

J A C I R O S O A V E

Engenheiro Agrônomo

Instituto Agronômico, Campinas

Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas

ESTUDO DO CRESCIMENTO VEGETATIVO E DA ESPORULAÇÃO EM MEIOS
DE CULTURA DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES, DE Piricularia oryzae
CAVARA, AGENTE DO BRUSONE DO ARROZ.

Orientador: Prof. Dr. Ferdinando Galli

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de doutor em
agronomia.

Piracicaba
Estado de São Paulo - Brasil

- 1972 -

À memória de meus pais, exemplos de dedicação ao trabalho e
à família,

e

À Maria Elisa, minha esposa,

D E D I C O .

A G R A D E C I M E N T O S

O autor consigna seus sinceros agradecimentos:

- Ao Instituto Agronômico do Estado em Campinas, à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Departamento de Fitopatologia, que possibilitaram sua participação no Curso Pós Graduado de Fitopatologia e a materialização desta pesquisa.

- Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pela valiosa colaboração desde o início dos trabalhos.

- Ao Professor Dr. Ferdinando Galli, pela colaboração como orientador deste trabalho.

- Ao Engenheiro Agrônomo Toshio Igue, da Seção de Técnica Experimental e Cálculo, do Instituto Agronômico, pela orientação nas análises estatísticas.

- Aos Professores Dr. Eric Balmer e Dr. Paulo de Campos Torres de Carvalho, pelas sugestões e revisão dos originais.

- Ao Dr. William José da Silva e ao Engenheiro Agrônomo Osvaldo Paradela Filho, pela revisão dos originais.

- Ao Engenheiro Agrônomo Helí Camargo Mendes pelo incentivo e correção dos originais.

- À C.A.P.E.S., pelo patrocínio da bolsa que tornou possível a assistência ao Curso de Pós Graduação e a execução desta pesquisa.

- Ao Conselho Nacional de Pesquisas, do qual o autor é bolsista Pesquisador-Assistente, Proc. 10.803/70, pelo auxílio fornecido.

- A todos os colegas do III Ciclo do Curso Pós Graduado de Fitopatologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desta pesquisa.

Í N D I C E

	Página
1. - INTRODUÇÃO	1
2. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 - Meios naturais para cultura de <u>Piricularia oryzae</u> Cav.	3
2.2 - Meios semi-sintéticos e sintéticos	5
3. - MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 - Local e época de realização de experimentos	8
3.2 - Obtenção dos isolados de <u>P.oryzae</u> Cav.	9
3.2.1 - Isolamentos utilizados	9
3.3 - Meios de culturas utilizados	10
3.3.1 - Meio B de Takahashi	10
3.3.2 - Meio A de Takahashi	10
3.3.3 - Meio de Tochinai	11
3.3.4 - Meio de Misato	11
3.3.5 - Meio de Czapek	11
3.3.6 - Meio basal de Otsuka modificado	12
3.3.7 - Meio de farelinho de arroz	12
3.3.8 - Meio B.D.A.	12
3.3.9 - Meio básico de ágar modificado	13
3.3.10 - Meio de Tanaka	13
3.3.11 - Meio basal de Lilly & Barnett	14
3.4 - Preparo dos meios para instalação dos experimentos	15
3.5 - Corante utilizado	15

3.6	- Experimento I: Comportamento de dez isolamentos de <u>P.oryzae</u> Cav. obtidos de diferentes locais do Estado de São Paulo, em dez meios de cultura	15
3.7	- Experimento II: Esporulação de <u>P.oryzae</u> em meio basal acrescido de diferentes relações carbono/nitrogênio, utilizando dextrose como fonte de carbono e caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio	17
3.8	- Experimento III: Crescimento vegetativo e esporulação de cinco isolamentos de <u>P.oryzae</u> na melhor faixa de relação carbono/nitrogênio demonstrada no experimento II	19
4.	- RESULTADOS	21
4.1	- Experimento I	21
4.1.1	- Crescimento vegetativo	21
4.1.2	- Esporulação	23
4.1.3	- Esporulação por placa	26
4.2	- Experimento II	29
4.3	- Experimento III	31
4.3.1	- Crescimento vegetativo	31
4.3.2	- Esporulação	33
4.3.3	- Esporulação por placa	35
5.	- DISCUSSÃO	40
6.	- CONCLUSÕES	44
7.	- RESUMO	46
8.	- SUMMARY	49
9.	- BIBLIOGRAFIA	50

1 - INTRODUÇÃO

No Brasil, de 1965 a 1967, dentre os cereais o arroz foi o segundo em área cultivada, perdendo somente para o milho (2). Conforme dados de 1966 (10), a cultura se concentra em seis estados brasileiros, que englobam 82% da área cultivada e cerca de 83% da produção.

Dos estados brasileiros somente o Rio Grande do Sul possui grandes áreas irrigadas e sua produtividade é a melhor do País (10). Os demais estados, incluindo São Paulo, apresentam produtividade ainda bastante baixa, devido a uma série de fatores, dentre os quais a inexistência de variedades altamente produtivas em condições de sequeiro e resistentes a pragas e doenças (7).

No Estado de São Paulo, segundo levantamento realizado por FRATTINI e SOAVE (6), em 1970 a área cultivada foi de 517304 ha., sendo 485.090 ha. em sequeiro e 32214 ha. irrigados.

De acordo com o mesmo levantamento, foi possível concluir que o principal problema sanitário da cultura é o brusone, doença conhecida no mundo inteiro como um sério obstáculo ao cultivo deste cereal. No Estado de S. Paulo tal doença foi constatada em 1931, na região de Sorocaba (16), e desde então não se conhecia o prejuízo que vinha causando à orizicultura no decorrer dos anos. Um estudo nesse sentido foi realizado por FRATTINI e SOAVE (6), em 1970, segundo o qual, no período de 1965/70, a perda total de arroz em casca causada pelo brusone, estimada para o Estado de São Paulo, - foi de 9,3% o que corresponde aproximadamente a 60000 toneladas do cereal, anualmente.

A denominação brusone, dada à doença, é de origem italiana (3, 33). Seu agente causador é um fungo pertencente à classe dos Deuteromicetos, ordem Moniliales, família Moniliaceae, gênero Piricularia e espécie: Piricularia oryzae Cav. (26). Foi classificado por Cavara em 1891, na Itália (21,25).

Sendo o brusone a mais importante doença da cultura do arroz, pensou-se em iniciar de imediato, um programa para obtenção de variedades resistentes, por não onerar diretamente a cultura, como acontece com o controle por produtos químicos.

Após a coleta de material de plantas de arroz com sintomas da doença, foram obtidos diversos isolamentos do patógeno em cultura monospórica, sendo os trabalhos orientados - para a determinação de raças patogênicas de P.oryzae. Porém, logo no início do programa, notou-se a grande variabilidade do patógeno, confirmando a pesquisa realizada por OU (20). - Concomitantemente, "in vitro" foi notada também uma grande variação de caracteres morfológicos e fisiológicos do patógeno, de modo que os dados de raças patogênicas até então obtidos não foram aproveitados para os trabalhos futuros, em virtude da insegurança de sua estabilidade.

Os fitopatologistas que trabalham no campo de determinação de raças patogênicas de Piricularia oryzae Cav. constantemente têm tentado encontrar um meio de cultura ou uma técnica cultural adequada para obter uma boa esporulação e estabilidade na patogenicidade dos isolamentos. Isto porque, para se fazer uma comparação válida entre reações de hospedeiros, ou de variedades diferenciais a diferentes raças patogênicas, em estudos básicos para a identificação de raças ou para o estabelecimento de diferenciais, um dos mais importantes requisitos é a uniformidade do inóculo, na tentativa de reduzir o tanto quanto possível a variabilidade do patógeno devido a diferenças de ambientes (27).

A orientação dos trabalhos passou a ser no sentido da nutrição do fungo, para se conhecer melhor o comportamento - dos isolamentos obtidos no Estado de São Paulo, em diversos meios de cultura porque, conforme o isolamento utilizado, embora cultivado sempre no mesmo meio de cultura, com todas as demais condições ambientes controladas, ora esporulava abun-

dantemente, ora só apresentava crescimento vegetativo sem esporulação alguma, dificultando sobremaneira o planejamento dos trabalhos de inoculação.

Foi então projetada esta pesquisa, cujo principal objetivo foi verificar o comportamento de isolamentos de P.oryzae oriundos de diferentes localidades do Estado de S.Paulo em vários meios de cultura, a fim de se eleger o melhor para a obtenção de esporulação abundante, condição intrínseca aos trabalhos que deverão ter continuidade, quais sejam, as inoculações de plantas de arroz com a finalidade de selecionar as que apresentem resistência ao patógeno.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Meios naturais para cultura de Piricularia oryzae Cav.

Apesar de todos os esforços envidados pelos pesquisadores, parece que ainda não foi conseguido um meio de cultura ou uma técnica cultural satisfatória para se conseguir uma boa esporulação e estabilidade de patogenicidade dos isolamentos de P.oryzae. SUZUKI (27) aponta dois motivos para explicar este insucesso até o momento: o uso de meios naturais e a grande variabilidade do patógeno em crescimento, esporulação e patogenicidade, embora em culturas monospóricas.

SUZUKI (27) relata que no Japão, os meios de palha de arroz-ágar e de batata-sacarose-ágar, com 1% de sacarose, foram usados durante muito tempo e ainda hoje são bastante utilizados para obtenção de conídios e para conservação de culturas de P.oryzae. O mesmo autor ainda afirma que devido à variação de seus constituintes, como ocorre em todos os meios naturais, eles nem sempre são satisfatórios porque certos isolamentos, em cultivo continuado em meio natural, acusam perda de capacidade de esporulação e de patogenicidade.

Os fitopatologistas norte-americanos utilizam muito o meio de farelinho de arroz para obtenção de esporos e manutenção de culturas de P.oryzae, após este meio ter sido recomendado em 1948 por HENRY & ANDERSEN (8), conforme se pode verificar nos trabalhos de LATTERELL (11) e de ATKINS et al. (1). Entretanto, segundo SUZUKI (27), referido meio não se mostra inteiramente satisfatório para esporulação e manutenção de culturas do patógeno porque os resultados, quando bons, não são constantes para todos os isolamentos.

A grande maioria dos trabalhos sobre necessidades nutricionais de P.oryzae foram realizados levando em consideração o crescimento vegetativo dos isolamentos (12, 17, 18, 19, 30). Todavia, segundo SUZUKI (27), poucos estudos foram orientados no sentido das necessidades nutricionais para a esporulação do fungo.

Foi relatado por WEINTRAUB (34, 35) que certos componentes do farelinho e do óleo de arroz, particularmente esteróis, saponinas esteroidais, amins esteroidais e alfa-tocoferol, dentro de sua fração não saponificável, estimulam a germinação dos conídios, especialmente na formação do tubo germinativo, embora não estimulem a produção de conídios. Entretanto, segundo SUZUKI (27), Hirata, em 1961, notou que certa substância na palha e no farelinho de arroz proporcionava abundante crescimento de micélio e formação de conídios, porém, não identificou quimicamente os constituintes desta substância.

HENRY & ANDERSEN (8), em 1948, utilizando meio de farelinho de arroz, consideraram-no o melhor dentre os meios naturais por eles estudados do ponto de vista de esporulação, e citam que a temperatura ideal para a produção de conídios foi de 28°C, tendo o meio um pH na faixa de 4,9 a 7,5. Todavia, CHUNG & LA (5), em 1962, comparando o meio de farelinho de arroz com o meio de tomate e o meio V-8, concluíram da superioridade dos dois últimos sobre o primeiro.

TAKAHASHI (29), em 1955, utilizou decocção de palha de arroz como um dos constituintes do meio por ele elaborado, com real sucesso para seus isolamentos, tendo SUZUKI (28), - em seus estudos sobre influência da luz na esporulação de P. oryzae, conseguido o mesmo sucesso utilizando grãos de cevada inteiros como principal constituinte do meio; HUNG & CHIEN (9), visando obter um bom substrato para o desenvolvimento do patógeno também tiveram sucesso com o uso de grãos de arroz autoclavados com água.

LOZANO & GÁLVEZ (15), em 1967, em estudos sobre temperatura para o crescimento e esporulação de P. oryzae, utilizaram o meio de batata-dextrose-ágar acrescido de 150 ml de água de coco por litro de meio, e concluíram que 28°C foi a melhor temperatura para crescimento vegetativo, mas que a temperatura ótima para esporulação variava com a raça. Mostraram ainda a existência de correlação positiva entre a capacidade de esporulação e a patogenicidade.

2.2 - Meios semi-sintéticos e sintéticos

Desde que TAKAHASHI (29) relatou um novo método cultural que envolvia o uso de novas técnicas juntamente com o meio semi-sintético por ele elaborado, numerosas pesquisas foram realizadas visando compor um meio de cultura que proporcionasse abundante esporulação e boa estabilidade às culturas de P. oryzae, embora TOCHINAI & NAKANO (31), em 1940, já houvessem elaborado um meio totalmente sintético, onde a fonte de carbono era a sacarose e a de nitrogênio o nitrato de potássio.

Segundo OTSUKA (19), Misato em 1957, visando esporulação e crescimento do patógeno, estudou um meio semi-sintético constituído de amido solúvel e extrato de levedura, considerando-o eficiente para muitos de seus isolamentos. Isto foi confirmado por TSENG (32) que, visando esporulação, tes-

tou 14 meios de cultura, sendo a maioria semi-sintéticos, para cinco raças de P.oryzae, e concluiu que nenhum foi eficiente a todas as raças, mas que o meio de Misato mostrou-se o mais favorável à maioria delas.

Estudando meios de cultura que proporcionassem melhor esporulação e estabilidade às culturas de P.oryzae, OTSUKA (19) testou comparativamente o meio sintético de Czapek, meios A e B de Takahashi e meio de Misato, que são semi-sintéticos, com diversos meios naturais. Para crescimento vegetativo os meios A e B de Takahashi se mostraram tão bons quanto o meio de batata-sacarose-ágar, enquanto para a formação de conídios os melhores foram o meio B de Takahashi, meio de Misato e meio de batata-sacarose-ágar.

Ainda o mesmo autor, utilizando meio sintético de Tanaka, testou 32 fontes de carbono incluindo carboidratos, álcoois superiores e ácidos orgânicos, para 47 isolamentos de P.oryzae. Avaliou o crescimento após incubação durante 14 dias a 28°C e concluiu que as melhores fontes de carbono foram sacarose, dextrose, maltose, frutose, lactose e xilose. Para realização desse trabalho OTSUKA se baseou em ensaios desenvolvidos por LEAVER, LEAL & BREWER (12). Estes autores demonstraram que o bom desenvolvimento do fungo estava ligado à presença de tiamina e de biotina no meio de cultura, pois estas duas vitaminas proporcionavam eficiente aproveitamento do carbono das fontes existentes no substrato. Mostraram também a vantagem do uso de dextrose e de caseína hidrolizada como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Segundo OTANI (17), em pesquisa de fontes de nitrogênio que favorecessem o crescimento vegetativo de P.oryzae, - nitrato de potássio, nitrato de sódio, glicina, L-alanina, - ácido aspártico, ácido DL-glutâmico e asparagina se revelaram as mais favoráveis. Esses resultados foram praticamente confirmados por OTSUKA (19) em 1963, quando estudando fontes de nitrogênio para o crescimento de P.oryzae, utilizou o meio

basal de Tanaka acrescido de 1 g de sacarose como fonte de carbono e testou nitrato de potássio, nitrato e nitrito de sódio, e mais 19 aminoácidos, concluindo que as fontes de nitrogênio mais eficientes foram nitrato de potássio, nitrato de sódio, ácido L-aspártico, L-asparagina, L-arginina, L-alanina, L-prolina, L-serina, glicina, L-histidina e ácido L-glutâmico.

CHEN et al. (4), estudando fontes de carbono e de nitrogênio para P.oryzae, concluíram que as melhores em ordem decrescente, foram maltose, dextrose, frutose, sacarose, lactose, amido solúvel, xilose, asparagina, galactose e arabinose. Dentre 22 aminoácidos testados somente oito se mostraram favoráveis ao fungo.

LEE (13) em 1967, realizando o mesmo estudo feito por Otsuka e por Chen, com a mesma finalidade, relata que dentre 19 fontes de nitrogênio testadas as melhores foram nitrato de potássio, glicina, ácido glutâmico e ácido aspártico, chegando, portanto, a conclusões semelhantes às dos pesquisadores anteriores.

SUZUKI (27) realizou um estudo bastante profundo no sentido de esclarecer a nutrição de P.oryzae, visando abundante esporulação e estabilidade na patogenicidade das culturas, tentando desenvolver um meio de cultura semi-sintético. Estudou cada um dos seguintes componentes em diferentes quantidades e em nove combinações: extrato de levedura em pó, amido solúvel, dextrose, sacarose, fosfato di-potássico, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e cloreto férrico. Comparou cada uma de suas combinações com os meios naturais de batata-sacarose-ágar, meio de farelinho de arroz e com o meio semi-sintético de Misato. Concluiu que uma de suas combinações era superior aos demais, chamando-a de "meio básico de ágar". Na continuação de seus trabalhos estudou substâncias estimulantes de esporulação e concluiu que a adição de Tween 80 ao seu meio original proporcionava melhores resultados na

esporulação de certos isolamentos, e a este novo meio denominou "meio básico de ágar modificado".

OTSUKA (19) e SUZUKI (27) citam ainda certos isolamentos que dificilmente esporulam, mesmo nos meios mais complexos. Para estes Otsuka recomenda o uso de seu meio basal acrescido de 20 g de sacarose e 1 g de nitrato de amônio, como fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente. Mesmo assim, se o isolamento não esporular, recomenda substituir a sacarose por 0,84% de carbono de uma das seguintes fontes: - glicérol, xilose, dextrose, frutose, sorbose, sorbitol, galactose, manose, manitol, lactose, dextrina ou amido solúvel; e substituir o nitrato de amônio por 0,035% de nitrogênio de uma das seguintes fontes: sulfato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de sódio, extrato de carne, polipeptona, farinha de soja ou caseína hidrolizada.

Como se pode notar, vários pesquisadores estudaram meios de cultura destinados ao cultivo de P.oryzae "in vitro", porém foram raros os que atentaram ao problema da esporulação com profundidade, como o fizeram LEAVER, LEAL & BREWER (12), OTSUKA (19) e SUZUKI (27).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Locais e épocas de realização dos experimentos

Os experimentos aqui relatados foram realizados de 1969 a 1972, nos laboratórios de Fitopatologia do Departamento de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba, e da Seção de Microbiologia Fitotécnica, do Instituto Agrônomo do Estado, em Campinas.

3.2 - Obtenção dos isolamentos de P.oryzae Cav.

De materiais provenientes de dez localidades diferentes do Estado de São Paulo, a partir de folhas e panículas de plantas de arroz com sintomas típicos da colonização por P.oryzae Cav., foram obtidos isolamentos do patógeno pelo método de cultura de tecido, em meio de batata-dextrose-ágar. Na coleta do material para a obtenção dos isolamentos procurou-se visitar os municípios que mais representassem as regiões produtoras, em locais bem distantes um do outro.

Após purificação através de três repicagens sucessivas em meio de batata-dextrose-ágar, cada isolamento foi repicado para a obtenção de culturas monospóricas pelo processo de diluição em placas de acordo com RIKER & RIKER (24). De cada isolamento original tomou-se apenas uma cultura monospórica.

3.2.1 - Isolamentos utilizados

Foram utilizados dez isolamentos de P.oryzae Cav. oriundos de culturas monospóricas, cuja relação consta do quadro 1.

QUADRO 1.- Relação dos isolamentos de *P.oryzae* Cav. em culturas monospóricas utilizados nos estudos comparativos de crescimento vegetativo e de esporulação em meios de cultura

Nº de Registro	Variedade de arroz	Parte da planta	Localidade
Fito. CIA 569	IAC-1246	panícula	Rio Claro
Fito. CIA 570	IAC-1246	folha	Capivari
Fito. CIA 571	IAC-64-47	panícula	Botucatu
Fito. CIA 572	Batatais	folha	Restinga
Fito. CIA 573	IAC-64-47	folha	Registro
Fito. CIA 574	IAC-64-25	folha	Pindamonhang.
Fito. CIA 575	Dour.Precoce	folha	Morro Agudo
Fito. CIA 577	Batatais	folha	Batatais
Fito. CIA 578	Batatais	panícula	Altinópolis
Fito. CIA 579	IAC-64-4	folha	S.J.da Barra

3.3 - Meios de cultura utilizados

3.3.1 - Meio B de Takahashi

100 g de palha de arroz, 10 g de sacarose, 15 g de ágar-ágar e água destilada para 1 litro. No preparo procede-se à cocção da palha de arroz em 1 litro de água destilada durante 30 minutos; filtra-se; completa-se o volume a 1 litro; adicionam-se a sacarose e o ágar. Após a fusão do meio ajusta-se o pH a 6,5 e autoclava-se a 120°C, durante 20 minutos (29).

3.3.2 - Meio A de Takahashi

10 g de sacarose, 10 g de peptona, 5 g de cloreto de sódio, 5 g de extrato de levedura em pó, 15 g de ágar-ágar, água destilada para 1 litro. Dissolve-se cada componente so

lido em água destilada, completa-se o volume a 1 litro; funde-se, ajusta-se o pH a 6,5 e autoclava-se a 120°C, durante 20 minutos (29).

3.3.3 - Meio de Tochinai

É um meio semi-sintético, composto de 30 g de sacarose, 2 g de nitrato de potássio, 0,5 g de fosfato monopotássico, 0,5 g de fosfato dipotássico, 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,1 g de cloreto de cálcio, traços de cloreto férrico (3 gotas de uma solução a 5%), 20 g de ágar-ágar, água destilada para 1 litro. No preparo deste meio, dissolvem-se, um por vez, todos os componentes sólidos, em água destilada e completa-se o volume a 1 litro. A seguir, ajusta-se o pH a 6,5 após a fusão do meio, e autoclava-se durante 20 minutos a 120°C (31).

3.3.4 - Meio de Misato

10 g de amido solúvel, 1 g de extrato de levedura, 20 g de ágar-ágar, água destilada para 1 litro. Dissolvem-se os componentes sólidos, por último o ágar, em água destilada, completa-se o volume a 1 litro, funde-se o meio, ajusta-se o pH a 6,5 e autoclava-se a 120°C, durante 20 minutos (19).

3.3.5 - Meio de Czapek

30 g de sacarose, 20 g de nitrato de sódio, 1 g de fosfato dipotássico, 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,5 g de cloreto de potássio, 0,01 g de sulfato ferroso heptahidratado, 15 g de ágar-ágar, água destilada para 1 litro. O preparo é semelhante ao dos demais: dissolvem-se os componentes sólidos em água destilada e completa-se o volume a 1 litro. Ajusta-se o pH a 6,5 após a fusão do meio, e autoclava-se durante 20 minutos, a 120°C (19).

3.3.6 - Meio basal de Otsuka modificado

É um meio semi-sintético bastante completo, cujos componentes são: 17 g de dextrose, 3 g de caseína hidrolizada, 1 g de fosfato monopotássico, 1 g de fosfato dipotássico, 0,5 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,1 g de cloreto de cálcio, 0,009 g de sulfato de zinco hepta-hidratado, 0,0075 g de sulfato ferroso hepta-hidratado, 0,0068 g de sulfato cuproso penta-hidratado, 0,002 g de sulfato de manganês hepta-hidratado, 5 microgramas de biotina, 1 mg de tiamina, 20 g de ágar-ágar, água destilada para 1 litro (19).

No preparo deste meio a dextrose, a caseína, os fosfatos mono e dipotássico, o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio são dissolvidos, após a pesagem, diretamente em água destilada. Dos demais componentes são preparadas soluções, das quais se tomam alíquotas adequadas. Funde-se e ajusta-se o pH a 6,8. Autoclava-se durante 20 minutos a 120°C, após a adição do ágar e, no final, são acrescentadas aseticamente a biotina e a tiamina.

3.3.7 - Meio de farelinho de arroz - "Rice polish agar"

Este é um meio natural bastante simples de elaborar, constando de 20 g de farelinho de arroz, 20 g de ágar-ágar, e água destilada para 1 litro. Para seu preparo ferve-se o farelinho de arroz em 1 litro de água destilada durante 20 minutos, filtra-se e completa-se o volume a 1 litro. Adiciona-se o ágar, ajusta-se o pH a 6,5 após a fusão do meio, e autoclava-se a 120°C durante 20 minutos (8).

3.3.8 - Meio de batata-dextrose-ágar - BDA

É o meio de uso mais comum para isolamentos, repicagens e produção de inóculos de fungos em geral, em laboratórios de fitopatologia. É composto de 200 g de batatas des-

casca das, 20 g de dextrose, 20 g de ágar-ágar, e água destilada para 1 litro. Para sua elaboração fervem-se as batatas descascadas e cortadas em fatias bem finas, durante 20 minutos, em água destilada, filtra-se em gaze e completa-se o volume do filtrado para 1 litro. Adicionam-se a dextrose e o ágar, funde-se, ajusta-se o pH a 6,5 e autoclava-se a 120°C durante 20 minutos (24).

3.3.9 - Meio básico de ágar modificado

Proposto por SUZUKI para esporulação de P.oryzae Cav., compõe-se de 4 g de extrato de levedura em pó, 4 g de dextrose, 0,6 ml de Tween 80, 0,6 g de fosfato dipotássico, 0,6 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,1 g de cloreto de cálcio, traços de cloreto férrico hexa-hidratado (3 gotas de uma solução a 5%), 20 g de ágar-ágar, água destilada para 1 litro. No seu preparo, bastante simples, dissolvem-se os componentes em 1 litro de água destilada, sendo o ágar o último a ser dissolvido. Funde-se, ajusta-se o pH a 6,5 e autoclava-se durante 20 minutos, a 120°C (27).

3.3.10 - Meio de Tanaka

É um meio semi-sintético, bastante completo. Como fonte de carbono utiliza 20 g de dextrose, e como fonte de nitrogênio, 3 g de nitrato de potássio. Compõem ainda 1 g de fosfato monopotássico, 1 g de fosfato dipotássico, 0,5 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,1 g de cloreto de cálcio hexa-hidratado, 7,5 mg de sulfato ferroso hepta-hidratado, 2 mg de sulfato de manganês hepta-hidratado, 6 mg de sulfato de cobre hepta-hidratado, 75 mg de cloreto de zinco, 9 mg de molibdato de amônio tetra-hidratado, 5 microgramas de biotina, 1 mg de tiamina, 20 g de ágar-ágar, e água destilada para 1 litro (30).

Para sua elaboração dissolvem-se a dextrose, o nitrato de potássio, os fosfatos mono e dipotássicos, o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio em 500 ml de água destilada. Preparam-se soluções de cada um dos demais componentes e pipetam-se alíquotas adequadas a proporcionar as quantidades desejadas. Completa-se o volume a 1 litro, adiciona-se o ágar, ajusta-se o pH a 6,5 após a fusão do mesmo e autoclava-se a 120°C, durante 20 minutos.

3.3.11 - Meio basal de Lilly & Barnett

Meio basal sugerido por Lilly & Barnett para estudos de fontes de carbono e nitrogênio, recebeu um acréscimo de 0,1 g de cloreto de cálcio por litro de meio, porque todos os meios semi-sintéticos sugeridos para esporulação de P.oryzae possuem este sal de cálcio. Sua composição é a seguinte: 1 g de fosfato monopotássico, 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,1 g de cloreto de cálcio, 0,2 mg de sulfato férrico, 0,2 mg de sulfato de zinco, 0,1 mg de sulfato de manganês, 5 microgramas de biotina, 100 microgramas de tiamina, 20 g de ágar-ágar, água destilada para completar 1 litro (14).

No seu preparo o fosfato monopotássico, o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio são dissolvidos em 500 ml de água destilada diretamente, após suas respectivas pesagens. Dos demais componentes são feitas soluções e pipetadas as alíquotas adequadas a se obterem as quantidades desejadas de cada um. Na instalação do experimento III as fontes de carbono e de nitrogênio foram colocadas por último, após o que, o volume era completado para 1 litro, adicionando-se no final o ágar e ajustando-se o pH a 6,5 após a fusão do mesmo. A esterilização, como nos demais meios aqui citados, foi realizada em autoclave a 120°C, durante 20 minutos.

3.4 - Preparo dos meios para instalação dos experimentos

Após a elaboração de todos os meios, cada um foi fundido e vertido para um número suficiente de placas de petri de 10 centímetros de diâmetro por 1,5 de altura, para que se tivesse o número adequado de repetições para cada isolamento, em cada meio de cultura testado. Foram colocados 22 ml de meio por placa, previamente esterilizada a seco em forno Pasteur a 160°C, durante 1 hora. A seguir, cada placa foi protegida em papel e autoclavada a 120°C durante 20 minutos. Deixou-se transcorrer uma semana para a utilização das mesmas, para que perdessem o excesso de água condensada nas tampas.

Com o auxílio de 1 alça apropriada foi repicado um fragmento de colônia de P.oryzae de aproximadamente 1 mm de diâmetro de um só isolamento anteriormente cultivado em ágar-água (20 g de ágar para 1 litro de água destilada), para evitar a transferência de meio de cultura dos testados, que pudesse interferir nos resultados dos meios a serem estudados.

Com vistas ao problema de contaminações, foi preparada sempre uma repetição a mais. Embora tenha ocorrido pouca contaminação, em todos os experimentos sempre pudemos eliminar uma repetição inteira, e desse modo não tivemos caso de análise estatística de experimento com parcela perdida.

3.5 - Corante utilizado

O corante utilizado para facilitar as contagens de esporos ao microscópio, nas avaliações de esporulação dos experimentos, foi o azul-de-algodão, preparado segundo RAWLINS (23), e com a seguinte composição: fenol = 10 g; glicerina = 10 ml; ácido láctico = 10 ml; água destilada = 10 ml e azul-de-algodão = 50 mg.

3.6 - Experimento I: Comportamento de dez isolamentos de

P.oryzae obtidos de diferentes locais do Estado de S. Paulo em dez meios de cultura

Este experimento foi delineado em esquema fatorial 10 x 10 e os tratamentos distribuídos em blocos ao acaso com 4 repetições. Cada parcela compreendia um isolamento em um meio de cultura. Foram utilizados todos os isolamentos relacionados no item 3.2.1 no Quadro 1. Foram testados dez meios de cultura, que são citados nos itens 3.3.1 a 3.3.10, a saber: - meio A e B de Takahashi, de Tochinai, de Misato, de Czapek, basal de Otsuka modificado, de farelinho de arroz, BDA, meio básico de ágar e meio de Tanaka.

O experimento foi mantido em condições de laboratório, à luz ambiente e numa faixa de temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante os 13 dias de sua duração.

Na avaliação dos resultados foram anotados:

- a) crescimento vegetativo, representado pelo diâmetro da colônia medido em sentidos ortogonais, aos 13 dias de idade, segundo LILLY & BARNETT (14);
- b) esporulação, aos 13 dias de idade da colônia.

A esporulação foi avaliada através de uma técnica da qual não se encontrou referência na literatura consultada, e que consistia no seguinte: em cada placa de petri colocou-se uma fita adesiva transparente, de 7 centímetros de comprimento por 1,6 de largura, no sentido do diâmetro da colônia. Com uma espátula pressionava-se a fita de encontro à colônia, de modo a haver um perfeito contato entre ambas. Desse modo, praticamente toda parte vegetativa e reprodutiva do fungo que estivesse sobre o meio ficava presa à fita adesiva. A seguir, a fita era transferida para uma lâmina de vidro adrede provida de um filete contínuo de corante. De cada lâmina, que representava uma placa, foram feitas contagens de 20 campos, ao microscópio com 270 aumentos.

3.7 - Experimento II: Esporulação de P.oryzae em meio basal acrescido de diferentes relações carbono/nitrogênio, utilizando dextrose como fonte de carbono e caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio.

Este experimento, que serviu de preliminar para a instalação do experimento III, foi delineado em blocos ao acaso com 32 tratamentos em 4 repetições. Cada tratamento constou de compartamento do isolamento Fito. CIA 573 em cada uma das 30 diferentes relações carbono/nitrogênio além de dois meios naturais usados como controle. Devido ao grande número de tratamentos tornou-se impraticável a utilização de mais de um isolamento.

O meio basal utilizado foi o sugerido por LILLY & BARNETT (14), descrito no item 3.3.11. Para cada litro deste meio foram adicionadas dextrose e caseína hidrolizada, como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, em combinações variadas, de modo a se obter diferentes relações C/N, conforme se observa nos quadros 2 e 3.

QUADRO 2.- Combinações entre diferentes quantidades de dextrose (40% C) e de caseína hidrolizada (12% N total e 53,5% N) utilizadas no experimento II⁽¹⁾

Dextrose g/l	Caseína hidrolizada g/l				
	0,1	0,5	1,0	2,0	5,0
2,0	1	2	3	4	5
5,0	6	7	8	9	10
7,5	11	12	13	14	15
10,0	16	17	18	19	20
15,0	21	22	23	24	25
20,0	26	27	28	29	30

(1) Os números de 1 a 30 indicam os tratamentos.

QUADRO 3.- Relações carbono/nitrogênio proporcionadas pelas combinações de diferentes quantidades de dextrose (40% C) e de caseína hidrolizada (12% N total e 53,5% C), conforme indicação do quadro 2

Tratamento	Relação
1	1 : 0,014
2	1 : 0,057
3	1 : 0,092
4	1 : 0,133
5	1 : 0,181
6	1 : 0,005
7	1 : 0,026
8	1 : 0,048
9	1 : 0,080
10	1 : 0,133
11	1 : 0,003
12	1 : 0,018
13	1 : 0,034
14	1 : 0,060
15	1 : 0,109
16	1 : 0,002
17	1 : 0,014
18	1 : 0,026
19	1 : 0,048
20	1 : 0,092
21	1 : 0,001
22	1 : 0,009
23	1 : 0,018
24	1 : 0,034
25	1 : 0,070
26	1 : 0,001
27	1 : 0,007
28	1 : 0,014
29	1 : 0,026
30	1 : 0,057

Incluiram-se ainda mais dois tratamentos, como controle, que constavam dos meios de batata-dextrose-ágar e de farelinho de arroz, já descritos respectivamente nos itens 3.3.8 e 3.3.7.

O experimento foi mantido em câmara incubadora marca FANEM, modelo 005/2, 110 v. e 0,105 Kw, regulada a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e na ausência de luz durante os 13 dias de duração.

Na avaliação dos resultados foram anotados somente os dados de esporulação aos 13 dias de idade da colônia. Para avaliar a esporulação foi feita uma amostragem de cada placa, lançando-se mão da mesma técnica da fita adesiva descrita no item 3.6.- Experimento I. Cada lâmina foi examinada inteiramente ao microscópio, sendo atribuídas notas para a intensidade de esporulação. Adotou-se a escala de notas de 0 a 10, sendo atribuída a nota 0 para a ausência completa de esporos na lâmina, e a nota 10 para a lâmina com a esporulação mais abundante, cuja contagem seria impossível.

3.3 - Experimento III: Crescimento vegetativo e esporulação de cinco isolamentos de P.oryzae na melhor faixa de relação carbono/nitrogênio demonstrada no experimento II.

Neste experimento, delineado em blocos ao acaso com 11 tratamentos e 4 repetições, foram utilizados os isolamentos Fito. CIA 569, 570, 571, 572 e 573, relacionados no item 3.2.1, quadro 1.

O meio basal utilizado foi o mesmo indicado por LILLY & BARNETT (14) e já descrito no item 3.3.11. Para cada litro desse meio foram adicionadas dextrose e caseína hidrolizada como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, em combinações variadas de dextrose com 1 g de caseína, de modo a proporcionar relação C/N na faixa de 1:0,020 até 1:0,060, a intervalos de 1:0,005, conforme se pode observar no quadro 4.

QUADRO 4.- Combinações de 1 g de caseína hidrolizada (12% de N total e 53,5% de C) com diferentes quantidades de dextrose (40% de C), para proporcionar as relações C/N desejadas no experimento 3

Tratamento	Caseína g/l	Dextrose g/l	Relação C/N
1	1	13,75	1:0,020
2	1	10,75	1:0,025
3	1	8,75	1:0,030
4	1	7,32	1:0,035
5	1	6,25	1:0,040
6	1	5,41	1:0,045
7	1	4,75	1:0,050
8	1	4,20	1:0,055
9	1	3,75	1:0,060
10	Meio de batata - dextrose - ágar		
11	Meio de farelinho de arroz		

O experimento foi mantido em condições de laboratório, à luz ambiente, numa faixa de temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante os 13 dias de sua duração.

Na avaliação dos resultados foi anotado o crescimento vegetativo representado pelo diâmetro da colônia medido em sentidos ortogonais, aos 13 dias de idade, segundo LILLY & BARNETT (14). Foi avaliada também a esporulação aos 13 dias de idade da colônia, pela mesma técnica da fita adesiva já descrita na avaliação do experimento 1, (item 3.6), contando-se o número total de esporos em 20 campos, ao microscópio com 270 aumentos.

4 - RESULTADOS

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se a análise da variância e a comparação de médias pelo teste de Tukey.

4.1 - Experimento I: Comportamento de dez isolamentos de P. oryzae obtidos em diferentes locais do Estado de São Paulo, em dez meios de cultura.

4.1.1 - Crescimento vegetativo

Os dados de crescimento vegetativo dos 10 isolamentos de P.oryzae nos dez meios de cultura testados são apresentados no quadro 5. A análise da variância (quadro 6) revelou diferença altamente significativa entre meios e entre isolamentos.

As médias para os meios testados foram:

m1 = 90,00	m6 = 74,57	
m2 = 73,61	m7 = 87,41	
m3 = 71,27	m8 = 87,48	
m4 = 84,37	m9 = 77,32	
m5 = 56,17	m10 = 71,57	
m = 77,38	s = 1,33	CV = 1,7%

A diferença mínima significativa para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade foi 1,085.

A comparação das médias pelo teste de Tukey revelou que o melhor crescimento vegetativo foi obtido no meio B de Takahashi; os de farelinho de arroz e BDA se mostraram favoráveis ao crescimento vegetativo, porém diferindo estatisticamente do primeiro. Seguiram-se os meios de Misato, o básico de ágar modificado, os meios A de Takahashi e basal de Otsuka

QUADRO 5.- Crescimento vegetativo de P. oryzae em diversos meios de cultura, à temperatura de 26 + 3°C e sob ação de luz ambiente (condições de laboratório). Os dados representam o diâmetro médio (mm) de 4 repetições, aos 13 dias de idade da colônia

M E I O	I S O L A M E N T O										
	569	570	571	572	573	574	575	577	578	579	
B de Takahashi	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0	
A de Takahashi	70,4	74,9	77,6	72,9	70,6	73,7	75,0	75,6	71,9	73,5	
Tochinai	64,0	71,2	62,5	66,5	68,7	79,5	70,5	73,0	72,2	84,5	
Misato	80,5	85,5	88,2	84,2	84,7	87,5	81,1	83,5	85,5	82,9	
Czapek	50,5	61,2	50,5	62,4	46,1	61,5	57,2	66,2	52,0	54,0	
Basal Otsuka modif.	73,6	70,7	74,4	74,0	75,5	79,9	77,6	70,2	76,5	73,2	
Farelinho de arroz	90,0	90,0	79,9	87,2	90,0	90,0	90,0	90,0	79,5	90,0	
B D A	81,4	87,6	83,7	86,4	90,0	90,0	89,7	90,0	90,0	86,0	
Básico ágar modif.	66,5	75,2	73,7	78,5	80,1	79,7	82,2	80,2	80,4	76,5	
Tanaka	67,4	79,9	67,6	71,5	72,6	75,4	71,2	75,6	68,5	66,0	

QUADRO 6.- Análise da variância dos dados de crescimento vegetativo de P.oryzae em diversos meios de cultura, aos 13 dias de idade da colônia, conforme indicados no quadro 5

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetição	3	366,25	122,08	70,56 **
Tratamento	99	44474,54	449,23	259,63 **
Meios (M)	9	38141,66	4237,96	2449,26 **
Isolamentos (I)	9	1651,95	183,55	106,08 **
M x I	81	4680,92	57,78	33,40 **
Erro	297	525,80	1,73	--
Total	399	45366,60	113,70	--

modificado e, finalmente, os meios de Tochinai e de Tanaka, todos diferindo entre si e propiciando sucessivamente, menores crescimentos vegetativos até os últimos citados, que foram os piores tratamentos.

4.1.2 - Esporulação

Os dados de esporulação de P.oryzae nos dez meios de cultura testados são apresentados no quadro 7.

A análise da variância dos resultados de esporulação obtidos neste experimento (quadro 8) revelou diferenças altamente significativas entre meios e entre isolamentos.

As médias para os meios testados, todas com erro padrão igual a 3,25, foram:

QUADRO 7.- Esporulação de *P. oryzae* em diversos meios de cultura, à temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$, e sob ação de luz ambiente (condições de laboratório) aos 13 dias de idade. Dados expressos em número total de esporos contados em 20 campos de microscópio (270 aumentos), médias de 4 repetições e transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

M E I O	I S O L A M E N T O									
	569	570	571	572	573	574	575	577	578	579
B de Takahashi	12,24	11,98	--	7,60	5,39	3,09	1,82	8,06	1,26	2,11
A de Takahashi	4,65	11,36	--	3,42	6,46	14,09	0,71	6,93	1,47	1,06
Tochinai	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Misato	16,00	14,47	--	20,52	14,60	21,29	57,58	26,93	19,16	1,54
Czapek	0,71	0,71	--	0,71	9,00	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
Basal Otsuka modif.	35,28	26,06	--	26,29	29,02	26,66	16,55	25,33	15,89	2,71
Farelinho de arroz	24,97	25,83	--	20,21	29,86	14,14	16,61	26,28	5,93	10,24
B D A	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Básico ágar modif.	10,68	18,49	--	14,30	26,72	21,65	7,59	29,63	1,61	0,71
Tanaka	7,95	3,32	--	12,23	7,17	17,31	35,59	4,72	5,79	0,71

QUADRO 8.- Análise da variância dos dados de esporulação de P.oryzae em diversos meios de cultura, aos 13 dias de idade da colônia, segundo o quadro 7

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetição	3	2384,93	794,97	74,92 **
Tratamentos	71	37087,37	522,35	49,22 **
Meios (M)	7	16017,03	2288,14	215,62 **
Isolamentos (I)	8	6209,29	776,16	73,14 **
M x I	56	14861,05	265,37	25,01 **
Erro	213	2260,30	10,61	--
Total	287	41732,62	145,40	--

m1 = 5,95	m6 = 22,64
m2 = 5,57	m7 = 19,34
m3 = 0,71	m8 = 0,71
m4 = 21,34	m9 = 14,60
m5 = 1,63	m10 = 10,53

m = 12,70 s = 3,25 CV = 25,6%

A diferença mínima significativa para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade foi de 2,742.

A comparação das médias através do teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade, revelou que a diferença altamente significativa verificada foi devida fundamentalmente à abundante esporulação obtida no meio basal de Otsuka modificado e no meio de Misato, que foram iguais entre si. O meio de farelinho de arroz apresentou ótima esporulação, não diferindo do meio de Misato, mas diferindo estatisticamente do meio de Otsuka. A seguir, decrescendo em esporulação, vem o meio básico de ágar modificado, depois o meio de Tanaka, di

ferindo entre si e dos primeiros. Os meios A e B de Takahashi foram estatisticamente iguais, apresentando pouca esporulação, mas foram diferentes do meio de Czapek, no qual somente o isolamento 573 esporulou. O meio de Tochinai e BDA foram os piores tratamentos, não proporcionando esporulação alguma a todos os isolamentos, sendo estatisticamente iguais ao meio de Czapek.

4.1.3 - Esporulação por placa

A partir do diâmetro médio de cada placa foi calculada a área de crescimento do fungo, e esta área, multiplicada pela respectiva esporulação total observada nos 20 campos de microscópio com 270 aumentos, forneceu os dados de esporulação por placa.

Os dados médios de 4 repetições da esporulação por placa de cada isolamento, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ são apresentados no quadro 9.

A análise de variância e o teste de Tukey foram aplicados para os dados de cada isolamento separadamente, revelando diferença altamente significativa entre meios dentro de cada isolamento testado, conforme pode ser verificado no quadro 10.

Para sete isolamentos o meio de farelinho de arroz apresentou os melhores dados de esporulação por placa. O meio basal de Otsuka modificado apresentou os melhores resultados para seis isolamentos, não diferindo estatisticamente do anterior. O meio de Misato revelou os melhores resultados para cinco isolamentos e o meio básico de ágar modificado para três isolamentos.

Os meios A e B de Takahashi e o meio de Tanaka apresentaram resultados bastante baixos de esporulação por placa. No meio de Czapek somente o isolamento 573 apresentou esporulação. O meio de Tochinai e BDA não propiciaram esporulação

QUADRO 9. - Esporulação por placa, de dez isolamentos de *P. oryzae* em dez meios de cultura, à temperatura de 26 + 3°C e sob luz ambiente (condições de laboratório). Dados médios de quatro repetições, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ (*)

M E I O	I S O L A M E N T O									
	569	570	571	572	573	574	575	577	578	579
B de Takahashi	30,83b	30,17c	-----	19,10b	13,50c	7,41b	4,14e	20,25b	2,31e	4,89b
A de Takahashi	9,23d	23,84c	-----	6,91c	12,77c	29,12b	-----	14,77c	2,57d	1,84d
Tochinai	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Misato	36,08b	34,65b	-----	48,43a	34,65b	52,23a	131,00a	63,07a	45,90a	2,87d
Czapek	-----	-----	-----	-----	11,77c	-----	-----	-----	-----	-----
Basal Otsuka modif.	73,12a	51,83a	-----	54,60a	61,43a	60,21a	36,26d	50,33a	34,06b	5,41b
Farelinho de arroz	62,95a	65,11a	-----	50,16a	75,28a	35,62a	41,86c	66,25a	13,20c	21,25a
B D A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Básico ágar modif.	19,96c	39,21b	-----	31,58b	60,03a	48,39a	17,43d	66,93a	3,13d	-----
Tanaka	15,03c	7,30d	-----	24,57b	14,55c	36,62a	71,14b	10,01c	11,19c	-----

(*) As letras a, b, c, d, ..., após os números se referem ao teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade dentro do isolamento.

QUADRO 10.- Experimento I: - Resultados da análise de variância e da comparação das médias dos dados de esporulação por placa (entre meios, dentro de cada tratamento)

ELEMENTO	I S O L A M E N T O									
	569	570	571	572	573	574	575	577	578	579
Média	35,32	36,01	---	33,62	35,50	38,51	50,30	41,66	16,05	7,21
Desvio Padrão	5,24	5,32	---	6,94	7,48	9,24	10,68	8,70	3,00	4,20
C.V. %	14,83	14,77	---	20,64	21,07	23,99	21,23	20,88	18,69	58,25
F (S) meios	85,87	49,70	---	26,83	49,50	14,23	73,01	34,77	131,88	14,46
d.n.s. (SS)	15,16	15,40	---	20,09	21,61	26,74	30,97	25,18	3,68	12,26

(S) Todos os valores de F foram significativos ao nível de 1% de significância

(SS) Desvio mínimo significativo para o teste de Tukey a 1% de significância

alguma a qualquer dos isolamentos de P.oryzae, tendo sido os piores tratamentos.

4.2 - Experimento II:- Esporulação de P.oryzae em meio basal sintético acrescido de diferentes quantidades de dextrose e caseína hidrolizada, de modo a proporcionarem diferentes relações carbono/nitrogênio, na faixa de 1:0,001 a 1:0,181.

Neste experimento, sendo preliminar ao seguinte, foram colhidos somente os dados de esporulação aos 13 dias de idade da colônia. Os dados médios de quatro repetições, que se encontram no quadro 11, foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para a análise da variância, comparação de médias e estudo de correlação. A análise da variância é apresentada no quadro 12.

Os melhores resultados foram obtidos nas relações C/N: 1:0,018; 1:0,026; 1:0,034; 1:0,048; 1:0,057; 1:0,060; 1:0,080 e 1:0,092. Embora a faixa de 1:0,034 a 1:0,048 tenha mostrado os melhores resultados, todos os tratamentos foram estatisticamente iguais.

No estudo de correlação entre as relações C/N de 1:0,001 até 1:0,048 com as respectivas esporulações obteve-se um coeficiente $r=0,90$, altamente significativo, com o coeficiente de determinação de 81%.

No estudo de correlação entre as relações C/N de 1:0,057 até 1:0,181 com as respectivas esporulações obteve-se um coeficiente $r= -0,58$, não significativo.

O maior número de tratamentos que apresentaram os melhores resultados de esporulação foi obtido com 1 g de caseína hidrolizada (tratamentos 3, 8, 13, 18 e 23).

QUADRO 11.- Esporulação de P.oryzae em meio basal sintético acrescido de dextrose e caseína hidrolizada em diferentes relações C/N, a 26 + 2°C, na ausência de luz, aos 13 dias de idade. Dados médios de quatro repetições, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, comparação de médias de esporulação e estudo de correlação entre relação C/N e esporulação

Tratamento	Relação C/N	Esporulação média	Tukey a 1% ⁽¹⁾	
21	1:0,001	1,400	jk	
26	1:0,001	1,545	ijk	
16	1:0,002	1,980	fghij	
11	1:0,003	1,220	k	
6	1:0,005	1,400	jk	
27	1:0,007	1,995	fghij	
22	1:0,009	1,932	ghij	
1	1:0,014	2,472	cdefg	
17	1:0,014	2,115	efghi	
28	1:0,014	2,120	efghi	
12	1:0,018	2,570	bcdefg	
23	1:0,018	2,972	abc	
7	1:0,026	2,870	abc	
18	1:0,026	2,870	abc	r=0,9**
29	1:0,026	3,035	abc	r ² =0,81
13	1:0,034	3,240	a	ou
24	1:0,034	3,240	a	91%
8	1:0,048	3,240	a	
19	1:0,048	3,240	a	
2	1:0,057	3,057	abc	
30	1:0,057	2,235	defgh	
14	1:0,069	2,785	abcd	
25	1:0,070	1,652	hijk	
9	1:0,080	2,785	abcd	
3	1:0,092	2,690	abcde	
20	1:0,092	1,220	k	
15	1:0,109	1,092	k	r= -0,58
4	1:0,133	2,115	efghi	n.s.
10	1:0,133	1,310	k	
5	1:0,181	1,400	jk	

(1) As médias não seguidas pelas mesmas letras diferem estatisticamente.

QUADRO 12.- Análise da variância dos dados de esporulação de P.oryzae em meio basal sintético acrescido de dextrose e caseína hidrolizada em diferentes relações C/N, aos 13 dias. Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetição	3	0,07	0,02	0,61 n.s.
Tratamentos	31	63,14	2,03	52,91 **
Erro	93	3,58	0,03	--
Total	127	66,80	0,52	--

n = 2,30

s = 0,19

C.V. = 8,5%

d.m.s. = 0,609, para teste de Tukey a 1%

4.3 - Experimento III:- Comportamento de cinco isolamentos de P.oryzae na melhor faixa de relação carbono/nitrogênio

4.3.1 - Crescimento vegetativo

O crescimento vegetativo dos cinco isolamentos de P.oryzae na faixa de relação C/N de 1:0,020 a 1:0,060 a intervalos de 1:0,005 é apresentado no quadro 13. A análise da variância do crescimento vegetativo, representado pelo diâmetro médio em milímetros de quatro repetições (quadro 14), revelou diferença altamente significativa entre relações C/N e entre isolamentos.

A diferença mínima significativa para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade foi de 1,132.

As médias para as relações C/N testadas foram:

QUADRO 13.- Crescimento vegetativo de *P.oryzae* em diferentes relações C/N, à temperatura de $26 + 3^{\circ}\text{C}$ e sob ação de luz ambiente (condições de laboratório). Os dados representam o diâmetro médio em milímetros de 4 repetições, aos 13 dias de idade da colônia

Tratamento	Relação C/N	I S O L A M E N T O				
		569	570	571	572	573
1	1:0,020	74,7	79,7	77,1	79,1	78,5
2	1:0,025	73,5	76,9	74,7	77,2	76,0
3	1:0,030	74,5	75,9	73,5	76,5	75,7
4	1:0,035	76,5	78,2	77,9	77,5	74,0
5	1:0,040	76,1	79,1	79,4	80,4	75,4
6	1:0,045	76,5	81,0	80,1	80,9	79,5
7	1:0,050	75,6	81,0	78,0	79,5	77,9
8	1:0,055	75,4	74,4	79,0	78,6	78,6
9	1:0,060	74,4	73,2	74,6	77,6	71,7
10	BDA	75,7	81,6	76,9	80,9	78,1
11	farelinho	74,4	76,0	74,2	78,0	77,2

QUADRO 14.- Análise da variância dos dados de crescimento vegetativo de *P.oryzae* em diferentes relações C/N, à temperatura de $26 + 3^{\circ}\text{C}$, sob ação de luz ambiente (condições de laboratório)

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetição	3	469,69	153,56	171,09 **
Tratamentos	54	1192,71	22,08	24,61 **
Meios (II)	10	528,91	52,89	58,92 **
Isolamentos (I)	4	318,30	79,57	88,65 **
M x I	40	345,49	8,63	9,62 **
Erro	162	145,42	0,89	--
Total	210	1798,83	8,21	--

m1 = 75,67	m7 = 77,20
m2 = 75,22	m8 = 74,32
m3 = 76,82	m9 = 78,65
m4 = 78,07	m10 = 77,85
m5 = 79,60	m11 = 75,97
m6 = 78,40	

m = 77,07 s = 0,94 C.V. = 1,2%

A comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade revelou que o melhor crescimento vegetativo foi obtido na relação C/N de 1:0,040, sendo a faixa de 1:0,035 a 1:0,045 a que se mostrou mais favorável. Dos meios naturais usados como controle o de farelinho de arroz se revelou um dos menos favoráveis ao crescimento vegetativo de P.oryzae, sendo estatisticamente igual aos de relações 1:0,020 e 1:0,025, que foram os piores tratamentos. BDA mostrou-se superior ao meio de farelinho de arroz para crescimento vegetativo. A relação 1:0,060 mostrou-se favorável ao crescimento do fungo, sendo seu resultado estatisticamente igual ao resultado da melhor faixa de relação C/N.

4.3.2 - Esporulação

Os dados médios de quatro repetições da esporulação dos cinco isolamentos de P.oryzae deste experimento, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ são apresentados no quadro 15. A análise da variância destes dados (quadro 16) revelou diferença altamente significativa entre relações C/N e entre isolamentos.

A diferença mínima significativa para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade foi de 3,271.

As médias de esporulação para as relações C/N testadas foram:

QUADRO 15.- Esporulação de P.oryzae em diferentes relações C/N, a temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e sob ação de luz ambiente (condições de laboratório). Dados médios de 4 repetições transformados em $\sqrt{x} + 0,5$, aos 13 dias de idade da colônia

Tratamento	Relação C/N	I S O L A M E N T O				
		569	570	571	572	573
1	1:0,020	10,78	10,78	1,62	8,17	10,16
2	1:0,025	11,50	13,32	2,96	9,11	11,97
3	1:0,030	18,32	14,30	4,45	10,14	15,65
4	1:0,035	19,34	26,69	5,43	18,57	24,10
5	1:0,040	22,65	33,21	5,74	24,10	30,68
6	1:0,045	33,38	41,70	6,86	26,99	36,26
7	1:0,050	35,73	42,61	7,00	29,08	37,97
8	1:0,055	33,30	38,88	5,70	27,44	36,48
9	1:0,060	29,47	35,57	3,80	25,02	32,77
10	BDA	0,71	0,71	0,71	0,71	8,69
11	fabelinho	23,25	32,49	6,72	20,39	31,24

QUADRO 16.- Análise da variância da esporulação de P.oryzae em diferentes relações C/N, a temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$, sob ação de luz ambiente (condições de laboratório)

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetição	3	523,38	174,46	23,31 **
Tratamentos	54	35 544,04	658,22	87,94 **
Meios (M)	10	18 245,93	1 824,59	243,76 **
Isolamentos (I)	4	13 447,85	3 361,96	449,15 **
M x I	40	3 850,26	96,25	12,86 **
Erro	162	1 212,61	7,48	---
Total	219	37 280,04	170,22	---

m1 = 8,30	m7 = 30,48
m2 = 9,77	m8 = 28,36
m3 = 12,57	m9 = 25,32
m4 = 18,82	m10 = 2,30
m5 = 23,28	m11 = 22,81
m6 = 29,04	

m = 19,19 s = 2,73 C.V. = 14,3%

A comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade revelou que os melhores dados de esporulação foram obtidos na faixa de relação C/N de 1:0,045 a 1:0,055. Embora a relação 1:0,050 tenha apresentado o resultado mais alto de esporulação, ela se mostrou estatisticamente igual às citadas anteriormente. Dos meios naturais utilizados como testemunha, o de farelinho de arroz se mostrou estatisticamente igual aos de relações C/N = 1:0,040 e 1:0,060, e bastante superior ao BDA, que se revelou o pior meio de cultura para a esporulação dos isolamentos.

4.3.3 - Esporulação por placa

Os dados médios de quatro repetições da esporulação por placa dos cinco isolamentos estudados neste experimento, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, constam do quadro 17. A análise da variância destes dados (quadro 18) revelou diferenças altamente significativas entre relações C/N e entre isolamentos.

A análise da interação das relações C/N dentro de isolamentos pode ser observada no quadro 19, sendo a diferença mínima significativa obtida para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade igual a 16,55.

A comparação das médias pelo teste de Tukey revelou diferenças altamente significativas entre relações C/N dentro de isolamentos e é apresentada no quadro 20.

QUADRO 17.- Esporulação por placa de cinco isolamentos de *P. oryzae* em diferentes relações C/N, à temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$, e sob ação de luz ambiente (condições de laboratório) Dados médios de 4 repetições transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, aos 13 dias de idade da colônia

Tratamento	Relação C/N	I S O L A M E N T O				
		569	570	571	572	573
1	1:0,020	22,63	24,06	3,16	18,06	22,29
2	1:0,025	23,72	28,74	6,03	19,73	25,51
3	1:0,030	38,47	30,38	9,01	21,74	33,23
4	1:0,035	41,58	58,49	11,70	40,39	49,94
5	1:0,040	48,45	73,62	12,66	54,26	64,93
6	1:0,045	71,52	90,15	15,29	61,22	80,81
7	1:0,050	75,66	96,69	15,22	64,77	83,07
8	1:0,055	70,29	81,05	12,46	60,43	80,41
9	1:0,060	61,36	73,13	7,63	54,45	65,91
10	BDA	0,71	0,71	0,71	0,71	19,00
11	farelinho	48,40	69,13	13,88	44,70	67,66

QUADRO 18.- Análise da variância dos dados de esporulação por placa de *P.oryzae* em diferentes relações C/N, à temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$, sob ação de luz ambiente (condições de laboratório)

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Repetição	3	3 321,56	1 107,18	28,75 **
Tratamentos	54	167 772,67	3 106,90	80,67 **
Meios (M)	10	87 461,33	8 746,13	227,11 **
Isolamentos (I)	4	62 307,75	15 576,93	404,49 **
M x I	40	18 003,59	450,08	11,68 **
Erro	162	6 232,84	38,51	---
Total	219	177 333,07	---	---

m = 41,27

s = 6,20

C.V. = 15,0%

QUADRO 19.- Esporulação por placa de *P.oryzae*. Interação de relações C/N dentro de isolamentos

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Rel.C/N dentro do isol.569	10	22 153,72	2 215,37	57,52**
Rel.C/N dentro do isol.570	10	38 802,21	3 880,22	100,75**
Rel.C/N dentro do isol.571	10	966,07	96,60	2,50**
Rel.C/N dentro do isol.572	10	18 745,16	1 874,51	48,67**
Rel.C/N dentro do isol.573	10	24 797,77	2 479,77	64,39**
Erro	162	6 238,84	38,51	---

QUADRO 20.- Comparação das médias de esporulação por placa de relações C/N dentro de isolamento, pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade

Tratamento	Relação C/N	I S O L A M E N T O				
		569	570	571	572	573
1	1:0,020	22,63d	24,06e	3,16a	18,06c	22,29d
2	1:0,025	23,72d	26,74e	6,03a	19,73c	25,51d
3	1:0,030	38,47c	30,38d	9,01a	21,74c	33,23d
4	1:0,035	41,58c	58,49c	11,70a	40,39b	49,94c
5	1:0,040	48,45b	73,82b	12,66a	54,26a	64,93b
6	1:0,045	71,52a	90,15a	15,29a	61,22a	80,81a
7	1:0,050	75,66a	96,69a	15,22a	64,77a	83,07a
8	1:0,055	70,29a	81,05a	12,46a	60,43a	80,41a
9	1:0,060	61,36a	73,13b	7,63a	54,45a	65,91b
10	BDA	0,71e	0,71f	0,71a	0,71d	19,00d
11	farelinho	48,40b	69,13b	13,88a	44,70b	67,66a

As médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente dentro de isolamentos (colunas).

Para o isolamento 569 as melhores relações C/N foram

1:0,045, 1:0,050, 1:0,055 e 1:0,060. Para o isolamento 570 os melhores resultados foram obtidos nas relações 1:0,045, 1:0,050 e 1:0,055. Para o isolamento 571 não houve diferenças entre as relações C/N testadas, sendo que em todas elas esse isolamento apresentou resultados bastante inferiores. O isolamento 572 apresentou os melhores resultados na faixa de 1:0,040 a 1:0,060, e o isolamento 573 mostrou os melhores dados nas relações 1:0,045, 1:0,050 e 1:0,055, sendo o único isolamento em que o meio de farelinho de arroz proporcionou bom resultado, sendo estatisticamente igual às melhores relações C/N citadas.

Para todos os isolamentos as relações C/N 1:0,020, 1:0,025, 1:0,030 e 1:0,035 não proporcionaram bons resultados. Somente os isolamentos 570 e 573 não apresentaram os melhores resultados na relação 1:0,060.

A análise de interação dos isolamentos dentro das relações C/N pode ser observada no quadro 21, sendo a diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade igual a 14,50.

A comparação das médias através do teste de Tukey revelou diferenças altamente significativas entre isolamentos dentro de relação C/N, sendo apresentada no quadro 22.

Para as relações 1:0,020 e 1:0,025 todos os isolamentos apresentaram resultados iguais, exceto o 571 que se revelou estatisticamente inferior aos demais. Na relação 1:0,030 os melhores resultados foram apresentados pelos isolamentos 569, 570 e 573. O isolamento 572 se mostrou estatisticamente inferior aos demais.

Nas relações 1:0,035, 1:0,040 e 1:0,045 os isolamentos se comportaram do seguinte modo: os isolamentos 570 e 573 foram os de melhor resultado; a seguir, os isolamentos 569 e 572 foram estatisticamente inferiores aos anteriores e superiores ao 571.

QUADRO 21.- Esporulação por placa de *F.oryzae* em diferentes relações C/N. Comportamento de isolamentos dentro de relação C/N

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isol.dentro da rel.1:0,020	4	1 186,84	296,71	7,70**
Isol.dentro da rel.1:0,025	4	1 252,09	313,02	8,12**
Isol.dentro da rel.1:0,030	4	2 129,17	532,29	13,82**
Isol.dentro da rel.1:0,035	4	4 973,93	1 243,48	32,28**
Isol.dentro da rel.1:0,040	4	8 772,58	2 193,14	56,94**
Isol.dentro da rel.1:0,045	4	13 610,16	3 402,54	88,35**
Isol.dentro da rel.1:0,050	4	15 602,46	3 900,61	101,28**
Isol.dentro da rel.1:0,055	4	12 886,73	3 221,68	83,65**
Isol.dentro da rel.1:0,060	4	10 803,71	2 700,92	70,13**
Isol.dentro de BDA	4	1 071,65	267,91	6,95**
Isol.dentro de farelinho	4	8 021,99	2 005,49	52,07**
Irro	162	6 238,84	38,51	---

QUADRO 22.- Comparação das médias de esporulação por placa de isolamentos dentro de relação C/N pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade

Tratamento	Relação C/N	I S O L A M E N T O				
		569	570	571	572	573
1	1:0,020	22,63a	24,06a	3,16b	18,06a	22,29a
2	1:0,025	23,72a	28,74a	6,03b	19,73a	25,51a
3	1:0,030	38,47a	30,38a	9,01c	21,74b	33,23a
4	1:0,035	41,58b	58,49a	11,70c	40,39b	49,94a
5	1:0,040	48,45b	73,62a	12,66c	54,26b	64,93a
6	1:0,045	71,52b	90,15a	15,29c	61,22b	80,81a
7	1:0,050	75,66b	96,69a	15,22d	64,77c	83,07a
8	1:0,055	70,29a	81,05a	12,46c	60,43b	80,41a
9	1:0,060	61,36a	73,13a	7,63c	54,45b	65,91a
10	BDA	0,71b	0,71b	0,71b	0,71b	19,00a
11	Farelinho	48,40b	69,13a	13,88c	44,70b	67,66a

As médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente dentro de relação C/N (linhas).

Na relação C/N 1:0,050 as maiores médias foram obtidas pelos isolamentos 570 e 573. Nas relações 1:0,055 e 1:0,060 as maiores médias foram as dos isolamentos 569, 570 e 573, estatisticamente diferente dos demais.

Em batata-dextrose-ágar somente o isolamento 573 apresentou resultado superior aos demais, enquanto no meio de farelinho de arroz os isolamentos 570 e 573 se mostraram iguais entre si e superiores aos isolamentos 569 e 572, que, por sua vez, foram superiores estatisticamente ao 571.

5 - DISCUSSÃO

Em ensaios preliminares foi observado o comportamento de um isolamento de F.oryzae em meio de tomate e meio V-8, citados por CHUNG & LA (5), em meio de batata sacarose ágar com 1% de sacarose, citado por ATKINS (1), em meio de grãos inteiros de cevada, citado por SUZUKI (28), em meio de grãos de arroz autoclavados com água, citado por HUNG & CHIEN (9), em meio de batata dextrose ágar acrescido de água de coco, citado por LOZANO & GALVEZ (15). Todos esses meios não apresentaram bons resultados e por isso não foram incluídos nos experimentos deste trabalho.

A análise da variância dos resultados do experimento visando conhecer o comportamento de dez isolamentos de F.oryzae em dez meios de cultura utilizados pelos pesquisadores de diversos países (apresentadas nos quadros 6, 8 e 10), mostraram diferenças altamente significativas entre os meios testados e entre os isolamentos utilizados.

A comparação das médias dos meios de cultura através do teste de Tukey revelou diferentes resultados conforme a avaliação do meio era feita para crescimento vegetativo, esporulação ou esporulação por placa. Assim, para crescimento

vegetativo, os melhores meios foram: B de Takahashi, farelinho de arroz, batata dextrose ágar e meio de Misato, enquanto que, para esporulação os melhores foram: meio basal de Otsuka modificado, meio de Misato, farelinho de arroz e meio básico de ágar modificado. Para esporulação por placa, que engloba as duas avaliações anteriores, foram revelados como melhores os meios: farelinho de arroz, basal de Otsuka modificado, Misato e meio básico de ágar modificado. A maior variação dos resultados foi devida à classificação dos meios, visto que são praticamente os mesmos que se comportaram como os melhores.

HENRY & ANDERSEN (8) consideraram o meio de farelinho de arroz como muito eficiente para esporulação de culturas de F.oryzae. Os resultados aqui obtidos confirmam os resultados desses autores. Entretanto SUZUKI (27) cita que o referido meio não se mostra inteiramente favorável para a esporulação de culturas de fungo porque os resultados não são constantes para todos os isolamentos. Este fato foi confirmado, pois, dos dez isolamentos estudados para sete o meio de farelinho de arroz se mostrou excelente, enquanto dois pouco esporularam e em um não ocorreu esporulação alguma.

WEINTRAUB (34, 35) relatou que certos componentes do farelinho de arroz estimulam a germinação de conídios, especialmente a formação de tubos germinativos, embora não estimulem a produção de conídios. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam o bom desempenho do farelinho de arroz na produção de conídios, discordando da conclusão que Weintraub chegou em seu trabalho, e concordando com os resultados de Hirata citados por SUZUKI (27).

Segundo SUZUKI (27) o meio BDA, muito usado no Japão para obtenção de esporulação de F.oryzae, como todo meio natural não apresenta resultados constantes para todos os isolamentos. Neste trabalho confirmou-se plenamente a afirmação de Suzuki pois o BDA foi um dos piores meios para esporu

lação, embora tenha sido muito bom para crescimento vegetativo, além de não proporcionar esporulação alguma a todos os isolamentos no experimento I enquanto no experimento III alguns isolamentos apresentaram certa esporulação neste meio.

Os resultados obtidos com o meio basal de Otsuka modificado coincidiram com os citados pelo seu autor OTSUKA (19), confirmando ser um bom meio para a esporulação do fungo. Igual e concordante afirmação foi obtida quanto ao meio de Miso, segundo o próprio Otsuka, e foi aqui confirmada.

Segundo LEAVER (12), a tiamina e a biotina são fatores de crescimento indispensáveis à esporulação de F.oryzae. Dos meios semi-sintéticos que levam essas duas vitaminas, o basal de Otsuka modificado confirmou a observação de Leaver, enquanto o meio básico de ágar modificado, que não possui esses fatores de crescimento, se mostrou superior ao meio de Tanaka, que os possui, embora o meio de Tanaka tenha-se revelado superior ao de Czapek e ao de Tochinai, que não possuem nem tiamina e nem biotina em sua composição.

Dentre os meios que apresentaram melhor esporulação, com base na afirmação de SUZUKI (27) segundo o qual o uso de meios naturais não proporciona sempre esporulação a todos os isolamentos do fungo, optou-se por trabalhar com meio semi-sintético, cuja composição pode-se controlar, para obter uma produção estável de conídios a qualquer tempo.

Conforme os trabalhos de LEAVER (12) e OTSUKA (19), que sugerem o uso de dextrose e caseína hidrolizada como excelentes fontes de carbono e de nitrogênio para F.oryzae, tais fontes foram acrescentadas ao meio basal de LILLY & BARNETT (14) para determinação das relações Carbono/Nitrogênio mais favoráveis ao crescimento vegetativo e esporulação. A correlação existente entre relações C/N de 1:0,001 até 1:0,048 com os dados de esporulação, e as melhores esporulações tendo sido obtidas a 1:0,034 e 1:0,048, foram fatos que sugeriram o estudo de faixas mais estreitas de relação C/N.

OTSUKA (19) afirmou que a relação 1:0,041 é a melhor para a esporulação de F. oryzae. No presente trabalho o resultado melhor para esporulação foi apresentado pela relação 1:0,050, embora estatisticamente esta relação não diferisse da relação 1:0,045 e 1:0,055. Para crescimento vegetativo a relação 1:0,040 foi a melhor, aproximando-se bastante daquela considerada melhor por Otsuka. Avaliando os meios através da esporulação por placa dos isolamentos, as relações 1:0,045, 1:0,050 e 1:0,055 foram as melhores. Embora o meio basal usado no presente trabalho tenha ligeiras diferenças do utilizado por Otsuka, não obstante tenham sido usadas as fontes de carbono e nitrogênio por ele sugeridas e por Leaver, nossos resultados concordam em grande parte com os obtidos por Otsuka para crescimento vegetativo, e se aproximam bastante dos resultados de esporulação.

A variação de comportamento dos isolamentos dentro da mesma relação carbono/nitrogênio atesta a grande variabilidade do microrganismo em estudo, fato este já observado por SUZUKI (27), OU (20) e outros. Para alguns isolamentos haveria a necessidade de testar relações C/N além de 1:0,060, - pois até nesta relação eles mostraram bom crescimento vegetativo e esporulação, podendo ocorrer que a relação C/N ótima para os mesmos estivesse fora da faixa testada.

Os resultados de esporulação obtidos com farelinho de arroz no experimento III foram bastante superiores aos resultados com BDA, confirmando os resultados obtidos no experimento I deste trabalho.

6- CONCLUSÕES

- a - Dos meios de cultura testados, o B de Takahashi, BDA e o de farelinho de arroz foram os melhores para o crescimento vegetativo de F.oryzae, representado pelos dez isolamentos utilizados.
- b - O meio basal de Otsuka modificado, o de Misato e o de farelinho de arroz foram os melhores para esporulação dos isolamentos de F.oryzae.
- c - Relativamente aos dados de esporulação por placa, os melhores resultados foram obtidos com os meios de farelinho de arroz, basal de Otsuka modificado, de Misato e básico de ágar modificado.
- d - Nenhum meio proporcionou abundante esporulação a todos os isolamentos de F.oryzae. O mesmo ocorreu quanto ao crescimento vegetativo.
- e - Os isolamentos se comportaram de maneira bastante diferente num mesmo meio de cultura, mostrando a grande variabilidade deste fungo.
- f - Utilizando meio basal sintético, a melhor faixa de relação carbono/nitrogênio para crescimento vegetativo foi a de 1:0,035 a 1:0,060.
- g - A melhor faixa de relação carbono/nitrogênio para a esporulação foi a de 1:0,045 a 1:0,055.
- h - Relativamente aos dados de esporulação por placa, a melhor faixa de relação carbono/nitrogênio foi a mesma obtida quando se baseou nos resultados de esporulação.
- i - Os meios de Tochinali, de Czapek e BDA não se prestaram para a esporulação de F.oryzae.
- j - O seguinte meio semi-sintético proporcionou abundante esporulação à maioria dos isolamentos de F.oryzae:

KH_2PO_4 = 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,5; CaCl_2 = 0,1 g; Fe^{+++}
(sulfato) = 0,2 mg; Zn^{++} (sulfato) = 0,2 mg; Mn^{++} (sulfa-
to) = 0,1 mg; biotina = 5 microgramas; tiamina = 100 mi
crogramas; caseína hidrolizada = 1,0 g; dextrose = 4,20 a
5,41 g; ágar-ágar = 20 g; água destilada para 1 litro; -
pH = 6,5.

7 - R E S U M O

Estudo do crescimento vegetativo e da esporulação em meios de cultura de diferentes composições, de Piricularia oryzae Cavana, agente causador do brusone do arroz.

Com o objetivo de selecionar um meio de cultura que proporcionasse abundante esporulação a diversos isolamentos de P.oryzae obtidos no Estado de São Paulo, através de uma técnica cultural simples, foi realizada esta pesquisa nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba, e da Seção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, em Campinas, no período de 1969 a 1972.

Num primeiro estudo, dez isolamentos de P.oryzae foram cultivados em cada um dos seguintes meios de cultura: B de Takahashi, A de Takahashi, Tochinal, Misato, Czapek, basal de Otsuka modificado, de farelinho de arroz, batata-dextrose-ágar, básico de ágar modificado, e meio de Tanaka.

De modo geral, os melhores meios de cultura para crescimento vegetativo foram Takahashi B, farelinho de arroz, batata-dextrose-ágar, e meio de Misato.

As melhores esporulações foram obtidas nos meios basal de Otsuka modificado, Misato, farelinho de arroz, e meio básico de ágar modificado. As melhores esporulações não foram, portanto, obtidas em todos os meios que proporcionaram melhor crescimento vegetativo.

Nenhum isolamento esporulou no meio de Tochinal, nem no de batata-dextrose-ágar. Somente um isolamento esporulou no meio de Czapek.

No segundo estudo, empregando um meio basal sintético cuja composição foi baseada nos meios basal de Otsuka modificado e no basal sugerido por Lilly & Barnett para estudos de fontes de carbono e nitrogênio para fungos, foram testadas diferentes relações C/N, utilizando dextrose como fonte de carbono e caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio. Foi utilizado somente um isolamento para o teste da faixa de relação C/N de 1:0,001 até 1:0,181, a intervalos variáveis, no qual se anotou somente a esporulação aos 13 dias de idade da colônia. A faixa que proporcionou melhor esporulação foi a de 1:0,034 a 1:0,048.

Um terceiro estudo foi realizado com a finalidade de, numa segunda tentativa, conhecer a faixa ou a relação C/N ideal para a esporulação de F.oryzae. Neste ensaio cultivaram-se cinco isolamentos de F.oryzae no mesmo meio que continha dextrose e caseína, utilizado no ensaio anterior, numa faixa de relação C/N de 1:0,020 até 1:0,060 a intervalos de 1:0,005. Avaliou-se o crescimento vegetativo pelo diâmetro da colônia aos 13 dias de idade.

A faixa de relação C/N mais favorável ao crescimento vegetativo foi de 1:0,035 a 1:0,060.

Na avaliação da esporulação os melhores resultados foram obtidos na faixa de relação C/N de 1:0,045 a 1:0,055, sendo a melhor esporulação a apresentada na relação 1:0,050.

A análise da variância de todos os dados dos três ensaios que compõem a pesquisa revelou diferenças significativas ao nível de 1% entre meios de cultura, entre isolamentos, e interação entre meios e isolamentos. A comparação das médias (de meios) foi feita pelo teste de Tukey, ao nível de 1%.

O seguinte meio sintético proporcionou abundante esporulação à maioria dos isolamentos de F.oryzae:

KH_2PO_4 = 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,5; CaCl_2 = 0,1 g; P^{+++} (sulfato) = 0,2 mg; Zn^{++} (sulfato) = 0,2 mg; Mn^{++} (sulfato) = 0,1 mg; biotina = 5 microgramas; tiamina = 100 microgramas; - caseína hidrolizada = 1,0 g; dextrose = 4,20 a 5,41 g; ágar ágar = 20 g; água destilada = 1000 ml; ph = 6,5.

8 - S U M M A R Y

Growth and sporulation of Piricularia oryzae Cav. on several culture media.

Ten different monoconidial isolates of P.oryzae were comparatively cultivated on the following culture media : Takahashi B, Takahashi A, Tochinai's, Misato's, Czapek's, modified, basal medium of Otsuka, rice polish agar potato dextrose agar, modified basal agar medium and medium of Tanaka.

Takahashi B, rice polish agar, potato dextrose agar and Misato media induced intensive vegetative growth. - Otsuka, Misato, rice polish agar and agar modified basal media, however, were more suitable for sporulation.

Dextrose and hydrolized casein were used preliminarily to produce different C/N ratios in a synthetic media. The best sporulations were obtained in the range of 1:0.034 to 1:0.048 C/N ratio. On basis of this information they were studied growth and sporulation patterns of five isolates of P.oryzae in C/N ratios varying from 1:0.020 to 1:0.060. Vegetative growth was maximum in the range of 1:0.035 to 1:0.060. Best sporulation conditions were obtained from 1:0.045 to 1:0.055.

The behavior of most of the isolates indicated that the best synthetic medium for sporulation is:

KH_2PO_4 = 1.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0.5 g; CaCl_2 = 0.1 g; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ = 0.2 mg; ZnSO_4 = 0.2 mg; MnSO_4 = 0.1 mg; thiamin = 100 μg ; biotin = 5 μg ; hidrolized casein = 1.0 g; dextrose = 4.20 - 5.41 g; agar-agar = 20.0 g; water = 1.0 lit.; pH 6.5.

9 -BIBLIOGRAFIA

1. ATKINS, J.G., GOTO, K., et al. An international set of rice varieties for differentiating races of Piricularia oryzae. Phytopathology 57:297-301, 1967.
2. BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 23º Anuário Estatístico, 1968. p. 146.
3. CAMPACCI, C.A. A brusone do arroz. Correio Agrícola (2):20-23, 1971.
4. CHEN, Y.S. et al. Studies on the carbon and nitrogen nutrition of Piricularia oryzae and Helminthosporium oryzae. Acta Phytopath. sin. 7(2):165-174.
5. CHUNG, H.S. & LA, Y.J. High sporulation media for Piricularia oryzae Cavara. Plant Prot. Suwon 1:26-28, 1962.
6. FRATTINI, J.A. & SOAVE, J. Tentativa de avaliação das perdas causadas pelo brusone nas culturas de arroz do Estado de São Paulo (a ser publicado na Revista de Agricultura, 1973).
7. GALLI, F. et al. Doenças do arroz. In - Manual de Fito patologia - Doenças das plantas e seu controle. p.171-174. São Paulo, Biblioteca Agron. Ceres, 1968. 640 p.
8. HENRY, B.W. & ANDERSEN, A.L. Sporulation by Piricularia oryzae. Phytopathology 38:265-277, 1948.
9. HUNG, C.S. & CHIEN, C.C. Investigation of physiological races of the blast fungus. Taiwan Agr. Res. Inst. Spec. Publication 3:31-37, 1961.
10. INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ - IRGA. 23º Anuário Estatístico, safra 1966/67, 1968.

11. LATTERELL, F.M., MARCHETTI, M.A. & GROVE, B.R. Co-ordination of effort to establish an international system for race identification in Piricularia oryzae. In-The Rice Blast Disease p. 257-274. Baltimore, Maryland, John Hopkins Press, 1963.
12. LEAVER, F.W., LEAL, J. & BREWER, C.R. Nutritional studies on Piricularia oryzae. J.Bact. 54(4):401-408, 1947.
13. LEE, Y.S. & WU, L.C. The nitrogen nutrition of P.oryzae. Bot. Bull. Acad. Sin. Taipei 8(1):66-72, 1967.
14. LILLY, V.G. & BARNETT, H.L. Physiology of the fungi. New York, McGraw-Hill Book Company Inc., 1951. 464 p.
15. LOZANO, T.J.C. & GALVEZ, E.G.E. Influencia de la temperatura en el crecimiento y esporulacion de P.oryzae Cav. Revista Inst. Colom. Agropec. 2(1):51-56, 1967.
16. MELLO, R.E.T. Observações sobre a brusone do arroz e seu controle. O Biológico 26:218-222, 1960.
17. OTANI, Y. Growth factors and nitrogen sources of Piricularia oryzae Cavara. (Resumo em inglês). Ann. Phytopath. Soc. Japan 17(1):9-15, 1952.
18. _____. Carbon sources of Piricularia oryzae Cavara. Ann. Phytopath. Soc. Japan 17:119-120, 1953.
19. OTSUKA, H., KINJIRO, T. & NAGAHIRO, O. Variability of Piricularia oryzae in culture. In - The Rice Blast Disease p. 69-109. Baltimore, Maryland, John Hopkins Press, 1963. 507 p.
20. OU, S.H. & AYAD, M.R. Pathogenic races of P.oryzae originating from single lesion and monoconidial cultures. Phytopathology 58:179-182, 1968.
21. PADWICK, G.W. Manual of rice diseases. Surrey, The Commonwealth Mycological Institute Kew, 1950, 198 p.

22. PRODUCTION YEARBOOK. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome, 1969. Vol. 23.
23. RAWLINS, T.E. Phytopathological and botanical research methods. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1933. 156 p.
24. RIKER, A.J. & RIKER, R.S. Introduction to research on plant diseases. St. Louis, John S. Swift Co., 1936. 117 p.
25. SACCARDO, P.A. Sylloge Fungorum X, 1892. p. 563.
26. SILVEIRA, V.D. Lições de Micologia, 3^a ed., Rio de Janeiro, J.Olympic, 1968. p.255
27. SUZUKI, H. Studies on media for sporulation and stock cultures of Piricularia oryzae Cavara. Ann. Phytopath. Soc. Japan 33 (extra issue):101-114, 1967.
28. SUZUKI, Y. & YOSHIMURA, S. Effect of light on sporulation of the rice blast fungus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 28:62-63, 1963.
29. TAKAHASHI, Y. A method to obtain many conidia of Piricularia oryzae on culture media. Nogyo Gizitsu Japan 10:563-565, 1955.
30. TANAKA, S. Nutrition of Piricularia oryzae in vitro. In-The Rice Blast Disease. Baltimore, Maryland, John Hopkins Press, 1963. p. 23-33.
31. TOCHINAI, Y. & NAKANO, T. Studies on the nutritional physiology of Piricularia oryzae Br. et Cav. J.Faculty Agr. Hokkaido Imp. Univ. 44:183-229, 1940. (Abstracted in Rev. Applied Mycol. 20:275, 1941).
32. TSENG, T.C., LEE, Y.S. & WU, L.C. Sporulation by physiologic races of P.oryzae Cavara. Bot. Bull. Acad. Sin. Taipei 6(2):182-188, 1965.

33. VIÉGAS, A.P. Dicionário de Fitopatologia de Micologia.-
Campinas, Instituto Agronômico, 1961. 681 p. (Datilo
grafado). (p.107 - verbete "Brusone", s.m., do ital.
Brusose del riso).
34. WEINTRAUB, R.L., WILLIAM, E.M. & EDWARD, J.S. Stimula-
tion of germination of spores of Piricularia oryzae
by sapogenins. Phytopathology 47:36, 1957.
35. _____, _____, _____. Chemical stimulation of
germination of spores of Piricularia oryzae. Phytopa-
tology 48:7-10, 1958.