

Glomerella cingulata (STONEM.) SPAULD. ET V. SCHRENK. F. SP.
phaseoli N.F., FASE ASCÓGENA DO AGENTE CAUSAL
DA ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO ¹

Hiroshi Kimati ²
Ferdinando Galli ²

RESUMO

O presente trabalho versa sobre a obtenção da fase perfeita de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., dirimindo dúvidas quanto à sua existência, suscitada pelo primeiro relato feito por SHEAR e WOOD (1913). Após ter encontrado duas linhagens heterotálicas que formaram ascospores em acasalamentos, os autores estudaram alguns fatores ambientais que favorecem a reprodução sexuada, chegando-se às seguintes conclusões: peritécios se formaram sobre vários meios de cultura semi-sintéticos em cuja composição entram glucose, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4 , agar e água; a quantidade de glucose deve ser igual ou maior do que 4g/l, a de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ de 0,15 a 0,60 g/l e a relação C/N deve estar entre 29,8 a 89,6:1; a adição de vitaminas alterou levemente o nível de aproveitamento de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, não havendo boa produção de peritécio ao nível de 0,15 g/l mas permitindo-se até o nível de 1 g/l, mantendo-se as relações C/N mais ou menos no mesmo nível; a luz, nos estágios final ou inicial ou em períodos alternados acima de 8 horas, inibiu a formação de ascospores, sendo, portanto, essencial a escuridão contínua; peritécios se formaram sob condições de pH variável de 4,0 a 6,0; peritécios ejetam ascospores em condições de alta umidade; a temperatura em que foram obtidos os peritécios foi sempre de 20°C.

¹ Entregue para publicação em 18/12/70. No presente trabalho foram utilizados equipamentos doados pela FAPESP, Fundação Rockefeller e Agência Norte-Americana para o Desenvolvimento Internacional.

² Departamento de Fitopatologia da ESALQ, respectivamente, assistente e Chefe do Departamento.

Do acasalamento de linhagens conidiais de *C.lindemuthianum* o autor obteve resultados a priori comparáveis aos de trabalhos genéticos feitos com *G.cingulata*, chegando-se à conclusão de que as linhagens usadas são heterotáticas possivelmente condicionadas por vários fatores genéticos.

Isolamentos ascospóricos foram inoculados, sendo todos patogênicos ao feijoeiro, pelo menos para a variedade Michelite.

Comparando morfológicamente a fase ascógena de *C.lindemuthianum* com *G.cingulata*, o autor propõe o nome de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld et v. Schrenk f. *phaseoli* n.f.

INTRODUÇÃO

A obtenção de variedades de plantas resistentes a doenças tem sido a meta insistentemente procurada por muitos pesquisadores. Entretanto, em decorrência da variabilidade dos fitopatógenos, variedades consideradas resistentes a um patógeno, em determinadas épocas ou locais, passavam a se mostrar suscetíveis em outras. Atualmente, sabe-se que muitos fungos fitopatogênicos, dentre os quais *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. - agente da Antracnose do feijoeiro, ocorrem como raças fisiológicas, especializadas em afetar determinadas variedades de um mesmo hospedeiro. Raças novas podem se originar das existentes, mas os mecanismos responsáveis por essas variações não estão bem estudados para a maioria dos fungos fitopatogênicos. Dos casos conhecidos, infere-se que a variabilidade pode ser explicada por quatro mecanismos genéticos básicos (BUXTON, 1960): mutação, heterocariose, recombinação com ou sem um mecanismo sexual e adaptação.

O presente trabalho com *C.lindemuthianum* visa mostrar a possibilidade de as variações deste patógeno do feijoeiro, serem devidas à recombinação sexual. Como a existência da fase ascógena de *C.lindemuthianum* é, até o presente momento, um ponto controverso, o trabalho dá ênfase às condições que favorecem a sua ocorrência.

REVISÃO DA LITERATURA

A existência da fase ascógena de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib, descrita uma única vez por SHEAR e WOOD (1913) como *Glomerella lindemuthiana* Shear, é um ponto controverso. Entre aqueles que, explícita ou impli-

tamente, aceitam as conclusões de SHEAR e WOOD (1913), figuram MULLER (1926) e ALEXOPOULOS (1966). Por outro lado, segundo ZAUMEYER e REX THOMAS (1957), ninguém tem ainda prova definida do estágio perfeito de *C. lindemuthianum* uma vez que SHEAR e WOOD (1913), ao descreverem os peritécios encontrados abundantemente em apenas uma linhagem, não conseguiram conídios nem apresentaram evidências de terem provado o parasitismo. EDGERTON (1915) sugeriu que eles podiam ter trabalhado com uma das espécies saprofíticas de *Colletotrichum* frequentemente encontradas em feijoeiro. Também VON ARX (1957) não aceita o trabalho de SHEAR e WOOD (1913), alegando que pesquisadores subsequentes, mesmo após muitas tentativas, não conseguiram fazer o fungo formar peritécios, e conclui que os dados desses autores são hoje em dia encarados com dúvida.

VON ARX (1957), fazendo revisão taxonômica do gênero *Colletotrichum*, com base em características morfológicas da fase conidiana, colocou aproximadamente 600 espécies de *Colletotrichum* como sinonímia de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., espécie tipo que corresponde na fase perfeita a *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld et v. Schrenk.; admitia, entretanto, a especialização fisiológica para algumas espécies, de acordo com o espectro de hospedeiros, sendo uma dessas formas o *C. lindemuthianum*, parasitando plantas do gênero *Phaseolus*, notadamente *P. vulgaris* L. Além dessa especialização, *C. lindemuthianum* se diferenciaria das formas conidianas típicas de *G. cingulata* por suas características em meio de cultura de agar-cereja: micélio mais escuro e crescimento mais lento. Implicitamente, essa colocação, baseada em características da fase conidiana, admitia, então, a possibilidade de realmente se formar a fase ascógena de *C. lindemuthianum*, a qual corresponderia, automaticamente, à forma básica *C. cingulata*. Entretanto, devido ao fato de a existência da fase ascógena de *C. lindemuthianum* não ser conhecida com certeza, e devido a motivos práticos, VON ARX achou desejável manter o nome específico usado até o momento. Esse ponto de vista não é, aparentemente, compartilhado por ALEXOPOULOS (1966) que cita o fungo da Antracnose do feijoeiro como *G. lindemuthiana*... tácita aceitação das conclusões de SHEAR e WOOD (1913).

Além desses trabalhos, nada mais se encontra sobre *G. lindemuthiana* na literatura à nossa disposição. Por outro lado, com referência a *G. cingulata*, existem muitos trabalhos sobre morfogênese e fatores genéticos que controlam a reprodução sexuada. Uma síntese desses trabalhos pode ser encontrada consultando-se VON ARX (1957), ALEXOPOULOS (1966), FINCHAM

(1965), TURIAN (1966), RAPER (1966), EMERSON (1966) e ESSER e KUENEN (1967).

ESSER e KUENEN (1967), baseando-se em LUCAS (1946), WHELLER e col. (1948), McGAHEN e WHEELER (1951) e OLIVE (1951), dá a seguinte descrição morfológica de *G. cingulata*: o ciclo sexual se inicia com duas células uninucleadas que se desenvolvem como curtas ramificações nas proximidades dos septos hifálicos; no curso da diferenciação, a parede do protoperitécio se origina de uma das células, circundando o ascogônio que se desenvolve da outra célula; antes de se completar o desenvolvimento da parede peritecial, o ascogônio se funde com uma hifa de copulação, originária de uma hifa adjacente àquela da qual se iniciou o protoperitécio; seguem-se, então, a formação de hifas ascógenas, o desenvolvimento dos primórdios das ascas, a cariogamia, a meiose, as mitoses pós-meióticas, a formação dos ascosporos; durante o desenvolvimento da asca, a manta hifálica do protoperitécio cresce e toma a forma típica do peritécio, ficando preta pelo acúmulo de pigmentos de melanina. Os mesmos autores dão ainda, para *G. cingulata*, as seguintes características diagnósticas: reprodução assexuada através de conídios, comportamento sexual compatível, reprodução sexual por gametangiogamia, 8 ascosporos por asca, ascosporos de 24 micra de comprimento por 5 de largura, ascosporos não arranjados linearmente, 4 cromossomas e período de geração, sob condições ótimas, de 9 dias.

WHEELER e McGAHEN (1952), trabalhando com uma linhagem autofértil de *G. cingulata* da batata-doce, relataram os efeitos de mutantes em 4 loci sobre a reprodução sexual. Foram encontrados dois mutantes alelos em cada um dos dois loci, A e B. Mutantes portadores do alelo A1 eram sexualmente estéreis, produzindo somente conídios. Mutantes A+B1 e A+B2 produziram peritécios espalhados mas quase completamente estéreis devido ao aborto da asca. O alelo A2, quando associado com B+, era responsável por aglomerado de peritécios, menores do que aqueles do tipo selvagem, e, quando associado com os alelos B1 e B2, aumentou a produção de pigmentos pretos mas diminuiu marcadamente a auto-fertilidade. No locus F foi constatado o alelo mutante F1 e no locus ST o alelo mutante st1, ambos responsáveis por completa auto-esterilidade e supressão parcial da formação de peritécios. WHEELER e DRIVER (1953) descreveram o gen mutante *dwl* que bloqueia parcialmente a meiose e também controla a produção de ascosporos pequenos; culturas portadoras do gen *dwl* sofrem aborto em 70-80% das ascas, devido a desintegrações nucleares que ocorrem du -

rante as divisões meióticas. Em vista desses e de outros resultados, WHEELER (1954) mostrou que os efeitos dos mutantes, que levam à esterilidade podem ser representados por blocos genéticos na sequência do desenvolvimento normal do peritécio: gen Al bloqueando a formação dos primórdios do peritécio, gens Fl e stl bloqueando a plasmogamia, gen B2 bloqueando a fusão nuclear e gen dwl bloqueando a meiose.

Apesar do avanço no estudo genético de *G.cingulata* o efeito de condições ambientais sobre a diferenciação de ascogônios nesse fungo, segundo TURIAN (1966), é pouco conhecido. EDGERTON (1914) relata que meios de cultura de vagem-agar e farinha de aveia-agar, especialmente quando acidificados, são favoráveis à formação de peritécios de *G.cingulata*, tanto da linhagem(+) como do seu cruzamento. WHEELER e col. (1959), relataram que a linhagem de *G.cingulata* portadora do gen B2 produzida 2,2 de peritécios férteis no meio de farinha de aveia-agar, 0,6% em fubá-agar, 0,4% em BDA (batata-dextrose-agar) e 0,0% num meio sintético (KH_2PO_4 , 3,4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,1 g; NaNO_3 , 1,3 g; CaCl_2 , 0,03 g; sacarose, 20,0 g; biotina, 5 micrograma; 1 ml da solução padrão de micronutrientes; agar, 20 g e água, q.s.p. 1 litro). Chegaram também à conclusão que em relação à velocidade e intensidade de reações de acasalamento, em cruzamentos de linhagens de gen B+ com as portadoras de gen B2, os quatro meios se ordenaram na sequência acima citada, com o meio de farinha de aveia sendo muito superior aos demais. Paradoxalmente, as mais baixas porcentagens de peritécios férteis foram encontradas sobre o meio de farinha de aveia, possivelmente devido à intensa competição entre o grande número de peritécios formados para o limitado suprimento nutricional disponível.

Mesmo dentro do gênero *Glomerella* é difícil encontrar literatura a respeito da influência de fatores ambientais na formação de peritécios bem desenvolvidos. Dentro dessa linha de estudos, merece destaque o trabalho de JENKINS (1962) com *G.magna*, agente de uma nova Antracnose em Cucurbitáceas, o qual observou que a formação de peritécios bem constituídos estava na dependência dos seguintes fatores: meio de cultura, presença do papel de filtro no meio agarizado, temperatura, pH e, principalmente, luminosidade contínua por um período inicial de pelo menos 6 dias.

Se bem que, em *Glomerella*, sejam escassos os trabalhos sobre a influência do ambiente no desenvolvimento da fase sexuada, a literatura mostra que, quando se consideram ou-

tros fungos, a reprodução sexual de muitos deles só ocorre sob determinadas condições de temperatura, luz, umidade, concentração hidrogeniônica, nutrição, aeração, etc. (LILLY e BARNETT, 1951; HAWKER, 1957; COCHRANE, 1958). O estudo desses fatores permite tirar algumas conclusões. Assim, segundo HAWKER (1957), as condições que permitem a formação de esporos são quase sempre de uma variação menos ampla do que aquelas que permitem o crescimento miceliano e as condições que permitem o desenvolvimento do estágio de esporo perfeito diferem usualmente muito mais das suficientes para crescimento vegetativo do que as que favorecem a reprodução assexual. Por outro lado, segundo COCHRANE (1958), não existe nenhuma fórmula geral para esporulação e qualquer organismo deve ser estudado individualmente.

A influência dos fatores ambientais na formação de conídios de *C. lindemuthianum* foi estudada por MATHUR e col. (1950), os quais chegaram às seguintes conclusões: 1) o fungo não esporula abundantemente sobre meios sintéticos; 2) nem todos os meios são igualmente satisfatórios; 3) um meio contendo glucose, sais minerais e neopeptona deu excelente esporulação, tão boa quanto a que ocorre sobre vagem esterilizada ou vagem-agar; 4) glucose pode ser substituída por quantidades equivalentes de sacarose, xilose ou galactose, sem afetar a quantidade de esporulação; 5) manose, maltose, frutose e lactose foram menos favoráveis, enquanto amido solúvel, manitol e sorbitol foram desfavoráveis; 6) neopeptona foi a mais importante fonte de nitrogênio testada para esporulação; 7) outras fontes de nitrogênio, em ordem decrescente de eficiência em estimular esporulação, foram uréia, glicina, arginina, asparagina e nitrato de sódio; 8) conídios não se formaram abaixo do pH 3,0 mas a esporulação aumentou repentinamente no pH 3,6, foi maior entre pH 5,2 e 6,5 e moderada acima de 7,7; e 9) variações de luminosidade e aeração não tiveram efeito sobre a esporulação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os isolamentos utilizados neste trabalho foram: C-8, C-14, C-15, C-16, C-17, C-19, C-20, C-21 e C-22, todos já utilizados por KIMATI (1966); C-31 e C-32, originários de Jaboticabal, isolados de feijão vagem, em 1969, por K.Nakamura; C-50, C-51 e C-53, originários de Brasília, isolados em 1969 por A.Takatsu; e raças alfa e Beta, procedentes de Beltsville, U.S.A. No estudo da influência de fatores ambientais no desenvolvimento da fase perfeita de *C. lindemuthianum* foram uti-

lizados os isolamentos C-17 e C-20. Os isolamentos restantes foram incluídos no estudo de compatibilidade sexual. Os isolamentos C-17 e C-20 foram incluídos nos testes de patogenicidade dos isolamentos ascospóricos originários do cruzamento de C-17 e C-20.

Os conídios foram produzidos em caixas de Petri contendo um dos seguintes meios de cultura: 1) MPA (maltose, 4,0g; peptona, 1,0g; agar, 20,0g; e água, qsp 1 litro), 2) NGA (neopeptona, 2,00g; glucose, 2,80g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,23g; KH_2PO_4 , 2,72g; agar, 20,00g; e água, qsp 1 litro), 3) NGAM (o meio anterior com substituição de neopeptona por igual quantidade de peptona), 4) NGAG (NGA com substituição de glucose por igual quantidade de glicerina) e 5) PLGA (peptona, 5,0g; extrato de levedura, 3,0g; glicerina, 20,0g; agar, 15,0g; água, qsp 1 litro). O pH de todos esses meios foi ajustado a 5,5-6,0, antes da adição do agar e da autoclavagem, exceto o meio de PLGA cujo pH era de, aproximadamente 7,0. O meio de PLGA foi desenvolvido por HAYWARD (1964) para estudo de bacteriófagos de *Xanthomonas malvacearum*, mas, ocasionalmente, se mostrou muito melhor do que o meio de NGA, desenvolvido por MATHUR e cols. (1950) para esporulação de *C. lindemuthianum*.

Conídios produzidos em culturas com 5 a 25 dias de idade, sob condições de 20°C e escuridão contínua, foram suspensos em água esterilizada, procurando-se transportar apenas conídios. Nos experimentos de influência de fatores ambientais no desenvolvimento da fase perfeita de *C. lindemuthianum*, foram utilizados inóculos obtidos pela mistura de conídios das culturas C-17 e C-20; no experimento de compatibilidade sexual, os conídios de cada um dos outros isolamentos foram misturados com os de C-17 e C-20 (Quadro IV). O plaqueamento foi feito sobre discos de papel de filtro Whatman nº 1, superpostos na superfície dos meios agarizados vertidos em caixas de petri, na quantidade de 1 ml da suspensão/placa. Essa metodologia é semelhante à descrita por JENKINS (1962).

No estudo da influência da relação C/N no desenvolvimento da fase perfeita de *C. lindemuthianum*, 6 níveis de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ foram combinados com 6 de glucose, sobre um meio basal contendo KH_2PO_4 (1,0g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5g), agar (20,0g) e água (qsp 1 litro) (Quadro 1). No segundo experimento foram repetidos os tratamentos do primeiro, mas o meio basal continha, ainda, micronutrientes e as seguintes vitaminas: biotina, tiamina, inositol, piridoxina, e ácido nicotínico. (Quadro 2). A quantidade de ácido nicotínico foi baseada

em CAMPBELL (1958) e a dos componentes restantes em LILLY e BARNETT (1951). Nesses dois experimentos, o pH dos diferentes meios variou de 5,0 a 5,7, antes da adição de agar e da autoclavagem.

No estudo da influência do pH no desenvolvimento da fase perfeita de *C. lindemuthianum* foi utilizado o seguinte meio: glucose, 6,0g; KH_2PO_4 , 1,0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g; agar, 20,0g; e água, qsp 1 litro. O pH foi ajustado antes da adição do agar e da autoclavagem, usando-se NaOH ou HCl a 1%. Após a transferência dos meios esterilizados para caixas de petri, foram determinados os pH de todos tratamentos no potenciômetro Beckman Zeromatic II, sendo essas leituras consideradas os pH iniciais dos tratamentos. Foram elas: 3,5, 3,7, 4,0, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,2, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5.

No estudo da influência da relação $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} / \text{KH}_2\text{PO}_4$ sobre o desenvolvimento da fase perfeita de *C. lindemuthianum*, foram combinados 5 níveis de KH_2PO_4 com 4 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Quadro 3), sobre um meio basal contendo: glucose, 6,0g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,3g; tiamina, 100 microgramas; biotina, 5 microgramas; inositol, 5.000 microgramas; agar, 20,0g; e água, qsp 1 litro. O pH dos diferentes tratamentos variou de 4,8 a 5,7 antes da adição do agar e da autoclavagem.

No estudo da influência da luz foi utilizado o meio de cultura de composição idêntica ao do experimento da influência do pH, com o pH ajustado a 5,3, antes da adição de agar e da autoclavagem. As placas semeadas foram submetidas aos seguintes tratamentos: 1) luz contínua por 26 dias, 2) luz nos primeiros 20 dias; 3) luz nos primeiros 15 dias, 4) luz nos primeiros 10 dias; 5) luz nos primeiros 6 dias; 6) luz nos primeiros 3 dias; 7) escuridão contínua por 26 dias, 8) escuridão nos primeiros 20 dias; 9) escuridão nos primeiros 15 dias; 10) escuridão nos primeiros 10 dias; 11) escuridão nos primeiros 6 dias; 12) escuridão nos primeiros 3 dias; 13) alternância diurno-noturno (8 hs. no claro e 16 no escuro); 14) alternância cada 24 hs; 15) alternância cada 48 hs; e 16) alternância cada 72 horas. Nos períodos de escuridão os tratamentos foram colocados em estufa comum e, nos períodos de irradiação luminosa, numa câmara de iluminação improvisada, com controle de temperatura, sendo a fonte luminosa constituída de duas lâmpadas fluorescentes GE de 40 watts e uma lâmpada comum (Sylvania) de 60 watts, colocadas a uma altura de 70 cm das placas em tratamento.

No estudo da compatibilidade sexual dos isolamentos de *C. lindemuthianum*, o meio de cultura foi o mesmo utilizado no experimento da influência luminosa.

Nos experimentos até aqui descritos, os tratamentos ficaram submetidos a condições de temperatura em torno de 20°C, e com exceção do experimento da influência luminosa, mantidos sob escuridão contínua.

Os tratamentos, via-de-regra com 3 repetições, foram examinados, com idade de 21 a 28 dias, para se determinar a frequência dos peritécios. Foram examinados 10 campos/placa, ao microscópio estereoscópico (75 aumentos), fazendo-se a contagem e, ao mesmo tempo, colhendo os peritécios contados, em número variável de 10 a 30 por placa. Estes foram examinados ao microscópio composto para se determinar a presença de ascas e/ou ascosporos. A porcentagem de peritécios férteis (com ascas e/ou ascosporos) foi multiplicada pela frequência média das contagens de 10 campos/placa e atribuiu-se-lhe o valor de índice peritecual.

Para a observação de ejeção de ascosporos, culturas de C-17 x C-20, com idade de 20 a 24 dias, sob condições de escuridão contínua e 20°C, em meio de cultura idêntica ao usado no experimento de luz e em meio de aipo-agar-modificado (extrato de 300 g de aipo; 4 a 10 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 20g de agar e 1 litro de água), foram transferidas para caixas de petri contendo 10 a 20 ml de água esterilizada, em pedaços pequenos de mais ou menos 1 a 2 cm². Para isolamento de ascosporos, as mesmas culturas, nas mesmas condições, foram invertidas sobre meios propícios ao desenvolvimento de conídios, anteriormente mencionados, justapondo-se os fungos das caixas de petri e vedando-se os bordos com fita adesiva. Culturas assim tratadas foram mantidas a 20°C, sob escuridão.

Nos testes de patogenicidade foram utilizados, além dos isolamentos conidiais C-17 e C-20, os isolamentos ascospóricos originários do cruzamento de C-17 com C-20, designados pelas siglas F1-17, F1-18, F1-24, F1-29, F1-30 e F1-31. O inóculo foi preparado suspendendo-se os conídios de uma placa, produzidos em meio de NGA, já anteriormente descrito, com idade aproximada de 20 dias, em 100 ml de água esterilizada. As variedades inoculadas foram: Michelite, Dark Red Kidney e Perry Marrow, provenientes de Cornell; as mesmas variedades, numeradas respectivamente de 150, 151 e 152, provenientes de Beltsville; e as variedades nacionais 105 e 125. Todas já tinham sido utilizadas por KIMATI (1966), sendo as primeiras va

riedades diferenciadoras de raças de *C. lindemuthianum*, e as últimas, 105 e 125, resistentes a C-20 e susceptíveis a C-17. Sementes dessas variedades, recém germinadas e das quais as testas foram removidas, foram mergulhadas nas suspensões de esporos e, logo em seguida, dispostas ao longo de uma armação de madeira e tela de arame coberta com papel guardanapo perfurado. A armação de madeira foi construída de maneira a se encaixar exatamente numa bandeja no fundo da qual se colocou água destilada até uma altura aproximada de 1 cm. A bandeja foi, então, coberta com plástico e colocada numa câmara com controle de luz e temperatura (20°C). Essa metodologia está de acordo com os trabalhos de VAN DER GIESSEN e VAN STEENBERGEN (1957). A leitura dos sintomas foi feita uma semana após a inoculação, considerando resistentes as plantas sem lesões ou com lesões superficiais, e susceptíveis as plantas mortas ou com lesões profundas.

Estudos morfológicos foram feitos no decorrer dos experimentos, usando-se dois métodos de preparo de lâminas: esmagamento de peritécios colocados sobre uma gota de corante (lactofenol azul algodão ou acetocarmim mais glicerina), por pressão de lâmina, e cortes no micrótomo de congelação (corante acetocarmim mais glicerina). O lactofenol foi preparado de acordo com ALEXOPOULOS e BENEKE (1968) e o acetocarmim de acordo com SASS (1951) mas misturando-se glicerina em proporções variáveis.

RESULTADOS

Os resultados do primeiro experimento, instalado em 9/8 e colhido entre 1 a 5/9/69, são apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1 - Influência da relação C/N (glucose/Ca(NO₃)₂.4H₂O) no desenvolvimento da fase perfeita de *C. lindemuthianum*.

Glucose g/l	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O g/l					
	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	1,00
1	0,28	0,60	0,23	0,00	0,00	0,00
2	0,81	0,75	1,25	0,00	0,00	0,00
4	0,25	3,50*	3,00*	0,24	0,00	0,00
6	0,00	5,10*	9,72*	--	0,29	0,00
8	0,00	5,40*	4,00*	11,70*	0,00	0,00
10	0,00	0,00	2,40*	5,12*	0,00	0,00

O meio basal continha: KH₂PO₄ , 1,00g; MgSO₄.7H₂O , 0,50g; agar, 20,0g; água destilada, qsp 1 litro. Os números nas colunas indicam o número médio de peritécios férteis em 10 contagens de campos microscópicos (75 aumentos) em cada uma das 2 repetições. Os asteriscos indicam que pelo menos 50% dos peritécios examinados, numa das repetições, ao 26º dia de idade, estavam com ascósporos. O traço (--) indica perda de dados por contaminação do tratamento (*Penicillium spp.*).

Os resultados mostram que os 9 melhores tratamentos foram: 14, 15, 20, 21, 26, 27, 28, 33 e 34, compreendendo os níveis de nitrogênio 0,30 , 0,45 e 0,60g de Ca(NO₃)₂.4H₂O/litro e os níveis de carbono 4,0 , 6,0 , 8,0 e 10,0 g de glucose/litro. As relações C/N, nos 9 melhores tratamentos, variou de 29,8:1 (4g da glucose para 0,45 de Ca(NO₃)₂.4H₂O/litro de meio) a 89,6:1 (8g de glucose para 0,30 de Ca(NO₃)₂.4H₂O/litro de meio).

Em todos os tratamentos se formaram protoperitécios; nos tratamentos em que não foram observados peritécios férteis, os protoperitécios tenderam a produzir "coils" em massa amorfa, de aspecto oleoso. Nos tratamentos 3,4,5 e 6 se formaram

acervulos visíveis a olho nũ. Em alguns tratamentos, principalmente 1 e 20, foram observados peritécios rostrados com ascoporos emergindo pelo ostíolo, alguns ascoporos tinham germinado logo na saída e apresentavam 1 a 2 septos. Ascoporos tinham a conformação alantóide ou elipsoide, sendo mais frequentemente encontrado o primeiro tipo. O número de ascoporos por asca era, via de regra, quatro.

Os resultados do 2º ensaio, instalado em 15/10 e colhido entre 8 a 11/11/69, estão apresentados no Quadro 2.

QUADRO 2 - Influência da relação C/N (glucose/ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) sobre o desenvolvimento da fase perfeita de *C. lindemuthianum*, quando se usa meio basal com vitaminas.

Glucose g/l	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ g/l					
	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	1,00
1	0,00	0,18	0,14	0,30	0,05	0,00
2	0,03	0,12	0,22	0,15	0,33	0,88
4	0,00	2,28*	5,20*	0,18	0,00	0,00
6	0,00	0,45	2,68*	8,50*	4,32*	1,95*
8	0,00	1,18	4,41*	3,08*	1,85*	0,32
10	0,00	1,27	1,46*	3,02*	2,60*	0,61

O meio basal continha: KH_2PO_4 , 1,0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g; biotina, 5 microgramas; tianina, 100 microgramas; inositol, 5000 microgramas; piridoxina, 100 microgramas; ácido nicotínico, 750 microgramas; 2 ml da solução de micronutrientes; agar, 20,0g e água, qsp, 1 litro. Os números nas colunas indicam o número médio de peritécios férteis de contagens em 10 campos microscópicos (75 aumentos) em cada uma das duas repetições ao 24º ou 27º dia após o plaqueamento. Os asteriscos indicam os tratamentos que apresentaram maior porcentagem de peritécios com ascoporos.

Os melhores níveis de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram: 0,45 , 0,60 e 0,75g/l; os de glucose se situaram de 4g/l para cima. Examinando-se os 12 melhores tratamentos (aqueles com asteriscos) nota-se que a relação C/N varia de 20:1 (6 g de glucose para 1 de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 74,7:1 (10g de glucose para 0,45 de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Protoperitécios se formaram em todos os tratamentos ; conídios nos tratamentos pobres de peritécio, principalmente nos tratamentos 1 e 7. Nos tratamentos 4, 5, 6, 11, 12, 16, 17 e 18, o "coil" do protoperitécio apresentou tendência ao supercrescimento com rompimento das suas paredes; nos tratamentos 25, 30, 31 e 32, o "coil" apresentou tendência a se desfazer tomando um aspecto oleoso. Nos tratamentos em que se formaram peritécios bem constituídos foram observados dois tipos de ascósporos (alantóides e elipsóides) e alguns peritécios rostrados, como na experiência anterior.

Os resultados do ensaio da influência do pH no desenvolvimento da fase perfeita de *C. lindemuthianum*, montado em 17/9 e colhido entre 8 a 12/11 de 1969, foram os seguintes, em número médio de peritécios férteis/campo em 10 contagens microscópicas (75 aumentos) em cada uma das 2 ou 3 repetições : pH 3,5 (0,00), pH 3,7 (2,10), pH 4,0 (0,08), pH 4,5 (3,23), pH 4,7 (2,87), pH 4,8 (2,46), pH 4,9 (3,60), pH 5,0 (4,58) , pH 5,2 (2,85), pH 5,5 (2,63), pH 6,0 (3,37), pH 6,5 (0,37) , pH 7,0 (0,00) e pH 7,5 (0,0). É preciso assinalar que os meios com o pH de 3,5 , 3,7 e 4,0 não se solidificaram, de modo que os dados podem ter sofrido essa influência, apesar de se ter colocado de 3 a 5 discos de papel de filtro. Observa-se que, excluindo os pH 3,5 , 4,0 , 6,5 , 7,0 , e 7,5 , o número de peritécios produzidos foi muito bom, não havendo diferenças muito grandes. Do pH 6,5 para cima notou-se abundância de conídios, visíveis a olho nu, formando acérvulos típicos de *Colletotrichum*. Aparentemente, os conídios se originaram de protoperitécios que não se desenvolveram normalmente e que apresentaram tendências a supercrescimento do "coil" interno e fendilhamento da parede.

Os peritécios férteis obtidos deste ensaio produziram novamente esporos de dois tipos: alantóides (maiores) e elipsóides (menores). Estes, aparentemente, são viáveis, pois o protoplasma se colore normalmente com os corantes usuais (lactofenol azul, algodão e acetocarmim). Os ascósporos alantóides, via de regra, são formados em número de 4 por asca e os elipsóides em número de 8 por asca. No tratamento em que o

pH acusou 5,5 , o último tipo de ascosporos foi muito abundante.

Nos tratamentos em que o pH foi de 4,0 a 6,0 , observou-se grande número de peritécios com rostro. A tendência do rostro foi de se formar horizontalmente e levemente inclinado para baixo, de modo que, com o escurecimento da parede do peritécio, ficava difícil observá-lo na lupa e mesmo no microscópio composto.

No Quadro 3 estão apresentados os resultados do ensaio da influência da relação $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sobre a produção da fase perfeita de *C. lindemuthianum*. Foi instalado em 11/10 e colhido entre 3 a 9/11/69.

QUADRO 3 - Influência da relação $MgSO_4 \cdot 7H_2O/KH_2PO_4$ sobre a produção da fase perfeita de *C. lindemuthianum*.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ g/l	KH_2PO_4 g/l				
	0,10	0,50	1,00	2,00	3,00
0,25	0,90	0,84	0,79	0,39	0,20
0,50	1,28*	1,66*	1,03*	0,10	0,12
1,00	1,92*	1,80*	1,73*	0,28	0,29
1,50	0,46	1,52*	0,58*	0,38	0,32

O meio basal continha: glucose, 6,00g; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0,30g; tianina, 100ug; biotina, 5ug; inositol, 5.000ug; agar, 20,00g; e água destilada, qsp, 1 litro. Os números nas colunas indicam a média de contagens de peritécios férteis em 10 campos microscópicos (75 aumentos), em cada uma das 3 repetições. Os asteriscos indicam os tratamentos cuja porcentagem de peritécios com ascosporos era maior do que 20%, nas repetições colhidas dias 6/11 e 9/11.

Os resultados indicam que, nas condições do experimento, os melhores tratamentos são a combinação de 0,10 , 0,50 e 1,00 g de KH_2PO_4 com 0,50 e 1,00g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ /litro de meio de cultura.

Os resultados do experimento da influência da luz no desenvolvimento da fase perfeita de *C. lindemuthianum*, instalado em 13/10/69 e colhido entre 7 a 8/11 de 1969, foram os seguintes: em todos os tratamentos se formaram protoperitécios; ascas só foram constatadas nos tratamentos 6 (luminosidade nos primeiros 3 dias), 7 (escuridão contínua), 8 (escuridão nos primeiros 20 dias), 9 (escuridão nos primeiros 15 dias), 10 (escuridão nos primeiros 10 dias) e 13 (alternância diurno-noturno); ascosporos só apareceram nos tratamentos 6 e 7, nos quais a frequência de peritécios foi, respectivamente, de 3,5 a 5,1 (média de contagens em 10 campos microscópicos em cada uma das 3 repetições).

Observou-se, além dos resultados acima descritos, que a colônia é tanto mais escura quanto maior o período de ausência de luz e que a exposição luminosa inicial é mais eficiente do que a final para inibir a formação dessa coloração. Nos tratamentos em que se alterou o regime de luminosidade cada 24, 48 e 72 horas, os protoperitécios tinham tendência a apresentar "coils" internos mal conformados que supercresciam extravazamento através das paredes que se rompiam.

Os resultados do ensaio de compatibilidade sexual de isolamentos conidiais de *C. lindemuthianum*, instalado em 5/11 e colhido entre 27 a 30/11/69, são apresentados no Quadro 4.

No cruzamento entre C-14 e C-20, observou-se em duas repetições, a formação de estruturas semelhantes a protoperitécios, aparentemente, originários de acérvulos cujos conídios se condensam; tais estruturas eram desprovidas de parede e não desenvolveram ascas nem ascosporos em observações feitas até 9/12/69.

No experimento de ejeção de ascosporos observou-se o desenvolvimento de grande número de peritécios rostrados, com ejeção de ascosporos que puderam ser vistos nas tampas das caixas de petri, 14 dias após a transferência em água esterilizada, quando o meio de cultura foi o de aipo-agar-modificado. No outro meio de cultura usado no experimento, descrito na metodologia, não se observou a formação de muitos peritécios rostrados mas se constatou a ejeção de ascosporos.

No experimento de isolamento de ascosporos observou-se a formação de colônias conidiais, 10 a 15 dias após a justaposição das placas de cultura. Colônias isoladas foram repicadas e, posteriormente, purificadas por diluição, em meio

QUADRO 4 - Cruzamento de isolamentos conidiais de *C. lindemuthianum*

Culturas	C-17				C-20			
	Proto- peritécios	Asca	Ascosporos	Conídios	Proto- peritécios	Asca	Ascosporos	Conídios
Alfa	---	---	---	+++	---	---	---	+++
Gama	---	---	---	+++	+++	---	---	---
C-8	+++	---	---	---	---	---	---	---
C-14	+++	+++	---	---	---	---	---	+++
C-15	+++	+++	+++	---	---	---	---	+++
C-19	+++	+++	+++	---	---	---	---	---
C-21	+++	---	---	---	---	---	---	+++
C-22	---	---	---	+++	---	---	---	---
C-50	+++	+++	+++	---	---	---	---	---
C-51	+++	+++	+++	---	---	---	---	---
C-53	+++	+++	+++	---	---	---	---	---
C-31	+++	+++	---	---	---	---	---	+++
C-32	+++	+++	---	---	---	---	---	+++
C-17	---	---	---	+++	+++	+++	+++	---
C-20	+++	+++	+++	---	---	---	---	+++

(+) significa presença (-) ausência; leituras em 3 repetições. Em cruzamentos C-50 e C-51 com C-20, a % de peritécios com ascosporos foi baixíssima (menos de 5%).

de NGA, resultando 36 isolamentos ascospóricos dos quais 6 foram utilizados no teste de patogenicidade.

Os resultados do teste de patogenicidade, instalado em 4/11 e colhido em 2/12/69, apresentados no Quadro 5, indicam que todos os isolamentos testados foram patogênicos, pelo menos para a variedade Michelite e 150 (também Michelite). As variedades Dark Red Kidney, Perry Marrow, 151 e 152 estão segregando quanto à resistência ou suscetibilidade. Aparentemente, 3 isolamentos ascospóricos (F1-17, F1-30 e F1-31) estão se comportando como C-20, um dos pais, e 3 (F1-18, F1-24 e F1-29) como C-17, o outro pai.

QUADRO 5 - Teste de patogenicidade de C-17, C-20 e 6 isolamentos ascospóricos descendentes do cruzamento C-17 X C-20 (1)

Variedades de Feijoeiro	Culturas de <i>C. lindemuthianum</i>							
	C-17	C-20	F1-17	F1-18	F1-24	F1-29	F1-30	F1-31
Michelite	S	S	S	S	S	S	S	S
Dark Red Kidney	R/S	R	R	R	S/R	R	R	R
Perry Marrow	S/R	R	R	S	S/R	S	R	R
150	S	S	S	S	S	S	S	S
151	R/S	R	R	R	R/S	R	R	R
152	S/R	R	R	S	S	S	R	R
105	S	R	R	S	S	S	R	R
125	S	R	R	S	S	S	R	R

(1) = S indica suscetibilidade; R, resistência; R/S, 4 ou 3 plantas resistentes para 1 ou 2 suscetíveis; S/R, 4 ou 3 plantas suscetíveis para 1 ou 2 resistentes. Cada variedade inoculada constou de 5 plantas para cada isolamento testado.

Morfologia da fase ascogena de *C. lindemuthianum* (Figura 1).

Peritécios de conformação mais ou menos arredondada, de diâmetro variável (120 a 210 micra), na maioria dos casos 160 micra. Rostros, quando presentes, medindo 30 a 80 micra de comprimento, os menores em forma de papila e os maiores

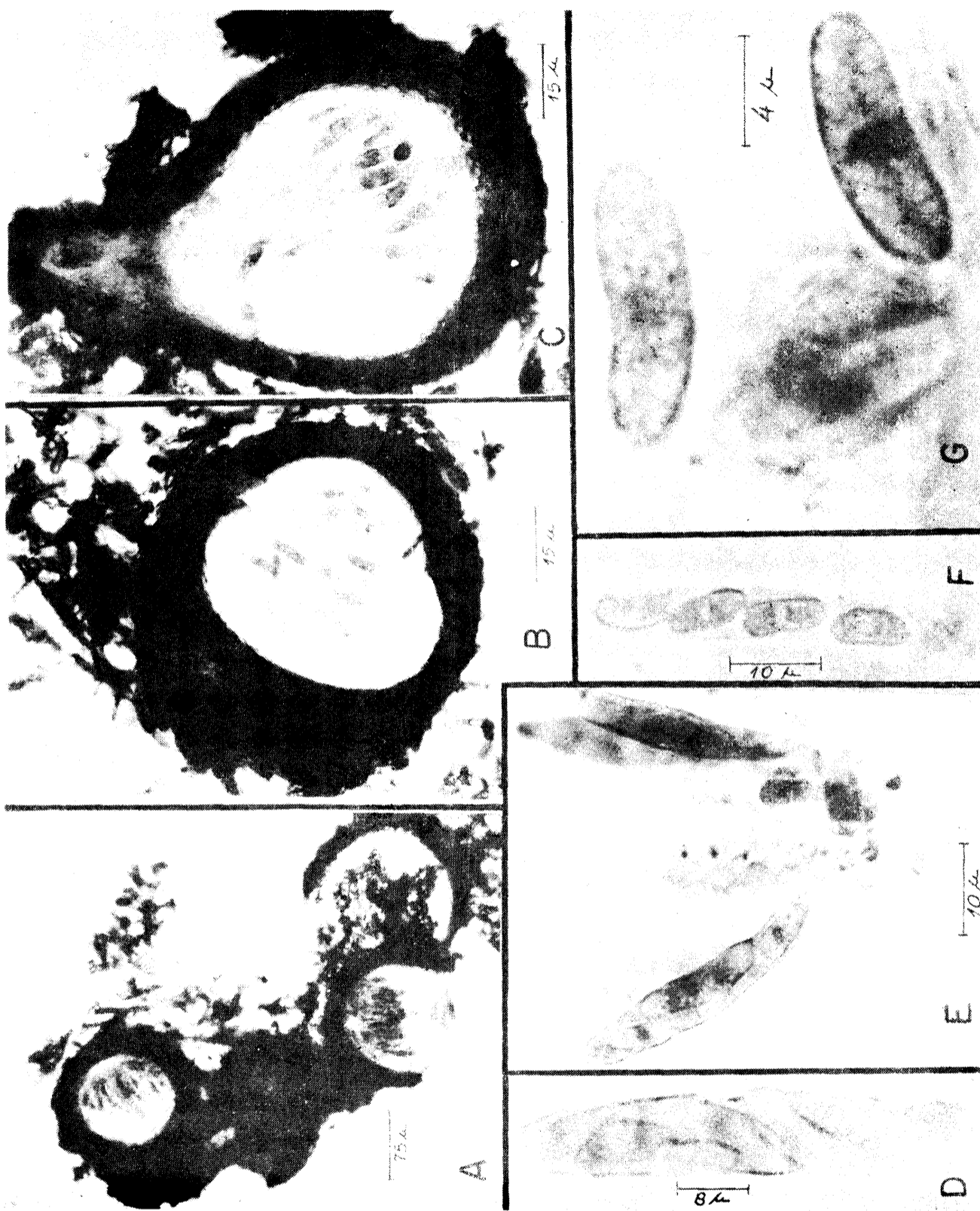


FIGURA 1. A-G. *Glomerella cingulata* f. *phaseoli*. A) Conjunto de peritécios. B) Peritécio com ascosporos soltos. C) Peritécio rostrado. D) Asca com 8 ascosporos. E) Conjunto de ascas. F) Asca com 4 ascosporos. G) Ascosporos.

alongados. O canal do rostro é forrado de perífises hialinas e filiformes. Os rostros podem ou não ser providos de pêlos pardos. Peritécios rostrados têm aspecto de garrafa abaulada. A parede do peritécio é inicialmente hialina e, à medida que o peritécio amadurece, se torna enegrecida a partir do ápice. As ascas, em número médio de 30, medem, ao 25º dia de idade, 60 X 8 micra (comprimento variável de 48 a 68 micra), e se mostram evanescentes ao 28-30º dia de idade, deixando os ascosporos livres dentro do peritécio; nos peritécios rostrados os ascosporos são ejetados. As ascas são envolvidas por paráfises filiformes; delicadas, visíveis até mais ou menos ao 27º dia de idade, a partir de então mostrando-se evanescentes. Ascosporos de dois tipos: alantoides, medindo em média 20X6,5 micra, e elipsoidais, medindo em média 10x4 micra, sendo que os primeiros se formam de 1 a 8 por asca (na maioria dos casos 4/asca) e os últimos, via de regra, em número de 8 por asca. O número máximo de ascosporos observados, por peritécio, foi de 60.

DISCUSSÃO

Segundo HAWKER (1957), estudos detalhados do efeito da natureza e concentração dos compostos nitrogenados sobre a esporulação em fungos são, surpreendentemente, poucos. Segundo LILLY e BARNETT (1951), parece ser geralmente aceito que um equilíbrio apropriado entre os constituintes do meio é muito importante no crescimento e esporulação dos fungos. HAWKER (1957) e LILLY e BARNETT (1951) citam o trabalho de WESTERGAARD e MITCHELL (1947) em que se constatou a importância da relação C/N no processo de fertilização em *Neurospora crassa*, a produção dos peritécios sendo desfavorecida por altas concentrações de glucose e nitrato de potássio. Segundo HAWKER (1957), ROBINSON (1926) mostrou que, enquanto uma concentração mínima inicial de nitrogênio no meio de cultura é essencial para o crescimento e produção de apotécios por *Pyronema confluens*, o processo reprodutivo é iniciado somente depois de quase completa exaustão de ion nitrato. Analisando os trabalhos acima mencionados e alguns outros, HAWKER (1957) faz a seguinte síntese: a quantidade mínima de nitrogênio permitindo esporulação está usualmente acima daquela na qual possa ter lugar o crescimento vegetativo esparso; se a quantidade for aumentada muito acima do valor mínimo, contudo, o crescimento vegetativo se torna muito vigoroso e a esporulação é, frequentemente, inibida; isto pode ser devido à exaustão de outros nutrientes essenciais pelo micélio em crescimento ou ao rápido acúmulo de substâncias deterioradas; compostos ni-

trogenados podem, contudo, ser inibitórios êles mesmos, e foi mostrado em vários exemplos que o nitrogênio ou outro composto nitrogenado particular pode ser usado completa ou quase completamente antes que possa ter lugar o início dos corpos frutíferos ou, algumas vezes, a sua maturação. Essas considerações são bem cabíveis aos resultados obtidos na 1a. e 2a. experiências do presente trabalho.

A diferença obtida no segundo experimento quando comparado com o primeiro pode ser explicada do seguinte modo: a adição de vitaminas alterou levemente a capacidade de aproveitamento dos nutrientes para finalidades de reprodução sexual. Essa explicação se apoia, em parte, no fato de BARNETT e LILLY (1947) terem provado que a formação de peritécios do fungo *C. fimbriata* em um meio de cultura era determinada pela quantidade de tiamina em relação com a quantidade de nutrientes no meio; a abundância de peritécios é condicionada tanto pela quantidade de tiamina como pela quantidade de nutrientes do meio.

MATHUR e col. (1950) relataram que, para a produção de conídios de *C. lindemuthianum*, os esporos com matriz utilizados como inóculo estimularam maior esporulação (conídios) do que esporos lavados livres de matriz. Como tôdas as experiências do presente trabalho foram feitas com esporos não lavados, os resultados da primeira e segunda, bem como das outras experiências, podem estar condicionados por possíveis substâncias estimuladoras de formação de esporos, principalmente se considerar que a matriz dos esporos é formada por vitaminas e que a raça gama de *C. lindemuthianum* foi comprovada ser parcialmente deficiente em biotina e inositol (MATHUR e col., 1950).

A variação de pH inicial que permitiu produção de peritécios, 3,7 a 6,5, é relativamente ampla. Segundo HAWKER (1957), o pH pode atuar diferentemente sobre os estágios sexual e assexual de um mesmo fungo. Comparando-se, então, os resultados deste trabalho com o de MATHUR e col. (1950), pode-se observar que a variação do pH para obtenção de peritécios é menos ampla do que para a produção de conídios; conídios foram produzidos até um pH próximo de 8,0 e peritécios até 6,5; ademais, acima do pH 6,0, mesmo os nutrientes sendo favoráveis ao desenvolvimento de peritécios, foi muito abundante o número de acérvulos (visíveis a olho nú).

Estudos nutricionais do presente trabalho foram feitos com meio basal contendo 1,00 g de KH_2PO_4 e 0,50g de

MgSO₄.7H₂O. Os resultados do quarto experimento mostram que quantidades menores de KH₂PO₄ e maiores de MgSO₄.7H₂O são mais apropriadas, se bem que as diferenças não tenham sido grandes.

Apesar da excessiva complexidade do efeito da luz sobre a esporulação de fungos, HAWKER (1957) diz ser possível dividir grosseiramente os fungos em 4 classes: (1) aqueles que são capazes de produzir esporos viáveis em completa escuridão e que não produzem esporos em grande número quando iluminado, (2) aqueles que, apesar de serem capazes de produzir esporos viáveis em completa escuridão, fazem-no mais livremente quando iluminado em algum período durante o desenvolvimento; (3) aqueles que são incapazes de produzir esporos viáveis na completa ausência de luz; e (4) aqueles nos quais a esporulação é realmente paralizada ou prevenida pela exposição luminosa em algum estágio do seu desenvolvimento. O fungo da antracnose do feijoeiro, para a produção de conídios, segundo o trabalho de MATHUR (1950), pertenceria a um grupo intermediário entre 1 e 2. Já para a produção de ascosporos, o experimento sobre a influência da luminosidade do presente trabalho mostra evidências de que o fungo pertenceria ao grupo 4. Quanto à luminosidade, portanto, a produção de ascosporos pelo fungo da antracnose do feijoeiro é bem diferente de *Glomerella magna*, para o qual se observou ser a luz essencial pelo menos por alguns minutos, nos 5 primeiros dias após o plaqueamento dos cruzamentos (WINSTEAD e col., 1966).

Em *Glomerella cingulata* se conhecem formas homotáticas e heterotáticas e nestas o heterotalismo está condicionado por vários fatores genéticos, conforme WHEELER (1954). Os resultados obtidos no experimento sobre cruzamento de isolamentos conidiais mostram que o fungo da antracnose do feijoeiro se assemelha muito às linhagens heterotáticas de *G. cingulata*, comprovando uma vez mais que *Glomerella* é evidentemente um gênero de transição com respeito ao mecanismo sexual. Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser interpretados do modo semelhante aos dos trabalhos com *Glomerella cingulata* apresentados por WHEELER, 1954, i.é. na base de gens que bloqueariam o desenvolvimento da fase ascógena em diferentes estágios, como por exemplo, formação das células iniciais, plasmogamia, cariogamia, meiose, mitose, etc. Pode-se também interpretar, ainda na base de gens, que os fatores genéticos necessários para a produção da fase ascógena estão incompletos nos diferentes isolamentos, complementando-se integralmente em algumas combinações com a linhagem C-17.

As observações feitas sobre a ejeção de ascosporos são

semelhantes àquelas de KAISER e LUKEZIC (1966) em *G.cingulata*, fase perfeita do *Gloeosporium musarum* Cooke e Masee, agente da Antracnose da banana, os quais observaram ejeção de ascósporos, em condições de alta umidade relativa (100%) ou presença de filme de água, até uma distância horizontal de 26 mm e distância vertical de 17 mm em ar parado. VON ARX (1957) também relata ser importante a alta umidade para o desenvolvimento de rostró em *G.cingulata* de folhas de orquídeas. Entretanto, o último autor não cita nada sobre ejeção de ascósporos, parecendo, portanto, ser o trabalho de KAISER e LUKEZIC (1966) o primeiro a comprovar esse fato. Nessas circunstâncias, o presente trabalho torna-se uma comprovação de que em *G.cingulata* os ascósporos podem ser ejetados com violência.

As dúvidas surgidas com relação ao trabalho de SHEAR e WOOD (1913) relatando pela primeira vez a fase ascógena de *C.lindemuthianum*, foram em parte devidas à falta de provas de patogenicidade. Essa dúvida particular foi dirimida para o presente trabalho, pois todos os isolamentos ascospóricos inoculados se mostraram patogênicos, pelo menos para a variedade Michelite, como mostram os resultados do Quadro 5. Entretanto, os resultados do presente trabalho não permitem assegurar se as culturas ascospóricas são originárias de peritécios autofecundados ou cruzados uma vez que os ascósporos isolados foram obtidos ao acaso de peritécios ao acaso e, segundo DRIVER e WHEELER (1955), linhagens auto-estéreis de *G.cingulata* podem ser autofecundadas por indução de hormônios sexuais em culturas acasaladas.

Observações morfológicas mostram que tamanho de peritécios, ascas e ascósporos caem dentro dos limites descritos para *G.cingulata* (JENKINS, Jr., 1962 e Von ARX, 1957). Seguindo, portanto, o ponto de vista de Von ARX (1957) de que *C.lindemuthianum* deve ser visto como forma especializada da forma básica *G.cingulata*, o autor propõe o nome de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et v.Schrenk f. *phaseoli* H.Kimati n.f.

CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. Foi obtida a fase perfeita de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scribn., agente da antracnose do feijoeiro, à qual se propõe o nome de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et v. Schrenk. f. *phaseoli* n.f.

2. A obtenção da fase perfeita de *C. lindemuthianum* depende de fatores genéticos e ambientais.

2.1. As linhagens do fungo da antracnose do feijoeiro se comportaram como heterotáticas, havendo formação de peritécios bem constituídos só em determinados acasalamentos.

2.2. Dos fatores ambientais ensaiados, foram importantes: nutrição ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e glucose em determinados níveis e relações), pH de 4 a 6 e ausência de luz. A umidade foi importante para o desenvolvimento de peritécios rostrados e ejeção de ascosporos.

3. Isolamentos ascospóricos foram patogênicos ao feijoeiro, pelo menos para a variedade Michelite.

SUMMARY

This paper deals with the perfect stage of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scribn. Two isolates which formed fertile perithecia when paired were used to determine some environmental conditions favorable to sexual reproduction; perithecia were formed in a semi-synthetic medium containing glucose, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , agar (20g/l) and water (1 liter); the favorable quantity of glucose and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ was, respectively, 4-10 and 0,15-0,60 g/l, maintaining a C/N ratio between 29,8:1 and 89,6:1; when vitamins were added to the medium, the favorable quantity of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ varied from 0,3 to 1,0 g/l, maintaining the quantity of glucose and the C/N ratio approximately the same; the most favorable quantity of KH_2PO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, were, respectively, 0,1-0,5 and 0,5-1,0 g/l; light was inhibitory to sexual reproduction, fertile perithecia being obtained only in conditions of continuous darkness or when the period of light do not exceed the first 3 days of incubation; the pH range favorable to fertile perithecia formation was 4,0 to 6,0; high humidity was important for beaked perithecia formation and for ascospores ejection.

In paired cultures, the conidial isolates behaved as heterothalic, fertile perithecia being formed only in determinate matings; some matings resulted in few fertile perithecia; others gave rise to perithecia with asci only, or to protoperithecia only.

Morphologically the ascogenous stage of *C. lindemuthianum* fell into the broad description of *Glomerella cingulata*.

Since *C.lindemuthianum* is pathogenic only to *Phaseolus* spp. it is proposed for the perfect stage the name *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et v.Schrenk. f.sp.*phaseoli* n.f.

LITERATURA CITADA

- ALEXOPOULOS,C.J., 1966 Introduction a la Micologia. XX+615 pp., Buenos Aires, EUDEBA.
- ALEXOPOULOS,C.J. e E.S.BENEKE, 1968 Laboratory manual for introductory Mycology. V+199 pp., Minneapolis, Burgess Publishing Company.
- BARNETT,H.L. e V.G.LILLY, 1947 The relation of thiamin to the production of perithecia by *Ceratostomella fimbriata*. Mycologia 39:699-708.
- BUXTON,E.W., 1960 Heterokaryosis, saltation, and adaptation. In Plant Pathology, An Advanced Treatise, 2, cap. 10, 359-405 (HORSFALL, J.G. e A.E.DIMOND, ed., New York, Academic Press).
- CAMPBELL,R.N., 1958 Nutrient requirements for the production of perithecia by *Ceratocystis variospora* and other species. Am.Jour.Bot. 45:263-270.
- COCHRANE,V.W., 1958 Physiology of fungi. XII+524 pp. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- DRIVER,C.H. e H.E.WHELLER, 1955 A sexual hormone in *Glomerella*. Mycologia 47:311-316.
- EDGERTON,C.W., 1914 Plus and minus strains of *Glomerella*. Amer.J.Bot. 1:244-254.
- EDGERTON,C.W., 1915 Effect of temperature on *Glomerella*. Phytopathology 5:247-259.
- EMERSON,S., 1966 Mechanisms of inheritance, 1. Mendelian. In The Fungi, An Advanced Treatise, 2. The Fungal Organism, cap. 16, 513-566 (AINSWORTH,G.C. e A.S.SUSSMAN,ed., New York, Academic Press).
- ESSER,K. e R.KUENEN, 1967 Genetics of fungi. IX+500 pp. New York, Springer-Verlag.

- FINCHAM, J.R.S. e P.R.DAY, 1965 Fungal genetics. X+326 pp. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- HAYWARD, A.C., 1964 Bacteriophage sensitivity and biochemical group in *Xanthomonas malvacearum*. J.Gen. Microbiol. 35:287-298.
- HAWKER, L.E., 1957 The physiology of reproduction in fungi. 128 pp. Cambridge, Cambridge University Press.
- JENKINS, Jr., S.R., 1962 Genetic, taxonomic and physiologic studies of two *Glomerella* species pathogenic on Cucurbits. V+45 pp., tese de Ph.D., Raleigh, North Carolina State College.
- KAISER, W.J. e F.L.LUKEZIC, 1966 Occurrence, sporulation and pathogenicity studies with *Glomerella cingulata* associated with crown rot of boxed bananas. Mycologia 58:397-405.
- KIMATI, H., 1966 Algumas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scribn., 1888, que ocorrem no Estado de São Paulo. 28 pp (mimeografado), tese M.S., Piracicaba, ESALQ.
- LILLY, V.G. e H.L.BARNETT, 1951 Physiology of the fungi. XII+464, New York, McGraw-Hill Book Company, Inc.
- LUCAS, G.B., 1946 Genetics of *Glomerella*. Nuclear phenomena in the ascus, Amer. J.Bot. 33:802-806.
- MATHUR, R.S., H.L.BARNETT e V.G.LILLY, 1950 Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. Phytopathology 40:104-114.
- McGAHEN, J.W. e H.E.WHEELER, 1951 Genetics of *Glomerella*. IX. Perithecial development and plasmogamy. Amer.J.Bot. 38:610-617.
- MULLER, H.R.A., 1926 Physiologic formes of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri et Cav. in the Netherlands. Phytopathology 16:369.
- OLIVE, L.S., 1951 Homothallism and heterothallicism in *Glomerella*. Trans. N.Y.Acad.Sci. 13:238-242.

- RAPER, J.R., 1966 Life cycles, basic patterns of sexuality, and sexual mechanisms. In the Fungi, An Advanced Treatise, 2. The Fungal Organism, cap. 15, 473-511 (AINSWORTH, G.C. e A.S.SUSSMAN, ed., New York, Academic Press).
- ROBINSON, W., 1926 The conditions of growth and development of *Pyronema confluens* Tul. *P. omphaloides* (Bull.) Fuckel Ann.Bot., Lond. 40:245-272.
- SASS, J.E., 1951 Botanical Microtechnique. XI+228 pp., 2a. ed. IOWA, The Iowa State College Press.
- SHEAR, C.L. e A.K.WOOD, 1913 Studies of fungous parasitas belonging to the genus *Glomerella*. U.S.D.A. - Bureau of Plant Industry, Bull. 252. 110 pp.
- TURIAN, G., 1966 Morphogenesis in Ascomycetes. In The Fungi, An Advanced Treatise, 2, The Fungal Organism, cap. 11, 339-385 (AINSWORTH, G.C. e A.S.SUSSMAN, ed., New York Academic Press).
- VAN DER GIESSEN, A.C. e N.A.VAN STEENBERGEN, 1957 A new method of testing beans for Anthracnose. Euphytica 6:90-93.
- Von ARX, J.A., 1957 Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathol. z. 29:413-468.
- WHEELER, H.E., 1954 Genetics and evolution of heterothallism in *Glomerella*. Phytopathology 44:342-345.
- WHEELER, H.E. e C.H.DRIVER, 1953 Genetics and cytology of a mutant, dwarf spored *Glomerella*. Amer.Jour.Bot. 40:694-702.
- WHEELER, H.E., C.H.DRIVER e C.CAMPA, 1959 Cross and self-fertilization in *Glomerella*. Amer.J.Bot. 46:361-365.
- WHEELER, H.E. e J.W.McGAHEN, 1952 Genetics of *Glomerella*. X. Genes affecting sexual reproduction. Amer.J.Bot. 39:110-119.
- WHEELER, H.E., L.S.OLIVE, C.T.ERNEST e C.W.EDGERTON, 1948 Genetics of *Glomerella*. V. Crozier and ascus development. Amer.J.Bot. 35:722-729.

WESTERGAARD, M. e H.K. MITCHELL, 1947 *Neurospora*. V. A synthetic medium favouring sexual reproduction. *Amerc. J. Bot.* 34:573-577.

WINSTEAD, N.N., S.F. JENKINS, Jr. L.T. LUCAS e col. 1966 Influence of light on perithecial formation in *Glomerella magna*. *Phytopathology* 56:134-135.

ZAUMEYER, W.J. e H. REX THOMAS, 1957 A monographic study of bean diseases and methods for their control. U.S.D.A. Tech. Bull. 868. 255 pp.

