementes de algumas espécies colhidas pelo Instituto Florestal de São Paulo. Dentre os fungos observados pelos autores e por Carneiro (1987), diversos são patógenos de plantas cultivadas, incluindo os gêneros *Phomopsis* e *Phoma* que estavam associados à sementes de *Cassia leptophylla* Vog. (*Cassia leptofila*), *Cedrela sissilis* Cell (Cedro rosa), *Peltophorum dubium*

(Spreng.) Taubert (Canaféstula), *Tabebuia* sp. (ipê branco), *Myroxylon balsamum* (L) Harms (cabruíva vermelha) *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Bressan (angico-vermelho), *Dalbergia nigra* (Vall) Fr. All. (Jacarandá da Bahia) e *Cassia ferruginea* Schrod (Cassia ferruginia).

Carneiro (1986), estudou a população fúngica associada a 18 gêneros e/ou espécies florestais provenientes dos Estados do Amazonas, Pará, Distrito Federal, Espírito Santo e Santa Catarina. Neste trabalho destacaram-se os gêneros *Phoma* e *Phomopsis*, encontrados em associação às sementes estudadas, considerando-os patogênicos a estas espécies.

Sementes de *Acacia speciosa* estudadas por Maschio, Maceda e Ramos (1990) apresentaram-se em associação com *Phomopsis* spp., dentre outros gêneros fúngicos.

Em estudo da qualidade sanitária de espécies florestais em Paraopeba-MG, Carneiro (1990) verificou a presença de *Phoma* sp. em ipê e pau-de-santo, na proporção de 8/400 sementes e 10/400 sementes, respectivamente. De acordo com Martins (1991), dentre os gêneros mais comuns encontrados em sementes de diversas espécies florestais, provenientes do Sul de Minas Gerais, se encontram *Phoma* e *Phomopsis*.

Devido a associação destes patógenos à sementes de espécies florestais observa-se, como linha básica de pesquisa a ser desenvolvida nas culturas de espécies florestais, a necessidade do levantamento de patógenos sob ponto de vista da sua identificação e patogenicidade. (CORREIA, 1997)

## Patogenicidade de *Phoma* e *Phomopsis* à Sementes de Espécies Florestais.

Os gêneros *Phoma* e *Phomopsis* são patógenos de sementes de diversas culturas agronômicas, porém sua patogenicidade a sementes de espécies florestais têm recebido muito pouca atenção. (CORREIA, 1995)

Munjal e Sharma (1976) estudaram o efeito de *Phoma hibernica*, sobre sementes de *Pinus roxbirugti* e *P. wallichina*. Observou-se que esta espécie fúngica causou danos de pré-emergência em ambas espécies de *Pinus*.

Sementes de *Acacia speciosa* avaliadas por Maschio, Maceda e Ramos (1990) quanto a associação de fungos, foram danificadas por *Phomopsis* spp., quando submetidas a tratamento com hipoclorito de sódio a 1% (70% danificada) e água ionizada autoclavada (80% danificada).

Martins (1991), verificou a patogenicidade de *Phomopsis* e *Phoma* a sementes de ipê amarelo, ipê roxo e barbatimão. Enquanto que Sales (1992) observou que *Phomopsis* sp. foi danoso somente à germinação de sementes de ipê amarelo desprovidas de tegumento e à sementes de barbatimão, não sendo patogênico a sementes de ipê roxo.

A escassez de trabalhos que comprovem a patogenicidade de *Phoma* e *Phomopsis* à sementes de espécies florestais, está relacionada, principalmente, à falta de identificação destes fungos ocorrendo em sementes. Muitas vezes isolados não patogênicos ou patogênicos a determinadas espécies são testados e, não promovendo doenças, são considerados como saprófitas. (CORREIA, 1995)

### Caracterização Isoenzimática de Fungos Fitopatogênicos.

O nível de polimorfismo de vários espécimes fúngicos, inclusive a nível de raça, vêm sendo determinado através da técnica de eletroforese por vários pesquisadores (Stipes, Emert e Brown, 1983; Alfenas, Jeng e Hubbes, 1984; Moreira e Alfenas, 1985; Hall, 1974).

A técnica de eletroforese, muitas vezes, é capaz de auxiliar a identificação de isolados fúngicos que são de difícil diagnóstico através dos métodos tradicionais que se baseiam na morfologia da cultura e em visualizações microscópicas. Devido a sua facilidade de execução esta técnica pode ser aplicada no estudo de marcadores na genética de microrganismos (Alfenas *et al.*, 1991). Segundo estes autores, a eletroforese baseia-se na migração de partículas através de um campo elétrico, onde ocorre a separação de acordo com o peso molecular.

O gel de eletroforese também tem sido utilizado para auxiliar na identificação de fungos entomopatogênicos (May, Roberts e Soper, 1979) e de isolados de fungos antagonistas (Zamir e Chet, 1985).

Em trabalho realizado por Hassan *et al.* (1991) a análise eletroforética de isolados de *Phoma lingam* permitiu diferenciar isolados agressivos e não agressivos. Os padrões enzimáticos demonstraram que isolados agressivos têm elevados níveis de atividade para celulase, alfa e beta glucanase e poligalacturonase.

Apesar da constatação de Van Der Aa, Noordeloos e De Gruyter (1990) de que os caracteres culturais e morfológicos de *Phomopsis* são insuficientes para delimitação das centenas de espécies descritas, não são encontrados, na literatura, trabalhos relacionados com o estudo de seu polimorfismo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, G.C. *Ainsworth e Bisbys dictionary of the fungi*. London: Editora Kew, 1961. 569p.
- ALFENAS, A.C.; JENG, R.; HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. *Canadian Journal of Botany*, Cambridge, v.62, n.6/12, p.1756-1762, June./Dec. 1984.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. (Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- ARCHER, W.A. Morphological characters of some Sphaeropsidales in cultura. *Annual Mycological*, [S.l.], v.24, n.1, p.1-18, Jan. 1926.
- BOEREMA, G.H. The *Phoma* species studied in culture by Dr. R.W.G. DENNIS. *Transactions of the British Mycological Society*, Great Britain, v.29, n.1, p.11-42, Jan. 1976.
- BOEREMA, G.H.; DORENBOSCH, M.M.J. The *Phoma* and *Ascochyta* species described by wollenweber and hochapfel in their study on fruit-rotting. *Studies in Mycology*, [S.l.], v.3, n.6, p.1-50, June. 1973.
- CAMPACCI, C.A.; PESSANHA, B.M.R. Exame fitopatológico das sementes. In: *Seminário Brasileiro de Sementes*, 2., Pelotas, 1968. *Anais...* Guanabara: MA, 1970, p.113-118.
- CARNEIRO, J.S. Microflora associada a sementes de essências florestais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 3, p.557-566, jul./set. 1986. ✕
- CARNEIRO, J.S. Qualidade sanitária de sementes de espécies florestais em Paraopeba-MG. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 15, n.1, p. 75-77, jan./mar. 1990. ✕
- CARNEIRO, J.S. Teste de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S., (ed.) *Patologia de sementes*, Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.386-393. ✕
- CHRISTENSEN, M.J.; LEUCHTMANN, A.; ROWAN, D.D.; TAPPER, B.A. Taxonomy of acromonium endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycological Research*, Great Britain, v.97, n.9, p.1083-1092, Sept. 1993.

- CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; ALFENAS, A.C. *Cylindrocladium parasiticum* spp. nov., a new name for *C. crotalareae*. Mycological Research, Great Britain, v.97, n.7, p.889-896, July 1990.
- DIEDICKE, H. Die gatfung *Phomopsis*. Annual Mycological, [S.l.], v.9, n.1, p.8-13, Jan. 1911.
- DORENBOSCH, M.M.J. Key to nine ubiquitous soil-borne *Phoma*-like fungi. Persoonia, Leiden, v.6, n.1, p.1-14, Jan. 1970.
- ELLIOTT, M.L.; Des JARDIN, E.A.; HENSON, J.M. Use of a polymerase chain reaction assay to aid in identification of *Gaeumannomyces graminis* from different grass host. Phytopathology, St. Paul, v.83, n.4, p.414-418, apr. 1993.
- FERREIRA, F.A. Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.
- FOSCO MUCCI, E.S.; LASCA, C.C. Flora fúngica de sementes de essências florestais nativas. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 11, n. 2, p. 352-353, nov. 1986. /
- HAHN, G.G. Life-history studies of species of *Phomopsis* occurring on conifers. PART I. Transactions British Mycological Society, Great Britain, v.15, n.1, p.32-93, Jan. 1930.
- HALL, R. Electrophoretic protein profiles as criteria in the taxonomy of fungus and algae. Bulletin of the Torrey Botanical Club, Torrey, v.100, n.1/6, p.253-259, Jan./June 1974.
- HASSAN, A.K.; SCHULZ, C.; SACRISTAN, M.D.; WOSTEMEYER, J. Biochemical and molecular tools for the differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen, *Phoma lingam*. Journal of Phytopathology, Berlin, v.131, n.2, p.120-136, Feb. 1991.
- HOMECHIN, M.; PIZZINANO, M.A.; MENTEN, J.O.M. Sanidade de sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium oxysporium* em plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Summa Phytopathologica, Piracicaba, v. 12, n. 1/2, p. 103-112, jan./jun. 1986. /
- LASCA, C.C.; SAMPAIO, A.S.; CINTRA, A.F. Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus* spp. O Biológico, São Paulo, v. 37, n. 11, p. 287-292, nov. 1972. /

- LASCA, C.C.; SAMPAIO, A.S.; CINTRA, A.F. Condições fitossanitárias de sementes de *Pinus elliottii* Englm produzidos no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 4, n. 1, p. 12-13, jan./mar. 1978.
- MARTINS, S.H. Aspectos fitossanitários e fisiológicos de sementes de barbatimão, ipê amarelo e ipê roxo de algumas localidades do Sul de Minas Gerais. Lavras: ESAL, 1991. 72p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- MASCHIO, L.M. de A.; MACEDA, A.; RAMOS, A. Fungos em sementes de espécies florestais com potencial agrossilvicultural no Paraná. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, Campos do Jordão: SBCF, 1990. Anais... Campos do Jordão: IBDF, 1990. p. 555-563.
- MAY, B.; ROBERTS, D.W.; SOPER, R.S. Intraspecific genetic variability in laboratory strains of *Enthomophthora* as enzyme electrophoresis. *Experimental Mycology*, New York, v.3, n.1/6, p.289-297, Jan./June 1979.
- MENTEN, J.O.M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1991. 321P.
- MOREIRA, A.M.; ALFENAS, A.C. Diferenciação de espécies de *Cylindrocladium* por meio da análise eletroforética de proteínas e isoenzimas em géis de poliacrilamida. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.10, n.3, p.258, jul./ago. 1985.
- MUNJAL, R.L.; SHARMA, A.D. Effect of seed mycoflora on pre and post-emergence seedling of some important conifers in the Himachal Pradesh. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, Udaipur, v.6, n.1, p.27-31, Jan. 1976.
- NEERGAARD, P. *Seed pathology*. London: Mac Millan Press, 1977. v.1, 839 p.
- SALES, N. de L.P. Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê-amarelo, ipê-roxo e barbatimão. Lavras-MG: ESAL, 1992. 89p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- SOARES, A.M.Q.; FONSECA, M.E.N.; LOPES, C.A. Caracterização cultural, grupos de compatibilidade e padrões isoenzimáticos de isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de milho (*Zea mays*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, n.2, p.219-225, abr./jun. 1993.

- STIPES, R.J.; EMERT, G.H.; BROWN, D.Jr. Differentiation of *Endothia gyrossa* and *Endothia parasitica* by disc electroforesis of intramycelial enzymes and proteins. *Mycology*, Bronx, v.74, n.1/6, p.138-141, Jan./june. 1983.
- SUTTON, B.C. *The coelomycetes: Fungi Imperfect with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Kew Surrey: Commonwealth Mycology Institute, 1980. 696p.
- UPADHYAY, R.K.; STROBEL, G.A. *Phoma eyperi* sp. nov., a new pathogen of *Cyperus iria*, its vegetative and reproductive structures and production of phytotoxina. *Canadian Journal of Botany*, Cambridge, v.68, n.10, p.2059-2065, Oct. 1990.
- URBEN, A.F.; METZEL, M.M.V. da S.; CÍCERO, S.M. Ocorrência de fungos em sementes de seringueira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 17, n. 11, p. 1633-1637, nov. 1982.
- VAN DER AA, H.A.; NOORDELOOS, M.E.; De GRUYTER, J. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Studies in Mycology*, [S.l.], v.32, n.1, p.3-19, Jan. 1990.
- ZAMIR, D.; CHET, I. Apication of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.31, n.6/12, p.578-580, July/Dec. 1985.

INFLUÊNCIA DE MEIOS DE CULTURA, LUMINOSIDADE E  
TEMPERATURA NA REPRODUÇÃO DE ISOLADOS DE *Phomopsis* E  
*Phoma* OBTIDOS DE SEMENTES DE ESPÉCIES FLORESTAIS.\*

Regina M. Sartori Corrêa<sup>1</sup>, Hilário A. de Castro<sup>1</sup> e Maria Menezes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UFLA, Departamento de Fitossanidade, Caixa Postal 37, 37200-000,  
Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup> UFRPE, Departamento de Agronomia, Área de fitossanidade, R. D.  
Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

\* Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

RESUMO

Estudou-se a capacidade de formação de picnídios e conídios de quatorze isolados de *Phomopsis* e dois isolados de *Phoma*, que, normalmente, é prejudicada ou perdida, após armazenamento em meio de cultura. Foram utilizados cinco meios de cultura (aveia-ágar, malte-ágar, batata-dextrose-ágar, cenoura-ágare suco de hortaliças-ágar) à temperatura de 25°C sob regime de alternância luminosa e, duas temperaturas (21 e 25°C) e três padrões de luminosidade (12h claro/12 h escuro, claro contínuo e escuro contínuo), em meio de cultura aveia-ágar. Foi

observada variação na produção de picnídios e conídios nos diferentes meios de cultura e nas temperaturas e luminosidade testadas, sendo que, para a maioria dos isolados, o meio de cultura de aveia-ágar e o regime de claro contínuo induziram maior esporulação.

Palavras-chave: *Phomopsis*, *Phoma*, reprodução, meios de cultura, temperatura, luminosidade

#### ABSTRACT

CORRÊA, R.M.S.; CASTRO, H.A.; MENEZES, M. Influence of culture media, luminosity and temperature on reproduction of *Phomopsis* and *Phoma* occurring on forest seeds.

This work studied the picnidial and conidial formation of fourteen isolates of *Phomopsis* and two isolates of *Phoma*, which is usually modified or lost after storage on culture media. Five culture media (oatmeal-agar, malt-agar, potato-agar, carrot-agar and vegetables juice-agar) under 12 h light/12 h dark and 25°C and, two temperature (21 and 25°C) and three luminosity conditions (12 h light/ 12 h dark, continuous light and continuous dark), on oatmeal-agar were compared. Variation in picnidial and conidial production was observed in all media, temperature and luminosity conditions considered in this study but the oatmeal agar and light continuous were conditions which caused increase in sporulation of most isolates.

## INTRODUÇÃO

Na área de patologia florestal poucos estudos de patogenicidade vêm sendo realizados com os gêneros *Phomopsis* e *Phoma*, apesar de estarem sempre presentes em isolamentos realizados a partir de sementes de espécies florestais.

Um das grandes dificuldades que envolvem o estudo da patogenicidade destes gêneros, principalmente em se tratando de *Phomopsis*, é a formação de picnídios férteis, dado que a inoculação para ser realizada normalmente é padronizada na ordem de cem mil conídios por ml de suspensão.

A produção de picnídios férteis também é essencial na avaliação taxonômica destes gêneros. No entanto, deve-se considerar que o substrato pode alterar o tamanho de estruturas fúngicas ou caracteres culturais que são utilizados como base para o agrupamento de fungos em espécies (Sutton, 1980).

A reprodução requer que todos fatores genéticos e ambientais sejam favoráveis. O intervalo de temperatura que permite a reprodução é usualmente mais estreito que aquele que permite melhor crescimento e a quantidade de luz pode exercer efeito indutor ou inibidor sobre a formação de estruturas de reprodução (Cochrane, 1958). Ambos efeitos podem depender da composição do meio de cultura. Sabe-se que certos meios de cultura naturais são mais favoráveis a esporulação de fungos por terem carboidratos complexos que frequentemente são menos adequados para a produção de hifas vegetativas e mais adequados à produção de esporos (Lukens, 1963). A concentração de nitrogênio e a deficiência ou excesso de determinados elementos minerais também podem reduzir ou inibir a esporulação. De modo geral, a alta concentração

de nitrogênio reprime a esporulação e está diretamente ligada à concentração de carbono. Quanto à deficiência mineral, sabe-se que a esporulação de *Phoma* é drasticamente reduzida na deficiência de cobre (Cochrane, 1958).

O método de plaqueamento influencia a esporulação especialmente no caso de fungos que produzem picnídios ou acérvulos e é possível que os esporos sejam portadores de substâncias indutoras da esporulação na geração seguinte (Lilly e Barnett, 1951). Por outro lado, o rápido esgotamento de nutrientes que ocorre quando se efetua o plaqueamento de esporos pode ser o responsável direto pela rápida indução da esporulação (Barnett, Timnick e Lilly, 1950).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a formação de picnídios férteis de *Phomopsis* e *Phoma* em diferentes meios de cultura e sob diferentes condições de temperatura e luminosidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados utilizados neste trabalho foram obtidos de picnídios retirados de sementes de espécies florestais nativas (*Dalbergia nigra* - jacarandá da bahia, *Tabebuia serratifolia* - ipê amarelo e *Triplaris surinamensis* - tachi branco), a partir de lotes de sementes gentilmente cedidos pelo Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras, e repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Foram isolados 11 do gênero *Phomopsis* (P2, P4, P6, P7, P8, P10, P12, P13, P14, P15 e P16) e um do gênero *Phoma* (P1) de sementes de ipê amarelo, três do gênero *Phomopsis* (P3,

P5 e P9) de sementes de jacarandá da bahia e um isolado de *Phoma glomerata* (P11) de sementes de tachi branco.

### Influência dos meios de cultura sobre a reprodução de *Phomopsis* e *Phoma*

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, cada tratamento com 5 repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%.

Foram utilizados os seguintes meios de cultura, na quantidade de aproximadamente 20 ml por placa: Meio Malt-ágar (MA: Extrato de Malte - 20 g, Ágar - 20 g, Dextrose - 20 g, Peptona - 1 g, Água destilada q.s.p.- 1000 ml); Meio Oatmeal-ágar (OA: Aveia - 20 g, Ágar - 18 g, Solução de nutrientes contendo 0.1 g de  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0.1 g de  $MnSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0.1 g de  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  em 100 ml de água destilada - 1 ml, Água destilada q.s.p. - 1000 ml); Meio Batata-dextrose-ágar (BDA: Batata - 200 g, Dextrose - 20 g, Ágar - 20g, Água destilada q.s.p.- 1000 ml); Meio Cenoura-ágar (CA: Cenoura - 20 g, Dextrose - 20 g, Ágar - 20 g, Peptona - 1 g, Água destilada q.s.p.- 1000 ml) e Meio Suco de hortaliças-ágar (SHA: Ágar - 20 g, Dextrose - 20 g, Peptona - 1 g, Suco de 20 g de berinjela, 10 g de tomate, 10 g de alface, 20 g de couve, 20g de repolho, 20 g de beterraba/100 ml, Água destilada q.s.p.- 1000 ml).

A suspensão de esporos, utilizada para os plaqueamentos, foi preparada esmagando-se os picnídios obtidos de cultura de 20 dias de idade, em meio BDA, em tubos de ensaio com água destilada e esterilizada. Em seguida, 0,3 ml da suspensão de esporos, foi pipetada

para placas de Petri, com 9 cm de diâmetro, e, uniformemente distribuída pela superfície do meio de cultura com o auxílio de uma espátula de Drigalsky. Os isolados de *Phoma* foram repicados através de disco micelial, dado que não houve formação de picnídios em meio BDA.

Após o plaqueamento procedeu-se a incubação em câmara de crescimento, à temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob conjunto de lâmpadas fluorescentes, marca Sylvânia, distanciada acima das placas 40 cm, em regime de alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro).

A avaliação foi realizada após 12 dias de incubação, através da contagem de picnídios, conídios alfa e beta. A determinação do número de picnídios foi realizada através do uso, sob as placas de Petri, de um diagrama, onde uma parte em 36 se encontrava marcada como área de contagem. As placas eram colocadas sob microscópio estereoscópio no aumento de 40 vezes para se efetuar as contagens. Os conídios foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer, no campo central, sob objetiva de 40, em microscópio óptico.

#### Influência do regime de luminosidade e temperatura sobre a esporulação de *Phomopsis* e *Phoma*

No estudo da influência do regime de luminosidade e temperatura sobre a esporulação foi utilizado somente o meio de cultura de aveia-ágar, pois em experimento anterior os isolados se comportaram com maior uniformidade apenas neste meio.

O plaqueamento foi realizado, conforme descrito no item anterior. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas sob as

seguintes condições: exposição contínua à luz (claro contínuo), exposição em períodos alternados de 12 horas à luz e ao escuro (alternância luminosa) e sem exposição de luz (escuro contínuo). As condições de temperatura foram de  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A incubação foi realizada em câmara de crescimento e sob conjunto de lâmpadas fluorescentes (Sylvânia) situado 40 cm acima das placas. As placas do tratamento escuro contínuo foram envolvidas em papel alumínio.

A avaliação foi realizada após 12 dias de incubação através da contagem de conídios alfa no campo central da câmara de Neubauer. Os isolados de *Phomopsis* e *Phoma* não apresentaram formação de conídios beta. A contagem dos picnídios não foi realizada devido esta nem sempre ter apresentado, em experimento anterior, correlação com a fertilidade dos isolados, considerando o maior número de conídios aos doze dias da incubação.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, de acordo com o esquema fatorial  $3 \times 3$ , perfazendo 9 tratamentos e constando de 4 repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os meios de cultura utilizados, temperatura e luminosidade influíram significativamente na reprodução de *Phomopsis* e *Phoma*, tendo o meio de cultura OA favorecido a formação de conídios alfa na maioria dos isolados, excetuando-se os isolados P2 e P9 (*Phomopsis*) e P11 (*Phoma*) que tiveram os meios SHA, SHA e BDA como melhores indutores

de esporulação, respectivamente (Tabela 1). Os resultados obtidos confirmam a indicação feita por Sutton (1980) para a utilização do meio OA na obtenção de esporulação de fungos da classe Coelomycetes. Resultados semelhantes foram obtidos por Kimati (1975), estudando a esporulação do gênero *Colletotrichum*, sendo, este meio, também indicado, nos trabalhos de Barreto e Kimati (1982) e Camargo e Kimati (1991), para melhorar a esporulação de *Pyrenochaeta terrestris*. A utilização de meios naturais favorece a esporulação de fungos por terem carboidratos complexos que são mais adequados à esporulação (Lukens, 1963). Observando-se a composição do meio OA, nota-se que esta se constitui a mais pobre, sendo possível que o esgotamento de seus nutrientes seja mais rápido quando comparado aos outros meios. De acordo com Barnett, Timnick e Lilly (1950) o rápido esgotamento de nutrientes, que ocorre normalmente no plaqueamento com suspensão de esporos, é responsável pela indução de uma rápida esporulação. Sugere-se que os isolados P2, P9 (*Phomopsis*) e P11 (*Phoma*) possuem uma necessidade adicional de nutrição para a esporulação, o que pode ser comum a determinados fungos conforme descrito por Strandberg (1987).

Na maior parte dos isolados não houve correlação entre a formação de picnídios e a de conídios alfa, tendo, apenas os isolados P1 (*Phoma*) e P6, P10 e P13 (*Phomopsis*) o meio OA como melhor substrato para a formação de picnídios. Observa-se que a produção de maior número de picnídios pode não indicar uma maior produção de conídios alfa, ao contrário do que normalmente é sugerido na literatura. A esporulação parece estar mais dependente do esgotamento do meio de cultura do que do efeito adicional que seus nutrientes possam induzir. É possível que os meios mais ricos tenham favorecido a formação de picnídios, no entanto,



de reprodução, respectivamente (Tabela 1). Os resultados obtidos  
 confirmam a hipótese feita por Sutton (1980) sobre a utilização da mão  
 de obra estrangeira de capitalização de longo prazo. Os resultados  
 também confirmam a hipótese feita por Kimmitt (1972) calculando a  
 produtividade do gênero *Chrysomelidae*, sendo, este, mais  
 elevado nos trabalhos de campo e Kimmitt (1981) e Camargo e Kimmitt  
 (1981) para melhorar a produtividade de *Hydrophilidae* através  
 da utilização de meios naturais favorece a reprodução de longo prazo  
 e resultados melhores quando mais espécies e capitalização de longo  
 prazo. Observando-se a produtividade do gênero *Chrysomelidae* que  
 também é mais pobre, sendo possível que o equilíbrio de longo  
 prazo seja mais rápido quando comparado aos outros meios. De  
 acordo com Barlett, Timm e Eilly (1985) o rápido crescimento de  
 plantas que ocorre naturalmente no desenvolvimento com espécies de  
 longo prazo, a produtividade de longo prazo de uma espécie é superior a  
 que de indivíduos *B. 1. P. (longicauda)* e *F. 1. P. (longicauda)* porque uma  
 espécie de longo prazo de longo prazo é superior, e que pode ser  
 mais a produtividade de longo prazo conforme descrito por Stenseth (1987).

Os resultados obtidos nos trabalhos de campo confirmam a hipótese  
 de produtividade e de longo prazo, sendo que a produtividade de  
 longo prazo é superior a produtividade de longo prazo. Os resultados  
 também confirmam a hipótese feita por Sutton (1980) sobre a utilização da  
 mão de obra estrangeira de capitalização de longo prazo. Os resultados  
 também confirmam a hipótese feita por Kimmitt (1972) calculando a  
 produtividade do gênero *Chrysomelidae*, sendo, este, mais  
 elevado nos trabalhos de campo e Kimmitt (1981) e Camargo e Kimmitt  
 (1981) para melhorar a produtividade de *Hydrophilidae* através  
 da utilização de meios naturais favorece a reprodução de longo prazo  
 e resultados melhores quando mais espécies e capitalização de longo  
 prazo. Observando-se a produtividade do gênero *Chrysomelidae* que  
 também é mais pobre, sendo possível que o equilíbrio de longo  
 prazo seja mais rápido quando comparado aos outros meios. De  
 acordo com Barlett, Timm e Eilly (1985) o rápido crescimento de  
 plantas que ocorre naturalmente no desenvolvimento com espécies de  
 longo prazo, a produtividade de longo prazo de uma espécie é superior a  
 que de indivíduos *B. 1. P. (longicauda)* e *F. 1. P. (longicauda)* porque uma  
 espécie de longo prazo de longo prazo é superior, e que pode ser  
 mais a produtividade de longo prazo conforme descrito por Stenseth (1987).

TABELA 1 - Número médio de conídios de *Phomopsis* e *Phoma* em cinco meios de cultura aos 12 dias de incubação

ISOLADO	NÚMERO DE CONÍDIOS (X 10 <sup>6</sup> ) *											
	OA		MA		BDA		CA		SHA		CV	
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
P1	62,91 A	-	7,26 B	-	2,46 BC	-	3,17 B	-	0,40 C	-	5,56	-
P2	0,04 AB	-	0,99 AB	-	0,61 AB	-	0,01 B	-	9,25 A	-	19,45	-
P3	1,07 A	-	3,09 A	-	2,13 A	-	2,26 A	-	1,03 A	-	5,36	-
P4	19,74 A	0,17 A	0,06 B	0,00 B	1,07 B	0,00 B	0,47 B	0,14 A	0,60 B	0,08 A	8,78	9,61
P5	23,63 A	0,08 A	1,78 AB	0,00 B	1,18 AB	0,08 A	0,12 B	0,00 B	0,26 B	0,00 B	11,70	47,43
P6	8,10 A	-	0,07 B	-	0,29 B	-	0,05 B	-	0,29 B	-	6,14	-
P7	38,58 A	0,09 AB	0,23 B	0,02 B	0,15 B	0,06 AB	1,22 B	0,34 A	0,73 B	0,09 AB	9,49	9,77
P8	3,39 AB	0,00 A	1,41 AB	0,00 A	0,21 B	0,003 A	0,81 AB	0,003 A	5,50 A	0,0008 A	9,22	74,36
P9	11,98 AB	-	0,59 B	-	0,78 AB	-	10,04 AB	-	30,29 A	-	4,20	-
P10	1,46 A	0,10 A	0,02 B	0,00 B	0,00 C	0,00 B	0,10 B	0,00 B	0,03 B	0,00 B	8,99	17,94
P11	3,96 B	-	2,93 B	-	26,41 A	-	9,08 AB	-	2,25 B	-	3,85	-
P12	73,34 A	0,84 A	0,12 B	0,06 B	0,19 B	0,10 AB	0,18 B	0,15 AB	0,41 B	0,13 AB	8,58	9,15
P13	1,36 A	-	0,05 AB	-	0,17 AB	-	0,13 AB	-	0,002 B	-	19,79	-
P14	82,48 A	1,62 A	1,28 B	0,19 AB	2,10 B	0,43 AB	1,11 B	0,26 AB	0,97 B	0,16 B	6,95	7,54
P15	3,74 A	-	0,002 A	-	0,0001 A	-	0,0005 A	-	0,55 A	-	48,29	-
P16	9,08 A	0,35 A	0,11 B	0,00 C	0,13 B	0,00 C	0,03 B	0,33 B	0,05 B	0,55 B	6,83	6,96

\* Médias seguidas por letras distintas nas linhas diferem entre si ao nível de significância de 1%

por ocasião da avaliação, aos 12 dias da incubação, estes, apesar de possuir uma grande quantidade de picnídios, ainda estariam iniciando a indução da esporulação (Tabela 2).

Os isolados de *Phomopsis* P10, P13 e P15 apenas produziram conídios beta quando cultivados em meio OA, ou SHA, no caso do isolado P2. Quando a produção destes conídios ocorreu em mais de um meio, o meio de cultura OA apenas favoreceu a sua formação nos isolados de *Phomopsis* P4, P12, P14 e P16 (Tabela 1). Em se tratando de isolados de uma mesma espécie, talvez *Phomopsis herbarum*, observa-se que a característica produção de conídio beta, pode não ser própria da espécie, constituindo-se um fator genético estável, conforme indica os trabalhos de Sutton (1980) e Hahn (1930), mas sim, uma característica dependente de um fator genético instável que reagiria de acordo com as condições de cultivo.

Nas temperaturas de 21°C e 25°C a produção de conídios alfa da maioria dos isolados não diferiram significativamente (Tabela 3). De acordo com Cochrane (1958), o intervalo de temperatura que permite maior esporulação é, normalmente, estreito. Observando os dados pode-se considerar que os isolados que tiveram a esporulação favorecida por determinada temperatura possuem este intervalo favorável a esporulação abaixo de 27°C ou acima de 19°C, enquanto que, considerando os isolados cujas temperaturas foram igualmente favoráveis à produção de conídios pode-se dizer que este intervalo enquadra ambas temperaturas.

O regime de luminosidade claro contínuo foi favorável à produção de conídios na maioria dos isolados. Resultado semelhante foi obtido por Camargo e Kimati (1991) que considerou a luz contínua como condição favorável à reprodução de *Pyrenochaeta terrestris*. A

TABELA 2 - Número médio de picnídios de *Phomopsis* e *Phoma* em cinco meios de cultura aos 12 dias de incubação

ISOLADO	NÚMERO DE PICNÍDIOS (X 10 <sup>3</sup> ) *					
	OA	MA	BDA	CA	SHA	CV
P1	21,65 A	5,13 C	9,93 AB	8,31 BC	13,70 AB	3,77
P2	0,29 B	1,22 A	1,28 A	1,66 A	1,95 A	3,96
P3	0,73 A	0,86 A	0,45 A	0,90 A	0,69 A	6,95
P4	3,34 C	13,57 AB	13,97 AB	25,80 A	12,01 B	3,16
P5	3,39 B	11,78 A	2,46 B	2,00 B	5,12 AB	4,97
P6	1,44 A	0,24 B	0,38 B	0,44 AB	0,36 B	8,56
P7	4,78 A	8,95 A	4,84 A	4,87 A	9,37 A	4,34
P8	2,15 B	4,84 A	4,82 A	6,57 A	4,06 A	2,78
P9	2,59 B	3,38 AB	2,46 B	5,31 AB	5,67 A	3,96
P10	0,60 A	0,28 AB	0,09 B	0,30 AB	0,23 AB	9,96
P11	2,08 AB	0,00 C	10,07 A	0,66 B	1,51 B	11,16
P12	3,84 B	15,60 A	5,77 B	8,67 AB	15,93 A	3,93
P13	0,59 A	0,07 B	0,09 B	0,19 AB	0,17 B	10,00
P14	6,57 B	14,09 A	16,30 A	10,70 AB	18,07 A	3,40
P15	1,09 A	1,53 A	0,35 B	1,55 A	1,36 A	6,22
P16	0,49 A	0,47 A	0,19 A	0,39 A	0,29 A	6,97

\* Médias seguidas por letras distintas nas linhas diferem entre si ao nível de significância de 1%

TABELA 3. Média de esporulação (conídios alfa x 10<sup>6</sup>/repetição) de Phomopsis e Phoma cultivados sob duas condições de temperatura e três condições de luminosidade, em meio de aveia-ágar, aos doze dias da incubação.

		MÉDIAS DO NÚMERO DE CONÍDIOS ALFA x 10 <sup>6</sup> /REPETIÇÃO (QUATRO REPETIÇÕES/TRATAMENTO)															
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
Dentro do fator claro contínuo																	
21°C	51.5aA	1.1aA	204.0aA	325.7aA	3.0aA	11.9aA	72.8aA	94.8aA	57.6aA	29.5aA	15.9aA	24.8aA	26.3aA	332.9aA	2.1aA	129.1aA	
25°C	223.0aA	5.9aA	40.4bB	8.0bA	73.5aA	4.4aA	2.5bB	5.2bB	19.1bA	1.9aA	0.006bA	3.3bA	8.7aA	2.5bB	0.07bB	2.1bB	
Dentro do fator alternância luminosa																	
21°C	321.7aA	2.0aA	98.6aA	12.4aA	62.6aA	0.6aA	2.4aA	4.6aA	64.9aA	3.5aA	0.0bB	0.9aA	15.2aA	7.2bA	0.2aA	24.1aA	
25°C	307.0aA	0.8aA	184.5aA	2.8bA	22.5aA	0.8aA	5.3aA	6.4aA	39.6bA	2.7bA	23.7aA	0.6bA	5.0aA	7.3aA	0.2aA	0.5bB	
Dentro do fator escuro contínuo																	
21°C	186.4bA	0.00150aA	4.1bA	8.6aA	5.0aA	1.6aA	0.8aA	0.2aA	6.2aA	0.4aA	0.0aA	0.15aA	0.2aA	0.2aA	0.05aA	1.8bA	
25°C	825.7aA	0.00003aA	10.9aA	0.6bA	13.4aA	0.0005bB	0.1aA	0.3aA	1.4bA	0.3bA	0.0aA	0.09bA	0.2aA	0.1aA	0.04aA	11.5aA	
Dentro do fator 21°C																	
claro contínuo	51.5bA	1.1aA	204.2aA	325.7aA	3.0aA	11.9aA	72.8aA	94.8aA	57.6aA	29.5aA	15.9aA	24.8aA	26.3aA	332.9aA	2.1aA	129.1aA	
alternância luminosa	321.7aA	2.0aA	98.6aA	12.4abB	62.6aA	0.6aA	2.4bB	4.6bB	64.9aA	3.5aA	0.0bB	0.9bB	15.2aA	1.2bB	0.2bAB	24.1bA	
escuro contínuo	186.4aA	0.00150bA	4.1bB	8.6bA	5.0aA	1.6aA	0.8bB	0.2cC	6.2bB	0.4bB	0.0bB	0.15cC	0.2bB	0.2cB	0.05bB	1.8cB	
Dentro do fator 25°C																	
claro contínuo	223.0bA	5.9aA	40.4bB	8.0aA	73.5aA	4.4aA	2.5aA	5.2aA	19.1aA	1.9aA	0.006aA	3.3aA	8.7aA	2.5aA	0.07aA	2.1bA	
alternância luminosa	307.0aA	0.8aA	184.5aA	2.8abA	225.2aA	0.8aA	5.3aA	6.4aA	39.6aA	2.7aA	23.7aA	0.6bB	5.0aA	7.3aA	0.02aA	0.5bAB	
escuro contínuo	825.7aA	0.00003bA	10.9cC	0.6bA	13.4aA	0.0005bB	0.1bB	0.3bB	1.4bB	0.3bB	0.0cC	0.09cC	0.2bB	0.1bB	0.04aA	11.5aA	
CV(%) =	4.7	34.7	3.6	25.8	23.4	21.8	8.7	7.8	6.4	8.0	51.9	6.9	5.5	6.6	10.8	6.4	

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de significância de 5% (a, b, c) e 1% (A, B, C).

luminosidade pode exercer efeito indutor ou inibidor sobre a formação de estruturas reprodutivas, e estar diretamente ligada à composição do meio de cultura por diferentes reações enzimáticas estarem sendo induzidas. Provavelmente, o mecanismo pelo qual a luz induz ou não a reprodução dos fungos esta associado a modificações que ocorrem a nível do metabolismo celular, envolvendo provavelmente a produção de enzimas, com considerável participação dos elementos que constituem o meio de cultura (Leonian, 1924). O efeito da luz pode ser também atribuído à formação de uma substância semelhante a um hormônio, denominada p310, que é produzida dentro do micélio e que estimula a esporulação (Trione, Leach e Mutch, 1966; Trione e Leach, 1969). Em geral, a melhor condição de incubação, considerando a produção de conídios, se encontra com a associação do regime de luminosidade claro contínuo à temperatura de 21°C.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNETT, H.L.; TIMNICK, M.B.; LILLY, V.G. Method of inoculating the production of spores by *Guinardia bidwellii* and other fungi in culture. *Phytopathology*, St. Paul, v.40, n.1, p.1, Jan. 1950.
- BARRETO, M.; KIMATI, H. Isolamento, crescimento e esporulação de *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walker e Larson. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 5, Piracicaba, 1982. Resumos... Piracicaba: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1982. p. 52-53.
- CAMARGO, M.; KIMATI, H. Influência do meio de cultura, luminosidade e sobreposição de papel de filtro na reprodução de *Pyrenochaeta terrestris*. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 17, n.3/4, p. 201-206, mar./abr. 1991.

- COCHRANE, V.W. *Physiology of Fungi*. New York: John Wiley e Sons, Inc., 1958. 524p.
- HAHN, G.G. Life-history studies of species of *Phomopsis* occurring on conifers. PART I. Transactions of the British Mycological Society, Great Britain, v.15, n.1, p.32-93, Jan. 1930.
- KIMATI, H. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (ces.) Wils. (Sensu Arx, 1957). Piracicaba: ESALQ, 1975. 103 p. (Tese - Livre Docência).
- LEONIAN, L.H. A study of factors promoting pycnidium-formation in some Sphaeropsidales. *American Journal of Botany*, Cambridge, v.2, n. 1, p.19-50, Jan. 1924.
- LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. *Physiology of Fungi*. New York: McGraw-Hill Book Co., 1951. 464p.
- LUKENS, R.J. Photoinhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal of Botany*, Cambridge, v.50, n.1/6, p. 720-724, Jan./June 1963.
- STRANDBERG, J.O. Isolation, storage and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.6/12, p.1008-10012, July/Dec. 1987.
- SUTTON, B.C. *The coelomycetes: Fungi Imperfect with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Kew Surrey: Commonwealth Mycology Institute, 1980. 696p.
- TRIONE, E.J.; LEACH, C.M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. *Phytopathology*, St. Paul, v. 59, n.6/12, p.1077-1083, July/Dec. 1969.
- TRIONE, E.J.; LEACH, C.M.; MUTCH, J.J. Sporogenic substances isolated from fungi. *Nature*, London, v.212, n.1/6, p.163-164, Jan./June 1966.

VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS DE *Phomopsis* E *Phoma* EM  
DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES  
DE TEMPERATURA E LUMINOSIDADE.\*

Regina M. Sartori Corrêa<sup>1</sup>, Hilário A. de Castro<sup>1</sup> e Maria Menezes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UFLA, Departamento de Fitossanidade, Caixa Postal 37, 37200-000,  
Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup> UFRPE, Departamento de Agronomia, Área de fitossanidade, R. D.  
Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

\* Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

RESUMO

Foi avaliada a variabilidade fenotípica de isolados de *Phomopsis* e *Phoma* em cinco meios de cultura, duas temperaturas (21 e 25°C) e três padrões de luminosidade (12h claro/12 h escuro, claro contínuo e escuro contínuo). Houve variação no tamanho de picnídios e conídios nos diferentes meios de cultura, temperatura e luminosidade. No entanto, a variação foi menor quando foi estudado a influência da temperatura e luminosidade. A diversidade fenotípica que ocorreu nos

diferentes meios de cultura foi grande, podendo, em alguns meios, impossibilitar a classificação adequada dos isolados.

Palavras-chave: *Phomopsis*, *Phoma*, reprodução, meios de cultura, temperatura, luminosidade

#### ABSTRACT

CORRÊA, R.M.S.; CASTRO, H.A.; MENEZES, M. Morphological variations of *Phomopsis* e *Phoma* on different culture media and temperature and luminosity conditions.

The phenotypical diversity of *Phomopsis* and *Phoma* was evaluated on five culture media, two temperatures (21°C e 25°C) and three light regimes (12 h dark/12 h light, continuous dark and continuous light). The variability in perithecial and conidial size was higher when the fungi were grown on different culture media compared with fungi growth of the under different temperature and luminosity conditions. The high diversity observed made difficult the classification of the isolate of both genera *Phomopsis* and *Phoma*.

#### INTRODUÇÃO

Em 1905, Saccardo, classificou os isolados fúngicos que tinham por característica produzir dois tipos de conídios, alfa e beta, antes classificados como *Phoma*, em um novo gênero, *Phomopsis* (Hahn, 1930). Logo depois, Diedicke (1911) definiu a posição deste gênero

descrevendo seus caracteres morfológicos em meio de cultura . Grove, em 1917, citado por Hahn (1930), considerou como principal diferença entre *Phomopsis* e *Phoma* a presença, no primeiro gênero do chamado esporo *B* que aparentemente pode ser considerado como um corpo não-funcional por ter resistido a todos os métodos comuns usualmente empregados para induzir a germinação.

Para identificação de gêneros como *Phoma* considera-se obrigatório o seu isolamento e cultivo em meio de cultura artificial (Sutton, 1980).

Alguns autores descrevendo fungos do gênero *Phoma* utilizaram o meio de Oatmeal ágar (OA) para estimular a produção de picnídios e conídios e o meio de Malt ágar (MA) para observar os caracteres culturais (Boerema e Howeler, 1967; Dorenbosch, 1970; Boerema e Dorenbosch, 1973; Boerema, 1976). Entretanto, (Boerema, 1964) descrevendo espécies do gênero *Phoma* utilizou o meio Batata dextrose ágar (BDA) e Milho ágar para observar seus caracteres culturais.

Descrições de espécies fúngicas de *Phomopsis* têm sido realizada tanto em meio BDA (Early e Punithalingam, 1972; Punithalingam, 1975; Sankaram, Florence e Sharma, 1987) quanto em meio OA (Punithalingam 1973 e 1974).

As mesmas descrições são normalmente realizadas sob regime de 12 h claro/ 12 h escuro, variando a temperatura entre 20-22°C (Dorenbosch, 1970) e 25°C (Sutton, 1980).

O principal critério da identificação de espécies destes gêneros baseia-se em aspectos morfológicos de picnídio e conídios, e nos caracteres culturais.

Archer (1926), estudando o gênero *Phomopsis* observou que o substrato e umidade podem alterar o diâmetro e forma de picnídios.

Devido a variação das condições de cultivo, principalmente do gênero *Phomopsis*, em trabalhos que objetivam a descrição e identificação de novas espécies, este trabalho objetivou estudar a variação dos aspectos morfológicos e caracteres culturais de isolados de *Phomopsis* e *Phoma* cultivados sob diferentes condições de cultivo, no intuito de fazer uma discussão sobre sua classificação taxonômica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados utilizados neste trabalho foram obtidos de sementes de ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*), sendo 11 pertencentes ao gênero *Phomopsis* (P2, P4, P6, P7, P8, P10, P12, P13, P14, P15 e P16) e um ao gênero *Phoma* (P1); de sementes jacarandá da bahia (*Dalbergia nigra*), três do gênero *Phomopsis* (P3, P5 e P9); e de sementes de tachi branco (*Triplaris surinamensis*), um isolado de *Phoma glomerata* (P11).

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Meio Malt-ágar (MA: Extrato de Malte - 20 g, Ágar - 20 g, Dextrose - 20 g, Peptona - 1 g, Água destilada q.s.p.- 1000 ml); Meio Oatmeal-ágar (OA: Aveia - 20 g, Ágar - 18 g, Solução de nutrientes contendo 0.1 g de  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0.1 g de  $MnSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0.1 g de  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  em 100 ml de água destilada - 1 ml, Água destilada q.s.p. - 1000 ml); Meio Batata-dextrose-ágar (BDA: Batata - 200 g, Dextrose - 20 g, Ágar - 20g, Água destilada q.s.p.- 1000 ml); Meio Cenoura-ágar (CA: Cenoura - 20 g,

Dextrose - 20 g, Ágar - 20 g, Peptona - 1 g, Água destilada q.s.p.- 1000 ml) e Meio Suco de hortaliças-ágar (SHA: Ágar - 20 g, Dextrose - 20 g, Peptona - 1 g, Suco de 20 g de berinjela, 10 g de tomate, 10 g de alface, 20 g de couve, 20g de repolho, 20 g de beterraba - 100 ml, Água destilada q.s.p.- 1000 ml).

O estudo dos isolados sob duas diferente temperaturas ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e três regimes de luminosidade, sob lâmpadas fluorescentes Sylvânia distanciadas verticalmente 40 cm das placas de Petri (escuro contínuo, alternância luminosa e claro contínuo), foi realizado em meio de cultura OA, dado que neste meio, de acordo com experimento anterior, os isolados estudados apresentaram maior uniformidade na morfologia.

O plaqueamento foi realizado através de suspensão de conídios. A suspensão foi preparada esmagando-se os picnídios obtidos de cultura de 20 dias de idade, cultivadas em meio BDA, em tubos de ensaio com água destilada e esterilizada. Às placas foram adicionados 0,3 ml da suspensão de esporos que foi uniformemente distribuída pela superfície do meio de cultura com o auxílio de uma espátula de Drigalsky. Os isolados P1 e P11 de *Phoma* foram repicados através de disco micelial, dado que não houve formação de picnídios.

A avaliação foi realizada após 12 dias de incubação através da medição do diâmetro dos picnídios (6 picnídios/placa), comprimento e largura dos conídios alfas (50 conídios alfa/tratamento), e comprimento dos conídios beta (20 conídios beta/tratamento) e da observação dos caracteres culturais.

Cada tratamento constou de cinco repetições. Para a medição dos picnídios foram retirados 6 picnídios, ao acaso, de cada repetição,

para obtenção do tamanho médio de picnídios, por isolado, em cada tratamento. A obtenção do tamanho médio dos conídios de cada isolado foi feita uma mistura das suspensões obtidas de cada repetição, de onde foram mensurados 50 conídios alfa e 20 conídios beta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram grande variação fenotípica dos isolados quanto aos caracteres culturais e tamanho de conídios e picnídios quando cultivados nos diferentes meios de cultura.

Os isolados P2, P4, P6, P7, P9, P10, P12, P13, P14, P15, P16 e P8, de *Phomopsis*, apresentaram forte pigmentação, de coloração rosa a vermelho, em meio BDA. Esta pigmentação permaneceu no meio MA com coloração lilás, tendo tido menor intensidade e frequência nos meios CA, OA e SHA. Provavelmente a coloração se apresenta mais intensa em isolados cultivados em meio BDA devido a composição deste ser mais complexa que a dos demais, possuindo maior quantidade de substrato natural, na ordem de 200 g de batata/ l de meio, dez vezes mais de substrato natural que os demais meios. Em considerando a pigmentação do meio, a variação e tamanho médio dos conídios alfa e as características de crescimento e coloração da colônia (Tabela 1), estes isolados se apresentaram semelhantes à descrição feita por Boerema, Dorenbosh e Kesteren (1965) para isolados de *Phoma herbarum*. O impasse para classificá-los nesta espécie é devido a formação de conídios beta em nove destes isolados, excetuando P9 e P10, quando cultivados nos diferentes meios utilizados. No entanto, observa-se que apenas três isolados (P7,

TABELA 1. Grupos de isolados separados de acordo com caracteres morfológicos e culturais.

GRUPO	ISOLADOS	MEDIÇÕES EM OA*			MEDIÇÕES EM BDA			CARACTERÍSTICAS CULTURAIS
		ALFA	BETA	PICNÍDIO	ALFA	BETA	PICNÍDIO	
I	P1	(6.8 X 2.0)	ausente	(164)	(5.6 X 1.3)	ausente	(193)	colônia flocosa, branca, com bordos uniformes sem pigmentação (OA, BDA, CA, MA, SHA)
II	P2	(6.8-8.3 X 1.7-4.3)	(20-21.5)	(340-560)	(6-8 X 1-3)	(14-23)	(320-700)	colônia não flocosa, branca a rosada, com bordos uniformes, com pigmentação rosa a vermelho em BDA e lilás em MA.
	P4							
	P6							
	P7							
	P10							
	P12							
	P13							
	P14							
	P15							
	P16							
	P8							
III	P3	(6.8-7.5 X 1.7-1.8)	ausente	(49-360)	(6-7.5 X 1.2-2)	(24-25)	(319-430)	colônia não cotonosa, branca, com bordos estriados, sem pigmentação (BDA, MA)
	P5							
	P9							
IV	P11	(4 X 2.4)	ausente	(163)	(3.5 X 2)	ausente	(247)	colônia não cotonosa, cinza, presença abundante de picnídios em OA e BDA, presença de dictioclamidosporos em cadeia.

\* medidas em micrômetro; conídio alfa - comprimento X largura; conídio beta - comprimento; picnídio - diâmetro

P14 e P16) apresentaram formação de conídios beta no meio OA, utilizado por Boerema, Dorenbosh e Kesteren (1965) em sua descrição. Diante disto, sugere-se que os isolados estudados são da mesma espécie tratada neste trabalho, sendo necessário a realização de estudos mais minuciosos que, talvez, possam futuramente classificar estes isolados como *Phomopsis herbarum*. Os demais isolados não apresentaram pigmentação nos meios.

Em relação ao tamanho de conídios observa-se que a variação foi bem menor no meio de cultura OA que nos demais (Tabela 2). O meio BDA, apesar de ter maior variação, manteve a média de tamanho dos conídios próxima às médias obtidas na avaliação no meio OA.

O meio MA na maioria dos isolados foi semelhante ao meio OA, no entanto, alterou a média do isolado P11 (*Phoma*) de 4 micrômetro para 7.8 micrômetro. Esta alteração mostra que este meio não seria adequado para o uso na sua identificação, uma vez que a classificação deste gênero também baseia-se em uma escala de dimensões com uma variação muito pequena. Os meios CA e SHA apresentaram grande variação nos tamanhos dos conídios em todos os isolados, sendo portanto inadequados à identificação dos mesmos.

Considerando os caracteres culturais e tamanho dos conídios, assim como a característica formação de dictioclamidosporos em cadeia, apresentada pelo isolado P11, pode-se concluir, em acordo com descrição feita por Boerema, Dorenbosh e Kesteren (1965), que o mesmo se trata da espécie *Phoma glomerata* (Cda.) Wr. e Hochapf (*Z. Parasitkunde*, v.8, p.592-594, fig. 15a, b. 1936).

O tamanho dos conídios beta foi uniforme e semelhante nos

TABELA 2. Efeito de diferentes meios de cultura no tamanho de picnídios e conídios de isolados de *Phomopsis* e *Phoma* aos 12 dias de incubação.

ISOLADO	CONÍDIO ALFA <sup>1</sup> (µm)						CONÍDIO BETA <sup>2</sup> (µm)			PICNÍDIO <sup>3</sup> (µm)		
	COMPRIMENTO			LARGURA			COMPRIMENTO			DIÂMETRO		
	menor	média	maior	menor	média	maior	menor	média	maior	menor	média	maior
<b>Melo OA</b>												
P1	5,35	6,68	9,64	1,78	1,79	2,14	-	-	-	35,72	163,83	267,90
P2	5,71	7,77	10,00	1,43	1,77	2,14	-	-	-	285,76	550,68	857,28
P3	5,35	7,55	9,64	1,43	1,78	2,14	-	-	-	89,30	358,98	625,10
P4	5,35	7,17	9,64	1,43	1,81	2,14	-	-	-	73,23	358,96	909,07
P5	5,35	6,90	11,42	1,43	1,77	1,14	-	-	-	28,56	49,27	100,00
P6	5,71	7,78	9,64	1,43	2,08	2,50	-	-	-	107,16	512,58	893,00
P7	4,28	6,84	10,00	1,43	2,41	3,57	10,00	21,42	33,91	130,38	353,21	855,49
P8	5,71	7,78	9,64	1,43	1,67	1,78	-	-	-	71,44	311,95	535,80
P9	4,64	7,30	8,92	1,60	1,80	2,14	-	-	-	71,44	272,36	535,80
P10	5,35	7,40	9,64	1,43	1,83	2,14	-	-	-	125,02	561,40	2143,20
P11	2,67	4,05	5,87	1,43	2,16	2,50	-	-	-	35,72	163,72	357,20
P12	5,35	6,78	7,85	1,78	1,96	2,50	-	-	-	178,60	399,77	689,40
P13	4,28	7,62	10,00	1,78	2,11	2,86	-	-	-	201,82	476,21	919,79
P14	5,35	7,51	8,92	1,78	2,03	4,28	10,00	20,85	41,05	142,88	345,20	759,05
P15	5,35	8,36	10,71	1,43	1,77	1,78	-	-	-	89,30	354,82	678,68
P16	6,43	7,60	10,71	1,43	1,85	2,14	13,57	20,50	26,06	178,60	511,09	893,00
<b>Melo MA</b>												
P1	3,57	6,34	9,64	0,71	1,08	1,79	-	-	-	53,58	130,79	232,18
P2	5,35	7,44	10,71	1,43	1,78	1,96	-	-	-	267,90	596,52	1035,88
P3	5,35	7,37	9,64	1,61	1,85	2,14	-	-	-	125,02	429,25	893,00
P4	4,28	6,28	7,85	1,07	1,32	2,14	-	-	-	132,16	227,71	332,20
P5	3,93	5,96	7,65	1,07	1,55	2,14	-	-	-	35,72	211,10	571,52
P6	4,28	6,18	7,50	1,07	1,45	2,14	12,85	19,81	31,42	250,04	577,37	1071,60
P7	5,00	7,15	9,64	1,07	1,89	2,86	10,35	19,10	28,20	21,43	236,11	610,81
P8	6,43	7,94	10,35	1,78	2,14	3,03	-	-	-	250,04	371,49	678,68
P9	4,28	7,00	9,64	1,78	2,16	2,50	-	-	-	142,88	334,58	678,68
P10	4,28	5,99	7,14	1,07	1,44	2,14	-	-	-	125,02	508,71	1607,40
P11	3,20	7,85	10,68	1,78	2,14	3,03	-	-	-	28,56	124,00	214,20
P12	4,28	7,07	8,92	1,07	1,23	1,78	7,14	20,04	28,56	85,73	172,85	310,76
P13	6,43	7,55	10,71	1,42	1,77	1,96	-	-	-	178,60	377,44	714,40
P14	4,28	6,63	12,50	1,07	1,60	2,86	14,28	18,87	24,28	35,72	231,58	426,85
P15	6,43	7,55	10,71	1,42	1,77	1,96	-	-	-	178,60	377,44	714,40
P16	7,50	9,11	11,42	1,07	1,51	2,86	-	-	-	107,16	420,98	1339,50
<b>Melo BDA</b>												
P1	3,57	5,59	7,50	1,07	1,32	1,43	-	-	-	35,72	193,17	535,80
P2	6,43	8,08	10,71	1,43	1,86	2,14	12,50	18,02	26,42	321,48	579,26	1071,60
P3	6,43	8,52	13,21	1,43	1,76	2,14	-	-	-	214,32	430,43	767,98
P4	4,28	5,98	7,85	1,07	1,26	2,14	-	-	-	117,88	331,36	1094,82
P5	4,28	6,91	8,92	1,07	1,18	1,78	7,85	24,15	63,20	35,72	319,28	517,52
P6	4,28	6,97	7,85	1,71	1,50	2,14	11,42	17,38	24,99	250,04	680,47	1250,20
P7	0,57	6,94	8,92	1,42	1,18	1,78	10,71	22,37	42,13	51,79	341,93	809,06
P8	5,71	7,57	9,64	1,25	1,79	2,14	-	-	-	98,23	322,37	982,30
P9	4,28	7,44	10,71	1,78	1,86	2,14	-	-	-	89,30	363,75	857,28
P10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71,44	247,06	464,36
P11	2,67	5,34	3,64	1,42	2,04	2,85	-	-	-	142,80	391,32	999,60
P12	4,28	6,91	8,21	1,07	1,24	1,78	12,49	20,51	44,27	112,52	335,98	914,43
P13	4,28	6,23	7,85	0,89	1,32	1,78	9,28	19,07	45,34	178,60	452,45	910,86
P14	4,28	7,20	10,00	1,43	3,07	4,82	12,14	22,98	39,98	92,87	306,45	1393,08
P15	6,43	7,51	9,28	1,43	1,88	2,50	14,28	20,35	25,70	160,74	344,70	714,40
P16	3,57	6,44	7,85	1,07	1,34	1,78	8,57	13,89	32,13	142,88	539,37	1428,80

Continua...

1 Valores de 50 conídios obtidos de 5 placas

2 Valores de 30 conídios obtidos de 5 placas

3 Valores de 30 picnídios obtidos de 5 placas

TABELA 2. Cont.

ISOLADO	CONÍDIO ALFA <sup>1</sup> (µm)						CONÍDIO BETA <sup>2</sup> (µm)			PICNÍDIO <sup>3</sup> (µm)		
	COMPRIMENTO			LARGURA			COMPRIMENTO			DIÂMETRO		
	menor	média	maior	menor	média	maior	menor	média	maior	menor	média	maior
<b>Melo CA</b>												
P1	4,28	5,62	7,14	1,07	1,34	1,78	-	-	-	41,08	192,40	535,80
P2	5,35	7,12	8,21	1,43	1,83	2,14	-	-	-	142,88	458,40	714,40
P3	4,28	7,45	10,71	1,43	1,82	2,14	-	-	-	142,88	382,20	893,00
P4	5,35	6,38	7,14	1,07	1,36	1,78	13,57	20,80	27,13	82,16	254,74	535,80
P5	5,35	7,37	10,35	0,21	1,68	2,50	11,78	20,36	26,06	48,22	207,29	625,10
P6	3,38	6,75	10,68	1,07	1,71	2,50	-	-	-	107,16	538,78	1250,20
P7	3,93	7,32	9,64	0,36	2,09	3,93	7,14	21,36	28,92	178,60	402,23	912,65
P8	5,35	7,35	10,00	1,43	1,78	2,14	-	-	-	142,88	297,07	625,10
P9	5,35	7,44	10,71	1,78	1,91	2,14	-	-	-	71,44	297,67	446,50
P10	3,57	6,69	9,64	0,89	1,26	1,78	-	-	-	214,32	558,42	1125,18
P11	3,56	8,45	10,68	1,78	2,14	2,49	-	-	-	71,40	164,70	406,98
P12	3,57	6,85	8,57	1,07	1,42	2,50	7,14	18,01	44,62	217,89	487,99	1273,42
P13	4,45	6,13	8,90	1,07	1,61	2,14	-	-	-	142,88	464,95	893,00
P14	3,57	7,30	9,64	1,07	1,41	2,14	13,21	19,37	25,35	91,09	307,73	825,13
P15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	89,30	327,43	660,82
P16	5,35	7,17	10,00	1,07	1,31	2,50	14,64	23,65	36,77	107,16	460,49	1428,80
<b>Melo SHA</b>												
P1	4,28	5,80	7,85	1,07	1,26	1,78	-	-	-	50,01	162,54	553,66
P2	5,35	7,83	10,71	1,43	1,76	1,96	12,49	18,86	29,99	107,16	491,15	750,12
P3	5,71	8,17	9,64	1,60	1,78	2,14	-	-	-	142,88	404,23	714,40
P4	4,28	6,91	10,35	1,07	1,29	2,50	13,92	20,15	25,35	150,02	367,38	1257,34
P5	4,28	6,55	7,85	1,07	1,46	2,14	-	-	-	142,88	254,44	535,80
P6	5,35	6,90	8,92	1,07	1,40	1,78	12,14	20,17	28,92	178,60	639,39	1160,90
P7	4,64	7,19	13,57	1,07	1,90	2,86	7,14	20,70	28,56	144,67	416,38	1287,71
P8	5,35	7,83	13,21	1,25	1,79	2,14	13,21	20,87	30,00	142,88	368,51	928,72
P9	4,28	7,11	9,64	1,43	1,87	2,50	-	-	-	142,88	287,55	464,36
P10	4,28	6,42	8,21	0,71	1,24	2,14	-	-	-	232,18	503,06	803,70
P11	3,20	6,10	10,68	1,78	2,02	2,49	-	-	-	-	-	-
P12	4,28	7,40	10,35	1,07	1,85	2,85	10,71	18,80	31,42	73,23	416,26	1428,80
P13	4,98	6,57	8,90	0,89	1,63	2,14	-	-	-	137,52	537,35	1250,20
P14	5,71	6,83	8,21	1,07	1,52	2,14	13,56	15,51	26,06	42,86	266,80	1176,97
P15	6,43	8,08	10,71	1,43	1,79	2,50	-	-	-	107,16	413,76	964,44
P16	5,35	7,85	13,21	1,25	1,79	2,14	-	-	-	89,30	533,42	1428,80

1 Valores de 50 conídios obtidos de 5 placas

2 Valores de 30 conídios obtidos de 5 placas

3 Valores de 30 picnídios obtidos de 5 placas

meios OA, MA, CA e SHA, tendo apresentado grande variação no meio BDA.

Os isolados do gênero *Phoma* (P1 e P11) apresentaram o tamanho dos picnídios uniforme em todos os meios de cultura, enquanto que nos isolados de *Phomopsis* a variação foi grande independente do meio utilizado.

Em geral, a variação de temperatura e regime de luz utilizados não afetou o tamanho dos conídios, tendo apenas o isolado de *Phoma glomerata* (P11) apresentado grande variação no tamanho de seus conídios (Tabela 3) no regime claro contínuo, à temperatura média de 25°C, quando apresentou conídios duas vezes maiores que a média da espécie. O tamanho de conídios a 21°C, no regime claro contínuo, e a 25°C, no regime de alternância luminosa, foram semelhantes.

Considerando o tamanho de picnídios todos isolados, exceto o isolado P2, não apresentaram grande variação de diâmetro nas condições de temperatura e luminosidade estudadas. O isolado P2 apresentou picnídios de diâmetro menor quando submetido à temperatura de 21°C no regime de claro contínuo (Tabela 4).

TABELA 3 - Efeito da temperatura de 21 oC e diferentes condições luminosidade no tamanho de picnídios e conídios alfa de *Phomopsis* e *Phoma*, em meio de aveia-ágar, aos 12 dias de incubação

ISOLADO	Conídio Alfa ( $\mu\text{m}$ )						Picnídio ( $\mu\text{m}$ )		
	Comprimento			Largura			Diâmetro		
	Mínimo	Médio	Máximo	Mínimo	Médio	Máximo	Mínimo	Médio	Máximo
Claro Contínuo									
P1	4,28	5,88	7,85	1,43	1,71	1,78	71,44	136,18	267,90
P2	6,75	7,51	8,25	1,50	1,86	1,87	178,60	274,60	428,64
P3	6,43	6,89	7,85	1,43	1,68	1,78	89,30	289,48	625,10
P4	4,28	6,52	7,85	1,61	1,78	1,78	71,44	229,20	464,36
P5	4,28	5,95	8,92	1,43	1,78	1,96	160,74	255,25	446,50
P6	4,28	6,80	8,92	1,43	1,78	1,78	89,3	332,64	625,10
P7	5,35	6,69	8,92	1,43	1,79	1,96	168,60	373,20	678,68
P8	5,35	6,50	7,14	1,43	1,74	1,78	71,44	277,25	428,64
P9	5,71	6,41	7,14	1,43	1,66	1,78	71,44	199,44	428,64
P10	5,35	7,07	7,85	1,43	1,78	1,96	178,60	340,83	714,40
P11	2,86	3,57	4,28	1,61	1,69	1,78	35,72	71,06	125,02
P12	5,71	6,85	7,85	1,43	1,74	2,14	178,60	392,17	625,10
P13	5,71	6,85	7,85	1,43	1,75	1,96	107,16	287,24	585,80
P14	5,35	6,43	7,85	1,61	1,77	1,78	189,30	273,11	553,66
P15	5,71	6,43	7,14	1,61	1,74	1,78	178,60	331,90	607,24
P16	5,35	6,72	8,92	1,43	1,79	2,14	178,60	307,71	464,36
Alternância Luminosa									
P1	4,64	5,95	6,43	1,78	1,78	1,78	71,44	149,95	339,34
P2	4,50	6,78	8,25	1,50	1,81	2,06	232,18	517,19	1043,46
P3	5,35	6,58	7,85	1,61	1,78	1,78	89,30	346,78	785,84
P4	4,28	6,59	7,14	1,43	1,74	1,78	321,48	472,54	803,70
P5	4,28	6,15	7,14	1,78	1,78	1,78	160,74	302,87	535,80
P6	6,07	7,10	7,85	1,43	1,76	2,14	160,74	557,38	1071,60
P7	5,35	6,90	10,71	1,43	1,77	1,78	178,60	523,15	1071,60
P8	5,35	6,58	7,85	1,43	1,74	1,78	142,88	394,41	535,80
P9	5,35	6,14	7,14	1,43	1,73	2,14	125,02	244,83	375,06
P10	4,28	5,58	7,85	1,61	1,80	1,96	250,04	534,31	1000,16
P11	-	-	-	-	-	-	53,58	108,84	160,74
P12	5,35	6,90	7,85	1,43	1,71	1,78	178,60	506,03	982,30
P13	6,43	7,21	7,85	1,43	1,74	1,78	196,46	434,59	1071,60
P14	6,43	6,95	7,85	1,43	1,78	1,96	178,60	400,36	839,42
P15	5,71	6,84	7,85	1,43	1,73	1,78	232,18	564,19	1000,16
P16	5,35	6,95	8,92	1,25	1,65	1,96	142,88	438,31	1035,88
Escuro Contínuo									
P1	4,28	6,28	7,14	1,43	1,67	1,78	71,40	178,60	446,50
P2	6,75	7,58	9,37	1,87	1,87	1,87	142,88	498,59	1607,40
P3	5,35	7,02	8,92	1,43	1,58	1,78	178,60	343,80	607,24
P4	5,35	7,02	7,85	1,43	1,79	1,96	160,74	413,01	1060,90
P5	5,35	6,42	7,85	1,78	1,80	1,96	214,32	398,50	714,40

TABELA 3, Cont.

ISOLADO	Conídio Alfa ( $\mu\text{m}$ )						Picnidio ( $\mu\text{m}$ )		
	Comprimento			Largura			Diâmetro		
	Mínimo	Médio	Máximo	Mínimo	Médio	Máximo	Mínimo	Médio	Máximo
Escuro Contínuo									
P6	5,35	6,72	7,85	1,43	1,78	1,78	178,60	568,54	2500,40
P7	5,00	6,35	8,92	1,25	1,73	1,78	214,32	491,20	893,00
P8	5,71	7,00	7,14	1,43	1,60	1,78	303,60	553,66	1071,60
P9	5,71	6,48	7,85	1,43	1,78	1,96	214,32	375,80	607,24
P10	5,85	6,17	7,14	1,78	1,78	1,78	214,32	468,82	1250,20
P11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P12	4,28	5,16	7,14	1,07	1,68	1,78	250,04	535,80	1071,60
P13	6,43	6,90	7,50	1,43	1,78	1,78	250,04	538,03	1160,90
P14	5,71	6,98	7,85	1,25	1,71	1,78	232,18	414,13	893,00
P15	5,35	6,64	7,14	1,78	1,78	1,78	*	*	*
P16	4,28	6,17	7,85	1,43	1,79	2,14	142,88	408,55	893,00

TABELA 4 - Efeito da temperatura de 25 oC e diferentes condições luminosidade no tamanho de picnídios e conídios alfa de *Phomopsis* e *Phoma*, em meio de aveia-ágar, aos 12 dias de incubação

ISOLADO	Conídio Alfa ( $\mu\text{m}$ )						Picnídio ( $\mu\text{m}$ )		
	Comprimento			Largura			Diâmetro		
	Mínimo	Médio	Máximo	Mínimo	Médio	Máximo	Mínimo	Médio	Máximo
Claro Contínuo									
P1	4,28	6,20	7,14	1,43	1,59	1,78	53,58	129,48	267,90
P2	6,00	7,54	8,25	1,50	1,80	1,87	178,60	504,54	1428,80
P3	3,57	5,75	7,50	1,43	1,78	2,14	178,60	363,15	625,10
P4	5,71	6,71	7,85	1,61	1,78	1,96	232,18	474,03	803,70
P5	4,28	6,14	7,14	1,43	1,78	1,78	214,32	335,62	571,52
P6	5,71	6,84	7,85	1,43	1,74	1,78	214,32	521,29	1071,60
P7	4,28	6,30	7,14	1,78	1,78	1,78	178,60	489,66	1428,80
P8	5,35	6,50	7,85	1,78	1,80	1,96	178,60	372,83	857,28
P9	4,28	6,29	7,14	1,78	1,78	1,78	71,44	254,50	535,80
P10	5,71	6,98	7,85	1,43	1,78	2,14	214,32	535,05	1428,80
P11	5,71	6,35	7,14	1,07	1,48	1,78	17,86	88,63	151,81
P12	5,71	6,66	7,50	1,43	1,76	1,96	160,74	547,33	1285,92
P13	5,35	7,03	8,92	1,78	1,78	1,78	178,60	401,85	1125,18
P14	5,71	6,71	7,14	1,61	1,78	2,32	178,60	431,24	1250,20
P15	6,43	6,92	7,85	1,25	1,59	1,78	125,02	426,41	1146,62
P16	5,35	6,93	7,85	1,43	1,78	1,78	267,90	637,00	1875,30
Alternância Luminosa									
P1	4,28	6,52	7,14	1,43	1,65	1,78	71,44	130,23	214,32
P2	6,75	7,45	8,25	1,50	1,87	1,87	178,60	477,75	1035,88
P3	4,28	6,36	10,00	1,43	1,75	2,14	125,02	347,52	835,42
P4	5,71	6,62	7,14	1,43	1,77	1,78	178,60	365,38	1250,20
P5	4,43	6,46	7,85	1,43	1,73	1,96	214,32	325,57	571,52
P6	6,43	7,00	7,85	1,61	1,73	1,78	232,18	468,08	1071,60
P7	5,71	6,85	9,28	1,43	1,75	1,96	250,04	457,66	893,00
P8	4,28	6,30	7,85	1,43	1,75	1,78	214,32	404,08	893,00
P9	5,71	6,34	7,14	1,78	1,78	1,78	107,16	272,74	446,50
P10	5,35	6,68	7,85	1,43	1,78	1,78	116,09	475,52	1339,50
P11	2,14	3,75	7,14	1,07	1,54	1,78	17,86	75,16	125,20
P12	6,07	7,12	7,85	1,61	1,76	1,78	178,60	523,15	1107,32
P13	4,28	6,90	7,85	1,43	1,78	1,78	267,90	576,73	1071,60
P14	5,71	6,91	7,85	1,43	1,74	1,78	89,30	411,52	1143,04
P15	6,43	6,80	7,14	1,61	1,77	1,78	214,32	461,38	1071,60
P16	5,35	7,12	7,85	1,43	1,77	1,96	35,72	430,13	1035,88
Escuro Contínuo									
P1	4,28	5,96	7,85	1,43	1,56	1,78	178,60	270,13	464,36
P2	5,62	7,01	7,50	1,87	1,87	1,87	196,46	391,00	1250,20
P3	4,64	6,13	7,85	1,25	1,72	1,78	107,16	406,31	803,70
P4	5,35	6,47	7,14	1,43	1,71	1,78	178,60	404,83	1214,48
P5	6,45	7,85	5,71	1,43	1,78	2,14	232,18	414,50	1250,20

TABELA 4, Cont.

ISOLADO	Conídio Alfa ( $\mu\text{m}$ )						Picnídio ( $\mu\text{m}$ )		
	Comprimento			Largura			Diâmetro		
	Mínimo	Médio	Máximo	Mínimo	Médio	Máximo	Mínimo	Médio	Máximo
Escuro Contínuo									
P6	6,43	6,89	7,50	1,43	1,74	1,78	178,60	597,56	1250,20
P7	5,35	6,25	9,28	1,43	1,77	2,14	89,30	413,76	982,30
P8	4,28	6,00	7,85	1,43	1,72	1,78	160,74	424,17	1000,16
P9	5,35	6,79	6,85	1,43	1,74	1,78	160,74	314,78	714,40
P10	4,28	6,51	7,50	1,61	1,78	1,78	71,44	568,54	1160,90
P11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P12	5,71	6,24	7,14	1,43	1,74	1,96	89,30	532,08	1285,92
P13	5,35	6,68	7,50	1,43	1,76	1,78	250,04	477,75	1607,40
P14	4,28	6,36	7,14	1,25	1,74	1,78	267,90	428,64	1071,60
P15	5,71	6,85	7,85	1,43	1,74	1,78	107,16	454,68	1071,60
P16	5,35	7,14	8,93	1,43	1,78	1,96	178,60	459,91	1250,20

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCHER, W.A. Morphological characters of some Sphaeropsidales in cultura. *Annual Mycological*, v.24, n.1/12, p.1-18, Jan./Dec. 1926.
- BOEREMA, G.H. *Phoma herbarum* Westend., the type-species of form-genus *Phoma* Sacc. *Persoonia*, Leiden, v.3, n.1, p.9-16, Jan. 1964.
- BOEREMA, G.H. The *Phoma* species studied in culture by Dr. R.W.G. Dennis. *Transaction British Mycological Society*, Great Britain, v.67, n. 1/6, p.289-319, Jan./June. 1976.
- BOEREMA, G.H.; DORENBOSCH, M.M.J. The *Phoma* and *Ascochyta* species described by wollenweber and hochapfel in their study on fruit-rotting. *Studies in Mycology*, [S.l.], v.3, n.6, p.1-50, June. 1973.
- BOEREMA, G.H.; DORENBOSH, M.M.J.; VAN KESTEREN, H.A. Remarks on species of *Phoma* referred to *Peyronellaea*. *Persoonia*, Leiden, v.4, n.1, p.47-68, Jan. 1965.
- BOEREMA, G.H.; HOWELER, L.H. *Phoma exigua* Desm. and its varieties. *Persoonia*, Leiden, v.5, n.1, p.15-28, Jan. 1967.
- DIEDICKE, H. Die gatfung *Phomopsis*. *Annual Mycological*, [S.l.], v.9, n.1/12, p.8-13, Jan./dec. 1911.
- DORENBOSCH, M.M.J. Key to nine ubiquitous soil-borne *Phoma*-like fungi. *Persoonia*, Leiden, v.6, n.1, p.1-14, Jan. 1970.
- EARLY, M.P.; PUNITHALINGAM, E. *Phomopsis anacardii* sp. nov. on *Anacardium occidentale*. *Transactions British Mycological Society*, Great Britain, v. 59, n.1/6, p.345-347, Jan./June. 1972.
- HAHN, G.G. Life-history studies of species of *Phomopsis* occurring on conifers. PART I. *Transactions British Mycological Society*, Great Britain, v.15, n.1, p.32-93, Jan. 1930.
- PUNITHALINGAM, E. New species of *Phomopsis*. *Transactions British Mycological Society*, Great Britain, v. 63, n.1/6, p.229-236, Jan./June 1974.
- PUNITHALINGAM, E. Some new species and combinations in *Phomopsis*. *Transactions British Mycological Society*, Great Britain, v. 64, n.3, p.427-435, Mar. 1975.

- PUNITHALINGAM, E. Two new species of *Phomopsis*. Transactions British Mycological Society, Great Britain, v.60, n.1/6, p.157-160, Jan./June 1973.
- SANKARAM, E.; FLORENCE, J.M.; SHARMA, J.K. Two new *Phomopsis* from India. Transactions British Mycological Society, Great Britain, v. 89, n. 3, p.404-407, Mar. 1987.
- SUTTON, B.C. The coelomycetes: Fungi Imperfect with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Kew Surrey: Commonwealth Mycology Institute, 1980. 696p.

**CARACTERIZAÇÃO DE *Phomopsis* E *Phoma*  
OBTIDOS DE SEMENTES DE ESPÉCIES FLORESTAIS  
POR ESTERASE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.\***

Regina M. Sartori Corrêa<sup>1</sup>, Hilário A. de Castro<sup>1</sup> e Maria Menezes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UFLA, Departamento de Fitossanidade, Caixa Postal 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup> UFRPE, Departamento de Agronomia, Área de fitossanidade, R. D. Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

\* Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

**RESUMO**

Treze isolados de *Phomopsis* e um de *Phoma* foram inicialmente classificados de acordo com os caracteres culturais em três grupos. A detecção de esterase em gel de poliacrilamida confirmou o agrupamento dos isolados no Grupo II que apresentaram características de *Phoma herbarum*. No entanto, a maioria destes isolados formaram conídios do tipo beta, característico do gênero *Phomopsis*. Os espécimes deste grupo formaram duas bandas comuns, embora que, com intensidades

diferentes, enquanto os dos demais grupos não apresentaram padrão isoenzimático diferencial em esterase.

Palavras-chave: *Phomopsis*, *Phoma*, eletroforese, esterase.

## ABSTRACTS

CORRÊA, R.M.S.; CASTRO, H.A.; MENEZES, M. Characterization of *Phomopsis* and *Phoma* isolated from some forest species through esterase in acrylamide-gel electrophoresis.

Thirteen isolates of *Phomopsis* and one of *Phoma* were clustered according to culture and morphological characters in three groups. The detection of isoenzymatic pattern of esterase confirmed the cluster two, which had been based on morphological and cultural characteristics considered as *Phoma herbarum*. However, the majority of these isolate produced  $\beta$  spores which is characteristic of the genus *Phomopsis*. In that group, the isolates produced two common bands presenting the same relative migration distance in the electrophoresis gel. The other groups did not showed characteristics bands.

## INTRODUÇÃO

Os gêneros *Phoma* e *Phomopsis* são patógenos de sementes de diversas culturas agrônômicas, porém sua patogenicidade a sementes de espécies florestais têm recebido muito pouca atenção devido a dificuldade

de obtenção de lotes de sementes com uniformidade, principalmente considerando o índice de germinação.

Dentre os poucos trabalhos realizados, observa-se que apenas o trabalho realizado por Munjal e Sharma (1976) determinaram a espécie envolvida em danos causados apresentados em sementes de *Pinus roxbirugti* e *P. wallichina*. Observou-se neste trabalho que *Phoma hibernica* de pré-emergência em ambas espécies de *Pinus*.

Nos demais trabalhos somente o gênero é citado como agente de danos em sementes, provavelmente devido a dificuldade encontrada na classificação destes gêneros.

Sementes de *Acacia speciosa* avaliadas por Maschio, Maceda e Ramos (1990) quanto a associação de fungos, foram danificadas por *Phomopsis* spp., quando submetidas a tratamento com hipoclorito de sódio a 1% (70% de perdas) e água ionizada autoclavada (80% de perdas).

Martins (1991), detectou a patogenicidade de *Phomopsis* e *Phoma* a sementes de ipê amarelo, ipê roxo e barbatimão. Sales (1992), no entanto, verificou que *Phomopsis* sp. somente foi danoso à germinação de sementes de ipê amarelo desprovidas de tegumento e à sementes de barbatimão, não sendo patogênico a sementes de ipê roxo.

A escassez de trabalhos indicando a patogenicidade de *Phoma* e *Phomopsis* à sementes de espécies florestais, está relacionada, principalmente, à falta de identificação destes fungos ocorrendo em sementes. Muitas vezes isolados não patogênicos ou específicos a determinadas espécies são testados e, não promovendo doenças, são considerados como saprófitas.

Uma das técnicas que vêm auxiliando no trabalho de classificação de determinadas espécies baseia-se no nível de polimorfismo de vários espécimes fúngicos, inclusive a nível de raça, sendo a técnica de eletroforese utilizada por vários pesquisadores (Stipes, Emert e Brown,

1983; Alfenas, Jeng e Hubbes, 1984; Moreira e Alfenas, 1985; Hall, 1974).

A técnica de eletroforese, muitas vezes, é capaz de auxiliar a identificação de isolados fúngicos que são de difícil diagnóstico através dos métodos tradicionais que se baseiam na morfologia da cultura e em visualizações microscópicas, como tem se apresentado nos trabalhos envolvendo os gêneros *Phoma* e *Phomopsis*.

Devido a sua facilidade de execução esta técnica pode ser aplicada no estudo de marcadores na genética de microrganismos (Alfenas, *et al.* 1991).

Em trabalho realizado por Hassan *et al.* (1991) a análise eletroforética de isolados de *Phoma lingam* permitiu diferenciar isolados agressivos e não agressivos. Os padrões enzimáticos demonstraram que isolados agressivos têm elevados níveis de atividade para celulase, alfa e beta glucanase e poligalacturonase.

Apesar da constatação de Van Der Aa, Noordeloos e De Gruyter (1990) de que os caracteres culturais e morfológicos de *Phomopsis* são insuficientes para delimitação das centenas de espécies descritas, não são encontrados, na literatura, trabalhos relacionados com o estudo do polimorfismo do gênero *Phomopsis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *Phomopsis* e *Phoma* foram inicialmente classificados em grupos com base nos seus aspectos morfológicos e caracteres culturais (Tabela 1) e, posteriormente, caracterizados de acordo

com o padrão isoenzimático de esterase. Os isolados P1, P2, P4, P7, P8, P10, P12, P13, P14, P15 e P16 foram obtidos a partir de sementes de ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*); e os isolados P3, P5 e P9, de sementes de jacarandá da bahia (*Dalbergia nigra*). Utilizou-se um isolado de *Phomopsis* (V1) obtido de folhas de feijão para comparação da atividade de esterase.

Para detecção de esterase em gel de poliacrilamida os isolados foram, inicialmente, cultivados em meio BDA durante cinco dias. Após este período, discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram removidos da extremidade da colônia de cada isolado e transferidos, separadamente, para frascos de Erlenmeyer (150 ml), contendo 50 ml de BD. Em seguida à incubação, as amostras foram preparadas para obtenção do extrato. A massa micelial foi filtrada em papel Whatman n. 1, ajustado a um funil de Buchner e, posteriormente lavada com água destilada esterilizada. O excesso de umidade foi eliminado com auxílio de papel melita esterilizado. Após secagem do micélio, fez-se a pesagem de 2 mg, procedendo-se a maceração em almofariz, mantido em banho gelo, adicionando-se ao material 1 ml do tampão (Tris-glicina a 0,125 M, pH 8,2; 300 mg de PVC-polivinilpirrolidona; 10% de sacarose). Os extratos assim obtidos para cada isolado, foram mantidos a 4°C, durante 4 horas, sendo depois filtrados em gase dupla esterilizada. O filtrado foi mantido em freezer e depois submetido a análise eletroforética.

Para análise dos isolados, foi utilizada placa de gel poliacrilamida a 5%, assim preparada: a acrilamida e bis-acrilamida foram dissolvidas em solução tampão de tris-glicina a 0,125 M, pH 8,2, adicionando-se à mistura 0,1 ml de TEMED (Tetra-metildiamina) e 2,8 ml

TABELA 1. Grupos de isolados separados de acordo com caracteres morfológicos e culturais.

GRUPO ISOLADOS	MEDIÇÕES EM OA*		MEDIÇÕES EM BDA		CARACTERÍSTICAS CULTURAIS
	ALFA	BETA	ALFA	BETA	
I P1	(6.8 X 2.0)	ausente	(5.6 X 1.3)	ausente (193)	colônia flocosa, branca, com bordos uniformes sem pigmentação (OA, BDA, CA, MA, SHA)
II P2	(6.8-8.3 X 1.7-4.3)	(20-21.5)	(340-560)	(6-8 X 1-3) (14-23) (320-700)	colônia não flocosa, branca a rosada, com bordos uniformes, com pigmentação rosa a vermelho em BDA e lilás em MA.
P4					
P6					
P7					
P10					
P12					
P13					
P14					
P15					
P16					
P8					
III P3	(6.8-7.5 X 1.7-1.8)	ausente	(49-360)	(6-7.5 X 1.2-2) (24-25) (319-430)	colônia não cotonosa, branca, com bordos estriados, sem pigmentação (BDA, MA)
P5					
P9					

\* medidas em micrômetro; conídio alfa - comprimento X largura; conídio beta - comprimento; picnídio - diâmetro

de persulfato de amônia a 1%, cuidadosamente. Em seguida, com o auxílio de uma seringa, introduziu-se a mistura entre as placas, separadas por um espaçador de 2 mm de espessura. Após a polimerização do gel, o espaçador foi removido juntamente com a placa superior, ficando o gel na placa de vidro, a qual foi colocada numa cuba horizontal, contendo a mesma solução tampão. Como ponte de conexão, utilizou-se papel de filtro Whatman n. 3.

As amostras dos extratos dos isolados de *Phomopsis* e *Phoma* foram aplicadas individualmente em cada cavidade do gel, com auxílio de micropipetas, empregando-se 20 microlitros por cavidade do gel.

A corrida eletroforética foi realizada a 4°C, durante 4 horas, mantendo a corrente constante a 10 mA. Finalizando o período de corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da placa e imerso, durante uma hora, na solução corante de *fast red* RR, preparada com tampão fosfato a 0,1 (100 ml), pH 6,5, naftilacetato 1% (2 ml) e *fast red* RR (50 mg). Em seguida procedeu-se a fixação da cor com ácido acético a 7%.

Os géis foram preservados em papel celofane apropriado para eletroforese. A secagem ocorreu a temperatura ambiente (aproximadamente 28°C), no espaço de 2 a 3 dias.

Para interpretação tomou-se como base o número e posição das bandas formadas e a intensidade da cor, como auxílio na diferenciação enzimática dos isolados. Os valores da mobilidade relativa foram calculados pela fórmula:  $R_f = d/D \times 100$ , onde  $d$  é a distância percorrida pela molécula e  $D$ , a distância percorrida pela linha controle.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do zimograma pode-se observar que todos os isolados produziram uma banda comum próxima (B1). A distância de mobilidade relativa das bandas de esterase estão representadas na Tabela 2. Os isolados enquadrados no grupo dois apresentaram uma segunda banda em comum com Rf igual a 65% (Figura 1). Estas bandas variaram de intensidade. Esta variação é normalmente provocada por diferenças na atividade enzimática dos isolados, e podem estar influenciadas por fatores ambientais ou de cultivo. Estes mesmos fatores também podem promover a formação de bandas mais largas ou arraste (Alfenas, *et al.* 1991).

Os isolados do grupo I e III não foram classificados a nível de espécie, bem como a testemunha VI, sendo que apenas o isolado P1 (grupo I) não apresentou formação de conídio beta. Não houve para os mesmos uma atividade de esterase que pudesse diferenciá-los.

O grupo II representa os isolados cujos aspectos morfológicos e culturais se encontram de acordo com a descrição feita por Boerema (1964) para *Phoma herbarum* Westend. No entanto, neste grupo se encontram isolados, com exceção dos isolados P7, P14 e P16, que ocasionalmente apresentam formação de conídios beta, em meio de aveia-ágar. A formação de conídios beta é uma característica inerente ao gênero *Phomopsis*, sendo que, segundo Sutton (1980) e Hahn (1930), espécies deste gênero podem não apresentar a formação deste tipo de conídio. Diante da característica atividade de esterase apresentada por este grupo e considerando que no grupo se encontram isolados sem a característica formação de conídios beta, deduz-se que a classificação de *Phoma herbarum* precisa ser revista.

TABELA 2. Distância relativa de migração (Rf) das bandas de esterase de isolados de *Phomopsis* e *Phoma*.

P1	B1	47,5	P9	B1	42,5
P2	B1	47,5	P10	B1	47,5
	B2	65,0		B2	67,5
P3	B1	47,5	P12	B1	47,5
	B2	77,0		B2	65,0
P4	B1	47,5	P13	B1	47,5
	B2	65,0		B2	67,5
P5	B1	47,5	P14	B1	47,5
				B2	65,0
P7	B1	47,5	P15	B1	47,5
				B2	65,0
P8	B1	47,5	P16	B1	47,5
	B2	70,0		B2	65,0
V1	B1	40,0			

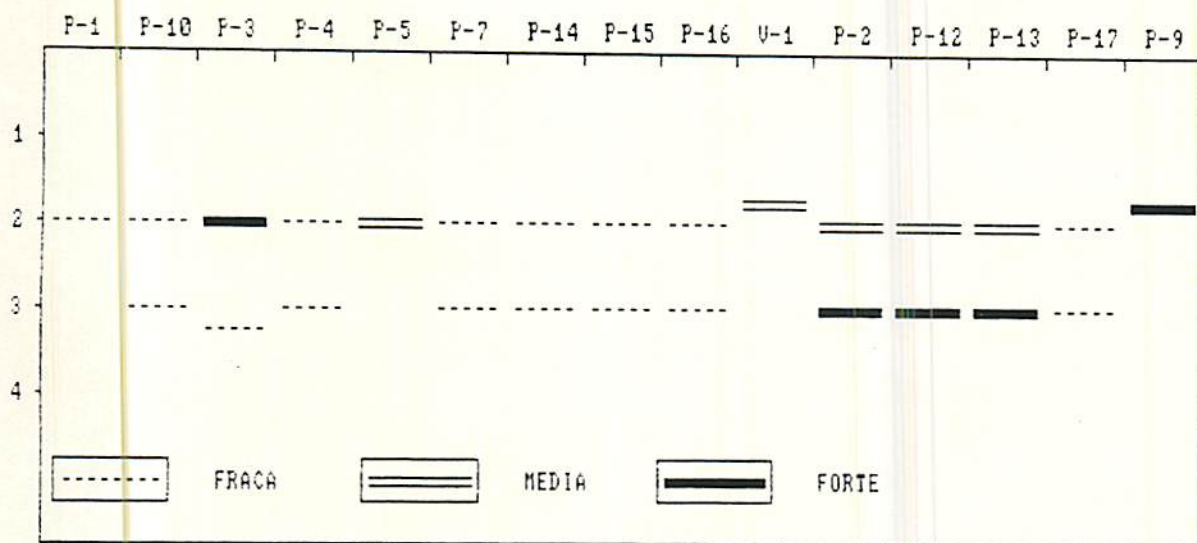


Figura 1. Zimograma de isolados de *Phomopsis* e *Phoma*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; JENG, R.; HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. *Canadian Journal of Botany*, Cambridge, v.62, n.6/12, p.1756-1762, Jun./Dec. 1984.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- BOEREMA, G.H. *Phoma herbarum* Westend., the type-species of form-genus *Phoma* Sacc. *Persoonia*, Leiden, v.3, n.1, p.9-16, Jan. 1964.
- HAHN, G.G. Life-history studies of species of *Phomopsis* occurring on conifers. PART I. *Transactions British Mycological Society*, Great Britain, v.15, n.1, p.32-93, Jan. 1930.
- HALL, R. Electrophoretic protein profiles as criteria in the taxonomy of fungus and algae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, Torrey, v.100, n.1/6, p.253-259, Jan./June 1974.
- HASSAN, A.K.; SCHULZ, C.; SACRISTAN, M.D.; WOSTEMEYER, J. Biochemical and molecular tools for the differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen, *Phoma lingam*. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.131, n.2, p.120-136, Feb. 1991.
- MARTINS, S.H. Aspectos fitossanitários e fisiológicos de sementes de barbatimão, ipê amarelo e ipê roxo de algumas localidades do Sul de Minas Gerais. Lavras: ESAL, 1991. 72p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- MASCHIO, L.M. de A.; MACEDA, A.; RAMOS, A. Fungos em sementes de espécies florestais com potencial agrossilvicultural no Paraná. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, Campos do Jordão, 1990. Anais... Campos do Jordão: IBDF, 1990. p. 555-563
- MOREIRA, A.M.; ALFENAS, A.C. Diferenciação de espécies de *Cylindrocladium* por meio da análise eletroforética de proteínas e isoenzimas em géis de poliacrilamida. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.10, n.3, p.258, jul./ago. 1985.
- MUNJAL, R.L.; SHARMA, A.D. Effect of seed mycoflora on pre and post-emergence seedling of some important conifers in the Himachal Pradesh. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, Udaipur, v.6, n.1, p.27-31, Jan. 1976.

- SALES, N. da L.P. Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê-amarelo, ipê-roxo e barbatimão. Lavras: ESAL. 1992. 89p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- STIPES, R.J.; EMERT, G.H.; BROWN, D.Jr. Differentiation of *Endothia gyrossa* and *Endothia parasitica* by disc electroforesis of intramycelial enzymes and proteins. *Mycology*, Bronx, v.74, n.1/6, p.138-141, Jan./June. 1983.
- SUTTON, B.C. The coelomycetes: Fungi Imperfect with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Kew Surrey: Commonwealth Mycology Institute, 1980. 696p.
- VAN DER AA, H.A.; NOORDELOOS, M.E.; De GRUYTER, J. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Studies in Mycology*, [S.l.], v.32, n.1, p.3-19, Jan. 1990.

PATOGENICIDADE DE *Phomopsis* e *Phoma* ASSOCIADOS A  
SEMENTES DE IPÊ (*Tabebuia serratifolia*) E ANGICO VERMELHO  
(*Anadenanthera perigrina*).\*

Regina M. Sartori Corrêa<sup>1</sup>, Hilário A. de Castro<sup>1</sup> e Maria Menezes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UFLA, Departamento de Fitossanidade, Caixa Postal 37, 37200-000,  
Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup> UFRPE, Departamento de Agronomia, Área de fitossanidade, R. D.  
Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

\* Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

## RESUMO

Foi realizado em casa de vegetação, em Lavras-MG, ensaios para avaliar a patogenicidade de quatorze isolados de *Phomopsis* e dois de *Phoma*, sendo um, *Phoma glomerata*, sobre sementes de ipê amarelo e angico vermelho. Houve diferença na patogenicidade dos diferentes isolados. Em ipê amarelo os isolados P12 e P10 de *Phomopsis* reduziram a germinação e o tamanho e peso das plantas aos 90 dias do plantio. Em angico, foi observado a ação patogênica dos isolados P10, P12, P16 e

*Phoma glomerata*, que reduziram a percentagem de germinação. Embora não diferindo estatisticamente, a inoculação de alguns isolados em sementes de ipê promoveu maior germinação.

Palavras-chaves: Patogenicidade, *Phomopsis*, *Phoma*, sementes, espécies florestais.

#### ABSTRACT

CORRÊA, R.M.S.; CASTRO, H.A.; MENEZES, M. Pathogenicity of *Phomopsis* and *Phoma* on *Tabebuia serratifolia* and *Anaderanthera perigrina* seeds.

The pathogenicity of fourteen isolates of *Phomopsis* and two isolates of *Phoma* to seeds of *T. serratifolia* and *A. perigrina* was evaluated under greenhouse conditions. The results showed variation between both groups of isolates and among isolates of each genus. Isolate P12 e P10 of *Phomopsis* decreased the germination, height and weight of *T. serratifolia*. Three isolates of *Phomopsis* (P10, P12, P16) and *Phoma glomerata* decreased the percentage of germination of seeds of *A. perigrina*. Some of the studied isolates were also able to increase seed germination of *T. serratifolia*.

## INTRODUÇÃO

Na área florestal pouco se estudou sobre a disseminação de patógenos via semente. No entanto, alguns trabalhos têm evidenciado a frequente contaminação fúngica, especialmente em espécies nativas (Ferreira, 1989). Entre estes microrganismos, encontrados associados as sementes, muitas espécies de fungos são causadoras de problemas em culturas agronômicas (Homechin, Pizziano e Menden, 1986). No Brasil, os poucos trabalhos existentes (Lasca, Sampaio e Cintra, 1972, 1978; Urban, Metzler e Cícero, 1982; Homechin, Pizziano e Menden, 1986; Fosco Mucci e Lasca, 1986; Carneiro, 1986, 1990) têm apenas relacionado os microrganismos que ocorrem nas sementes, sem verificar contudo, os seus efeitos sobre a germinação e desenvolvimento das plantas.

O primeiro trabalho de levantamento de fungos causadores de doenças associados à sementes de espécies florestais realizado no país, foi desenvolvido por Lasca, Sampaio e Cintra (1972) em sementes importadas de *Pinus* spp., no qual foi detectado vários fungos fitopatogênicos. Posteriormente, outros trabalhos realizados determinaram que diversos microrganismos, patogênicos ou não, incluindo os gêneros *Phoma* e *Phomopsis*, podem estar associados às sementes de espécies florestais, tendo sido observado que os fungos representam um grupo mais numeroso (Lasca et al., 1978; Urban, Metzler e Cícero, 1982; Homechin, Pizziano e Menden, 1986; Fosco Mucci e Lasca, 1986; Carneiro, 1986, 1987, Maschio, Maceda e Ramos, 1990; Sales, 1992). Nestes levantamentos muitos pesquisadores têm constatado a frequente associação de fungos do gênero *Phomopsis* e *Phoma* à sementes de espécies florestais.

Lasca et al. (1978) verificaram que sementes de *Pinus* sp. produzidas no Estado de São Paulo, quando submetidas à teste de sanidade, apresentavam-se infectadas com *Phoma* e *Phomopsis*, dentre outros gêneros de fungos.

Dentre os fungos observados em sementes de seringueira (*Hevea brasilienses*), diversos são patógenos deste hospedeiro, como é o caso de *Phomopsis heveae* (Petch) Boedijn. isolado a partir de amostras de sementes procedentes dos Estados do Pará e Bahia, no período de janeiro a junho de 1981, por Urben, Metzler e Cícero (1982).

Homechin, Pizziano e Menden (1986) conduziram estudos sobre a sanidade de sementes de *Pinus elliotti* var. *elliotti* e *Pinus taeda* e constataram a presença de *Phoma* sp.

No mesmo ano, diante da escassez de informações sobre a sanidade de sementes das espécies florestais nativas, Fosco Mucci e Lasca (1986), iniciaram um levantamento de fungos associados às sementes de algumas espécies colhidas pelo Instituto Florestal de São Paulo. Dentre os fungos observados pelos autores, diversos são patógenos de plantas cultivadas, incluindo os gêneros *Phomopsis* e *Phoma* que estavam associados à sementes de *Cassia leptophylla* Vog. (*Cassia leptophylla*), *Cedrela sissilis* Cell (Cedro rosa), *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert (Canaféstula), *Tabebuia* sp. (ipê branco), *Myrcoxylon balsamum* (L) Harms (cabruíva vermelha) *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Bressan (angico-vermelho), *Dalbergia nigra* (Vall) Fr. All. (Jacarandá da Bahia) e *Cassia ferruginea* Schrod (*Cassia ferruginia*).

Carneiro (1986), estudou a população fúngica associada a 18 gêneros e/ou espécies florestais provenientes dos Estados do Amazonas, Pará, Distrito Federal, Espírito Santo e Santa Catarina. Neste trabalho,

destacaram-se os gêneros *Phoma* e *Phomopsis*, encontrados em associação às sementes estudadas, considerando-os patogênicos a estas espécies.

Sementes de *Acacia speciosa* estudadas por Maschio, Maceda e Ramos (1990) apresentaram-se em associação com *Phomopsis* spp., dentre outros gêneros fúngicos.

Em estudo da qualidade sanitária de espécies florestais em Paraopeba-MG, Carneiro (1990) verificou a presença de *Phoma* sp. em ipê e pau-de-santo, na proporção de 8/400 sementes e 10/400 sementes, respectivamente. De acordo com Martins (1991), dentre os gêneros mais comuns encontrados em sementes de diversas espécies florestais, provenientes do Sul de Minas Gerais, encontram-se *Phoma* e *Phomopsis*.

Devido a frequente associação destes patógenos à sementes de espécies florestais este trabalho objetivou verificar se diferentes isolados de *Phomopsis* e um de *Phoma* exerce algum efeito sobre a germinação e desenvolvimento de ipê amarelo e angico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatorze isolados de *Phomopsis* e dois de *Phoma*, sendo onze isolados de *Phomopsis* provenientes de sementes de ipê amarelo, *Tabebuia serratifolia*, (P2, P4, P6, P7, P8, P10, P12, P13, P14, P15 e P16); três isolados provenientes de jacarandá da bahia, *Dalbergia nigra*, (P3, P5 E P9), e dois isolados de *Phoma*, provenientes de ipê amarelo (P1) e Tachi-Branco, *Triplaris surinamensis*, (*P. glomerata*-P11). As sementes foram gentilmente fornecidas pelo Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Lavras.

Suspensões de esporos, obtidas de culturas puras dos isolados com 20 dias de idade, cultivados em meio de cultura OA, à temperatura de 25°C e sob regime de luminosidade 12 h CLARO/ 12 h ESCURO, foram ajustadas à concentrações de  $1 \times 10^5$  conídios/ml. A cada 100 ml da suspensão foi adicionada uma gota de espalhante adesivo, Tween 80.

As sementes sofreram uma desinfecção superficial, 24 horas antes da inoculação, com hipoclorito de sódio 1%, por 10 minutos, sendo posteriormente lavadas em água destilada e postas a secar em papel de filtro. As inoculações foram feitas mediante imersão das sementes nas suspensões por 60 minutos. As testemunhas foram imersas em água acrescida do mesmo espalhante adesivo.

Após a inoculação, as sementes foram postas para secar e, em seguida, semeadas em bandejas com solo esterilizado com brometo de metila (1 parte de argila para 3 partes de areia), que foram acondicionadas em casa de vegetação à temperatura ambiente.

A avaliação foi feita mediante contagem das plantas emergidas aos 60 dias da semeadura. Nas plantas de ipê amarelo foram determinadas a altura e peso da matéria seca aos 90 dias da semeadura.

O delineamento foi inteiramente casualizado constando de 17 tratamentos (14 isolados de *Phomopsis*, dois de *Phoma* e testemunha) e 2 parcelas. Cada parcela foi constituída de 15 sementes. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%. Para análise estatística os dados de percentagem de inibição da germinação foram transformados em  $\arcsin x^{1/2}$  substituindo-se o valor zero por  $1/4 n$ , onde  $n$  é igual ao número de indivíduos por parcela experimental.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados P12, P10, P4, P3, P6, P8, P5, P15, P9 e P13 de *Phomopsis* e P1, *Phoma* inibiram a germinação de ipê amarelo e angico. Apenas os isolados P12 e P10 foram diferentes ao nível de significância de 1%, quando comparados pelo teste de Tukey com a testemunha (Tabela 1).

A altura e peso das plantas de ipê amarelo, aos 90 dias do semeio, foram menores nas sementes inoculadas com P12, P10, P3, P5, P6, P16, P15 (*Phomopsis*), P1(*Phoma* sp.) e P11(*Phoma glomerata*). O isolado P12 foi o único a diferir da testemunha ao nível de 5% de significância. Os isolados, P4 e P8 diminuíram a altura de plantas, e P7 e P9, o peso. Apenas as sementes inoculadas com os isolados P14 e P13 apresentaram tamanho e peso iguais à testemunha (Tabela 3 e 4).

Houve variação quanto a patogenicidade dos isolados testados. Este resultado permite melhor avaliar as variações encontradas na literatura acerca da patogenicidade de *Phomopsis* e *Phoma*. Sales, em 1992, observou que um isolado de *Phomopsis* apenas foi patogênico quando inoculado em sementes de ipê amarelo sem tegumento, tendo, a autora, verificado que o isolado de *Phoma* favoreceu a germinação e desenvolvimento de ipê amarelo. Em outro trabalho, Martins (1991) estudou a patogenicidade de um isolado de *Phomopsis* e um de *Phoma*, considerando-os patogênicos à sementes com tegumento de ipê amarelo. Observando-se os resultados dos trabalhos mencionados com os apresentados neste trabalho, pode-se concluir que existe uma variação entre espécies ou intraespecífica com relação ao grau de patogenicidade de *Phomopsis* e *Phoma*. Com relação a *Phoma*, também houve variação nos resultados, somente o isolado P11 diminui o tamanho e peso de

plantas. De acordo os resultado obtidos nestes trabalhos pode-se deduzir que Sales (1992) e Martins (1991) divergem em seus resultados, provavelmente por se tratar de isolados diferentes.

No ensaio de inoculação em angico, notou-se que alguns isolados impediam a formação de plântulas, apodrecendo as sementes. No entanto, as plantas se apresentaram uniformes, por isso não foram avaliados os parâmetros de tamanho e peso da matéria seca. Todos os isolados, excepto P14, inibiram a germinação de sementes, sendo que somente o isolado P10 diferiu da testemunha ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 2).

De modo geral, ocorreu variação na redução de germinação entre os isolados e as espécies florestais inoculadas (Tabela 1 e 2). Os isolados P10 e P12 foram mais agressivos em ambas espécies, sendo que diferiram quanto a ordem de importância. P12 e P10 foram igualmente patogênicos quando inoculados em sementes de ipê, enquanto que, em angico, P10 foi mais agressivo. Esta variação de agressividade de isolados também foi encontrada por Sales (1992). Neste trabalho foi observado que um mesmo isolado de *Phomopsis* inoculado em sementes de ipê amarelo, ipê roxo e barbatimão, foi patogênico a barbatimão e à sementes de ipê desprovidas de tegumento, e não foi patogênico a ipê roxo. Por outro lado, a ação patogênica não específica como a de *Phomopsis* a ipê amarelo e angico também foi observada por Martins (1991), quando verificou que *Phomopsis* e *Phoma* foram igualmente patogênicos a sementes de ipê amarelo, ipê roxo e barbatimão, demonstrando mais uma vez que os isolados de *Phomopsis* e *Phoma* estudados por Martins (1991) diferem dos estudado por Sales (1992).

Tabela 1. Percentagem média de inibição de germinação de sementes de ipê amarelo e angico vermelho inoculadas com *Phomopsis* spp. e *Phoma* spp., aos 30 dias do plantio.

ISOLADO	IPÊ AMARELO*		ANGICO VERMELHO*	
	5%	1%	5%	1%
P12	54.8 a	A	67.7 ab	AB
P10	54.8 a	A	77.4 a	A
P4	42.4 ab	AB	28.2 abcd	AB
P3	24.9 abc	AB	15.9 bcd	AB
P6	20.6 abc	AB	48.7 abcd	AB
P8	20.4 abc	AB	38.6 abcd	AB
P5	20.2 abc	AB	24.8 abcd	AB
P15	16.3 abc	AB	12.3 bcd	AB
P1	12.5 bc	AB	28.2 abcd	AB
P9	8.5 bc	AB	44.9 abcd	AB
P13	8.4 bc	AB	12.3 bcd	AB
P11	6.1 c	B	67.7 ab	AB
P14	5.6 c	B	7.4 cd	B
P7	5.5 c	B	17.1 bcd	AB
P16	0.0 c	B	61.2 abc	AB
P2	0.0 c	B	34.0 abcd	AB
TESTEMUNHA	0.0 c	B	0.0 d	B
C.V. (%)	27.6		26.2	

\*Médias de duas parcelas, na coluna, seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

Tabela 2. Altura média (mm) e peso médio (g) da matéria seca de plantas de ipê amarelo aos 90 dias do semeio, após inoculação via semente com isolados de *Phomopsis* e *Phoma*.

ISOLADO	ALTURA (mm) <sup>*</sup>		PESO (g) <sup>*</sup>	
	5%	1%	5%	1%
P14	49.8 a	A	0.13 a	A
P13	47.6 a	A	0.12 a	A
P7	44.8 a	A	0.08 ab	A
P9	44.7 a	A	0.08 ab	A
P11	44.7 a	A	0.10 ab	A
TESTEMUNHA	44.4 a	A	0.12 a	A
P4	43.3 ab	A	0.12 a	A
P5	43.0 ab	A	0.08 ab	A
P16	41.7 ab	A	0.09 ab	A
P2	41.5 ab	A	0.08 ab	A
P8	40.6 ab	A	0.12 a	A
P15	40.4 ab	A	0.10 ab	A
P6	38.7 ab	A	0.09 ab	A
P1	36.4 ab	A	0.06 ab	A
P3	34.8 ab	A	0.07 ab	A
P10	30.8 ab	A	0.04 ab	A
P12	15.0 b	A	0.02 ab	A
C.V. (%)	18.2		25.9	

<sup>\*</sup>Médias de duas parcelas, na coluna, seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARNEIRO, J.S. Microflora associada a sementes de essências florestais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 3, p.557-566, jul./set. 1986.
- CARNEIRO, J.S. Qualidade sanitária de sementes de espécies florestais em Paraopeba-MG. *Fitopatologia Brasileira*, v. 15,n.1, p. 75-77, jan./mar. 1990.
- FERREIRA, F.A. *Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.
- FOSCO MUCCI, E.S.; LASCA, C.C. Flora fúngica de sementes de essências florestais nativas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 11, n. 2, p. 352-353, abr./jun. 1986.
- HOMECHIN, M.; PIZZINANO, M.A.; MENDEN, J.O.M. Sanidade de sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium oxysporium* em plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 12, n. 1/2, p. 103-112, jan./jun. 1986.
- LASCA, C.C.; SAMPAIO, A.S.; CINTRA, A.F. Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus* spp. *O Biológico*, São Paulo, v. 37, n. 11, p. 287-292, nov. 1972.
- LASCA, C.C.; SAMPAIO, A.S.; CINTRA, A.F. Condições fitossanitárias de sementes de *Pinus elliottii* Englm produzidos no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 4, n. 1, p. 12-13, jan./mar. 1978.
- MARTINS, S.H. Aspectos fitossanitários e fisiológicos de sementes de barbatimão, ipê amarelo e ipê roxo de algumas localidades do Sul de Minas Gerais. Lavras: ESAL, 1991. 72p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- MASCHIO, L.M. de A.; MACEDA, A.; RAMOS, A. Fungos em sementes de espécies florestais com potencial agrossilvicultural no Paraná. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, Campos do Jordão, 1990. Anais... Campos do Jordão: IBDF, 1990. p. 555-563.
- SALES, N. da L.P. Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê-amarelo, ipê-roxo e barbatimão. Lavras: ESAL, 1992. 89p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade)

URBEN, A.F.; METZEL, M.M.V. da S.; CÍCERO, S.M. Ocorrência de fungos em sementes de seringueira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 17, n. 11, p. 1633-1637, nov. 1982.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente foram realizados experimentos para avaliar a fertilidade dos isolados de *Phomopsis* e *Phoma* em cinco diferentes meios de cultura, duas condições de temperatura e três regimes de luminosidade. Houve variação na produção de picnídios e conídios sob as diferentes condições testadas.

De modo geral o meio de cultura aveia-ágar favoreceu a esporulação, que nem sempre teve correlação com a maior produção de picnídios. Esta maior indução na esporulação, aos 12 dias da incubação, neste meio, provavelmente ocorreu devido o mesmo ser mais pobre que os outros meios testados, sendo possível que o esgotamento de seus nutrientes tenha induzido uma rápida esporulação (Barnett, Timnick e Lilly, 1950). A falta de correlação entre número de picnídios e esporulação pode ter ocorrido pelo fato da avaliação ter sido feita aos doze dias da incubação quando os meios mais ricos em nutrientes ainda não teriam sido esgotados portanto, uma maior esporulação ainda estaria por ser estimulada. Quanto aos isolados P2 e P9 de *Phomopsis* e P11, *Phoma glomerata*, cuja esporulação foi maior em meios mais ricos, sugere-se que os mesmos necessitam de uma nutrição adicional para a esporulação, talvez de carboidratos complexos (Lukens, 1963), o que pode ser comum a determinados fungos (Strandberg, 1987).

As temperaturas utilizadas não diferiram quando foi avaliada a fertilidade dos isolados. De acordo com Cochrane (1958) existe um intervalo favorável a uma maior esporulação indicando, para maioria dos isolados, que as temperaturas testadas se encontram neste intervalo.

O regime de luminosidade claro contínuo foi, para a maioria dos isolados, considerado melhor para a reprodução. De acordo com Leonian (1924) a luminosidade pode exercer um efeito indutor ou inibidor sobre a formação de estruturas de reprodução de espécies fúngicas. Pelos resultados obtidos pode-se concluir que este efeito pode ser diferenciado entre indivíduos de uma mesma espécie.

Estudando-se a variabilidade fenotípica dos isolados fúngicos, sob as mesmas condições de substrato, temperatura e luminosidade consideradas anteriormente, observou-se que os meios CA, MA e SHA induziram grandes variações na morfometria e aspectos culturais em considerando o meio aveia-ágar como padrão. Estas variações também ocorreram, embora com menor intensidade, quando variou-se a temperatura e o regime de luminosidade. Estes resultados confirmam que a classificação de *Phomopsis* e *Phoma* está comprometida com as condições de cultivo (Sutton, 1980).

De acordo com a morfometria e características culturais foi possível enquadrar os isolados em quatro grupos. O grupo I e III se encontram os isolados P1 e P3, P5 e P9, respectivamente. Não foi possível classificá-los a nível de espécie, tendo o isolado P1 sido inicialmente considerado como pertencente ao gênero *Phoma*, podendo esta classificação ser revista, dado que a ausência de conídio beta não é uma característica segura de classificação, e os aspectos culturais e morfométricos considerados não são suficientes. Em considerando o grupo

III, apenas o isolado P5 apresentou formação de conídio beta, sendo esta a única diferença entre os mesmos. Posto que a formação de conídios beta pode ser suprimida em determinados isolados, e dado a semelhança entre os mesmos, considerou-se os mesmos como pertencentes ao gênero *Phomopsis*. De acordo com Van Der Aa, Noordeloos e De Gruyter (1990) as características culturais e morfológicas não são suficientes para classificar as centenas de espécies de *Phomopsis* descritas. No grupo II se encontram os isolados cujos caracteres culturais e morfométricos se ajustam à descrição feita por Boerema (1964) para *Phoma glomerata*. No entanto, sete destes isolados apresentaram a formação de conídios do tipo beta o que os classificaria no gênero *Phomopsis*. Estes isolados apresentaram atividade de esterase característica e diferencial o que vem a confirmar o agrupamento dos mesmos, sugerindo-se que a classificação de *Phoma herbarum* precisa ser revista. O grupo IV está representado por *Phoma glomerata*.

Quanto a patogenicidade os isolados de *Phomopsis* P10 e P12 se mostram patogênicos a ipê amarelo e angico vermelho, não tendo havido especificidade, semelhante aos resultados obtidos por Martins (1991). Os isolados P16 (*Phomopsis*) e P11 (*Phoma glomerata*) foram patogênicos somente a angico vermelho. Estes resultados mostram que pode ocorrer especificidade ou não em se tratando de *Phomopsis* e das espécies florestais estudadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNETT, H.L.; TIMNICK, M.B.; LILLY, V.G. Method of inoculation and the production of spores by *Guinardia bidwellii* and other fungi in culture. *Phytopathology*, St. Paul, v.40, n.1, p.1, Jan. 1950.
- BOEREMA, G.H. *Phoma herbarum* Westend., the type-species of form-genus *Phoma* Sacc. *Persoonia*, Leiden, v.3, n.1, p.9-16, Jan. 1964.
- COCHRANE, V.W. *Physiology of Fungi*. New York: John Wiley e Sons, 1958. 524p.
- LEONIAN, L.H. A study of factors promoting pycnidium-formation in some Sphaeropsidales. *American Journal of Botany*, Cambridge, v.2, n. 1, p.19-50, Jan. 1924.
- LUKENS, R.J. Photoinhibition of sporulation in *Alternaria solani*. *American Journal of Botany*, Cambridge, v.50, n.1/6, p. 720-724, Jan./June 1963.
- MARTINS, S.H. Aspectos fitossanitários e fisiológicos de sementes de barbatimão, ipê amarelo e ipê roxo de algumas localidades do Sul de Minas Gerais. Lavras: ESAL, 1991. 72p. (Tese - Mestrado em Fitossanidade).
- STRANDBERG, J.O. Isolation, storage and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, St. Paul, v.77, n.6/12, p.1008-10012, July/Dec. 1987.
- SUTTON, B.C. *The coelomycetes: Fungi Imperfect with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Kew Surrey: Commonwealth Mycology Institute, 1980. 696p.
- VAN DER AA, H.A.; NOORDELOOS, M.E.; De GRUYTER, J. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Studies in Mycology*, [S.l.], v.32, n.1, p.3-19, Jan. 1990.