

MUDANÇAS EM ESPORULAÇÃO E PATOGENICIDADE DE  
*Helminthosporium sativum* Pamm., King & Bakke ATRAVÉS DE  
PASSAGENS SERIADAS EM HOSPEDEIROS

CARLOS CASTRO

Orientador: HIROSHI KIMATI

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

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Maio, 1976

Aos

meus pais

e

irmãos

DEDICO

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

Nossos Agradecimentos:

- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), que possibilitaram a participação no Curso Pós-Graduação.
- Ao Dr. Hiroshi Kimati, pela orientação, pelas sugestões e pela revisão dos originais.
- Aos Dr.<sup>s</sup> Ferdinando Galli e Clélio Lima Salgado, pelas sugestões e revisão dos originais.
- Ao Dr. Paulo C. T. de Carvalho, pelo incentivo e apoio ao presente trabalho.
- Ao Dr. Décio Barbin, pela colaboração nas análises estatísticas.
- Ao Dr. Clyde C. Allison, pela versão para o inglês do resumo.
- Ao Colega Mário Tomazello Filho, pelo empréstimo da torre de Potter.
- Às Bibliotecárias e aos Funcionários da Biblioteca Central da E. S. A. "Luiz de Queiroz", pela colaboração prestada.
- À Cooperativa Tritícola de Passo Fundo, pelo auxílio financeiro prestado.

A todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

## S U M Á R I O

	Página
1 - RESUMO .....	1
2 - INTRODUÇÃO .....	3
3 - REVISÃO DE LITERATURA .....	5
4 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
4.1 - Efeito de meios de cultura e da luminosidade na esporulação de <i>Helminthosporium sativum</i> .....	12
4.1.1 - Isolado .....	12
4.1.2 - Meios de cultura para produção de conídios ..	13
4.1.3 - Métodos de plaqueamento, tratamentos e incubação .....	13
4.1.4 - Preparo da suspensão e método de avaliação ..	14
4.2 - Efeito da concentração do inóculo de <i>H. sativum</i> em testes de inoculação em semente e em "seed- ling" de trigo, aveia e cevada .....	14
4.2.1 - Isolado .....	14
4.2.2 - Obtenção do inóculo .....	15
4.2.3 - Preparo da suspensão, padronização das concentrações, métodos de inoculação e tratamentos .....	15
4.2.4 - Teste de patogenicidade .....	16
4.2.5 - Métodos de avaliação .....	17
4.3 - Efeito de passagem seriadas de um isolado <i>H.</i> <i>sativum</i> em três espécies hospedeiras .....	18
4.3.1 - Isolado .....	18

	Página
4.3.2 - Obtenção e preparo do inóculo .....	18
4.3.3 - Passagens seriadas sobre plantas hospedeiras e tratamentos .....	18
4.3.4 - Métodos de avaliação .....	19
5 - RESULTADOS .....	20
5.1 - Efeito de meios de cultura e da luminosidade na esporulação de <i>Helminthosporium sativum</i> .....	20
5.2 - Efeito da concentração do inóculo de <i>H. sativum</i> em testes de inoculação em semente e em "seedling" de trigo, de aveia e de cevada .....	22
5.3 - Efeito de passagens seriadas de um isolado de <i>H. sativum</i> em três espécies hospedeiras .....	26
6 - DISCUSSÃO .....	31
7 - CONCLUSÕES .....	36
8 - SUMMARY .....	38
9 - LITERATURA CITADA .....	40
10 - APÊNDICE .....	49

## 1 - RESUMO

O presente trabalho versa sobre o comportamento de *Helminthosporium sativum* P. K. & B. *in vitro* e *in vivo*, objetivando esclarecer alguns aspectos da obtenção do inóculo e da patogenicidade de um isolado, após quatro gerações em três espécies hospedeiras.

O autor estudou alguns fatores ambientais que influem na esporulação, chegando às seguintes conclusões: a luminosidade contínua (luz fluorescente), independente do meio de cultura, inibe a formação de confídios; dentre os meios de cultura estudados (BDA, farinha de trigo agar, farinha de aveia agar e farinha de cevada agar), o melhor meio para produção de inóculo, sob escuridão contínua, foi o de farinha de cevada agar.

Inoculou-se sementes e "seedlings" de trigo, de aveia e de cevada com quatro concentrações de inóculo ( $1 \times 10^4$ ;  $5 \times 10^4$ ;  $2,5 \times 10^5$  e  $1,25 \times 10^6$  confídios por ml), concluindo-se que, de um modo geral,

o índice de doença aumentou com a quantidade de inóculo. Entretanto, a ordem decrescente de resistência, para as hospedeiras utilizadas, variou em função do método de inoculação empregado.

Um isolado de *Helminthosporium sativum* foi passado seriamente em "seedlings" de trigo, de aveia e de cevada em casa de vegetação. Após quatro passagens, fez-se inoculação cruzada de cada uma das subculturas. Baseado no número de lesões e esporulação *in vitro*, o autor concluiu que qualquer das hospedeiras pode exercer pressão de seleção sobre o fungo, alterando a sua patogenicidade.

## 2 - INTRODUÇÃO

A cultura do trigo, um dos mais importantes cereais na ali mentação humana, tem seu rendimento, entre nós, seriamente limitado por diversos fatores, dentre os quais as condições climáticas adversas, os financiamentos insuficientes e as doenças.

A Helminthosporiose, doença causada por *Helminthosporium sativum* P. K. & B. , encontra-se amplamente difundida na maior parte dos países que cultivam cereais. SILVA (1966) afirma que, no Brasil, a importância do efeito do *Helminthosporium* em trigo não tem sido avalia da em virtude de sua incidência simultânea com outras doenças. Apesar de sua ocorrência sob condições muitas vezes desfavoráveis, em culturas diferentes, causando danos em todos os órgãos da planta, em qualquer estágio de desenvolvimento, pouco se conhece do seu comportamento em nossas condições.



Segundo HARDING (1972) , todas as variedades de *Triticum aestivum* L. , até então cultivadas, apresentam algum grau de suscetibilidade à doença, mas já foram produzidas linhagens altamente resistentes (SALLANS e TINLINE, 1965). Entretanto, os fungos fitopatogênicos são dotados de uma certa variabilidade que pode ser explicada por quatro mecanismos básicos (BUXTON, 1960): mutação, heterocariose, recombinação, e adaptação.

Supondo que gerações sucessivas do fungo sobre plantas hospedeiras, contribuam para uma seleção natural de tipos mais patogênicos, o presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito de passagens seriadas em espécies de hospedeiras diferentes.

Uma vez que a produção e a concentração do inóculo são aspectos importantes que devem ser considerados em testes de inoculação, estudou-se o efeito de alguns desses fatores na esporulação de *Helminthosporium sativum*.

### 3 - REVISÃO DE LITERATURA

A doença do trigo causada por *Helminthosporium sativum* P. K. & B., foi primeiramente registrada por Sorokin, em 1890, no sul da região de Ussuria (Rússia) e seu agente descrito por Pammel, King e Bakke, em 1910 (DICKSON, 1956). Sua patogenicidade em "seedlings" de trigo foi demonstrada por JOHNSON (1914).

Difundida na maior parte dos países que cultivam cereais, constitui problema econômico em muitos deles (MACHACEK, 1943; SALLANS, 1948; TOCHINAI e UI, 1953; WOOD *et alii*, 1954), podendo reduzir a produção de cevada de 50% (CLARK e WALLEN, 1969) a 71% (WOOD, 1959).

O fungo é conhecido na literatura por diversos sinônimos e sua classificação está baseada em caracteres morfológicos de suas estruturas de frutificação. Outras características do microorganismo são apresentadas por LUTTRELL (1954) e DICKSON (1956). DOSDAL e CHRISTENSEN (1923) chamam a atenção para os cuidados na determinação baseada em as-

pectos morfológicos de conídio, devido à sua grande variabilidade.

ELLIOT (1949) demonstrou que pequenas alterações nas condições ambientais podem resultar em <sup>nu.</sup>aplas diferenças na morfologia deste fungo.

Sobrevive em tecidos de planta na forma de micélio ou no solo como conídios, que podem se transformar em clamidosporos (MERONUCK e PEPPER, 1968).

Sua disseminação, na forma conidial, ocorre, principalmente, por meio das sementes e solo, podendo infectar a planta em qualquer fase de seu desenvolvimento. Os sintomas mais característicos, semelhantes em trigo e outras gramíneas, são necroses no tecido radicular, na região da coroa, no colmo, nas folhas e espigas (CHRISTENSEN, 1926 ; DICKSON, 1956 ; McKINNEY, 1923).

A forma perfeita é um ascomiceto heterotático, *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Dreschsler ex Dastur, obtida somente em culturas de laboratório (TINLINE, 1962).

A temperatura ótima para germinação do conídio, penetração e infecção está entre 22<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup>C , enquanto para produção de conídios está na faixa de 24<sup>o</sup> a 28<sup>o</sup>C (ANDERSEN, 1952), sendo o tamanho e o número dos esporos grandemente influenciados pelo meio de cultura e temperatura (CHRISTENSEN, 1926 ; OOSDALL e CHRISTENSEN, 1923 ; MORTON, 1962).

O desenvolvimento da doença em "seedlings" de cevada ocorre entre 8 e 28<sup>o</sup>C , com um ótimo a 20<sup>o</sup>C (CLARK e DICKSON, 1958).

O efeito da luz sobre a produção de conídios de *H. sativum*, ainda é discutível. CHRISTENSEN (1926) afirma que a luz não é essencial à formação de esporos ; em seus experimentos a esporulação foi maior sob escuridão contínua. Porém, JOHNSON e HALPIN (1952), estudando a espor-

rulação desse fungo sob diferentes regimes luminosos, verificaram que a formação de conídios era maior nas culturas expostas à luz contínua, de 200 ou 500 "foot-candles", do que naquelas incubadas sob escuridão contínua.

Com relação à qualidade da luz, os resultados também são contraditórios. RANGASWAMI e GOVINDARANJAN (1961) observaram que *H. sativum* pode aumentar ou diminuir a esporulação, após exposição à radiação ultra-violeta. Entretanto, YADAV (1963) verificou que, a produção de conídios, desse mesmo fungo, não foi alterada, nem pela radiação ultra-violeta, nem pela luz visível.

Mais recentemente, CHANG (1974) cita que diversos autores tem demonstrado que a produção de conídios de espécies de *Helminthosporium*, na maior parte das espécies testadas, depende de luz. Segundo o mesmo autor, *H. sativum* produziu conídios, nos meios de batata-sacaro-se-agar e de Czapek, independente de luz; entretanto, a esporulação foi maior quando as culturas foram mantidas sob luz alternada.

A superposição de papel de filtro no meio de cultura, induziu maior esporulação de *H. sativum* (BEAN e WILCOXSON, 1964). Esse aumento pode ser atribuído à maior superfície de esporulação e à maior capacidade do fungo atacar a celulose (GARRET, 1963; GARRET, 1971). Extratos de tecido infectado continha, entre outros enzimas, celulase (MUSE *et alii*, 1972). A produção de conídios de *H. sativum* sobre papel de filtro permitiu uniformizar o tamanho e a idade do inóculo, sem alterar a patogenicidade (LUKENS, 1960).

A influência de fatores ambientais na incidência da helminthosporiose tem sido estudada por diversos autores. Entretanto, relati-

vamente poucos estudos foram realizados sobre o efeito da concentração do inóculo de *H. sativum*.

A concentração do inóculo, segundo WALKER (1965) e VAN DER PLANK (1975), é um dos fatores mais importantes na seleção de variedades resistentes. MORTON (1962), inoculando folhas destacadas de diferentes variedades de cevada, verificou que a concentração de  $15 \times 10^4$  confídios/ml sempre causou mais rápido e severo desenvolvimento de sintomas do que  $15 \times 10^3$  confídios/ml. BEAN e WILCOXSON (1964), inoculando "seedlings" de *Poa pratensis* com  $2,6 \times 10^3$ ,  $5,2 \times 10^3$  e  $10,4 \times 10^3$  confídios/ml, observaram que a concentração de  $10,4 \times 10^3$  confídios/ml causava maior severidade de doença.

Vários autores (HOSFORD *et alii*, 1975; PON, 1952; ROBLES, 1949; SANFORD e BROADFOOT, 1934; WOOD *et alii*, 1954) têm enfatizado a variabilidade genética de *H. sativum*. CHRISTENSEN (1925), afirma que *H. sativum* é um grupo de espécies constituído de muitas formas fisiológicas. Os critérios, para determinação dessa especialização, variam. Esse autor identificou 37 formas, baseado-se simplesmente em caracteres culturais. Outros autores (ASWORT *et alii*, 1960; ROTH e SCHAFER, 1968; VENORIG, 1956; WOOD, 1962), baseando-se apenas em patogenicidade sobre diferentes espécies hospedeiras, encontraram certa especialização. HAMILTON *et alii* (1960), ao testar sete isolados de *H. sativum* em quatro variedades de cevada, afirmaram não haver evidências de uma resposta diferencial no teste de variedades para esses isolados. Isto foi interpretado como indicando a ausência de raças fisiológicas dentro de *H. sativum*. Os isolados, entretanto, diferiram em graus de virulência, que, por si, poderia ser usado como um critério

para evidência de linhagens ou raças. Segundo WOOD (1962), raças ou biótipos, desse fungo, são numerosos na natureza, o que complica o problema de desenvolvimento e manutenção de variedades resistentes.

De um modo geral, as pesquisas mostram que isolados do patógeno diferem amplamente em patogenicidade ; isto leva a pensar que o uso de variedades resistentes contribuirá para a seleção de tipos patogênicos mais aptos a sobreviver.

A variabilidade em *H. sativum* foi atribuída mais à mutação que à heterocariose (CHRISTENSEN e DAVIES, 1937) ; entretanto, a frequência de mutação desse fungo, na natureza é aproximadamente 1:2900 (CHRISTENSEN e SCHNEIDER, 1948). TINLINE (1962) demonstrou que a parassexualidade é um mecanismo de variação nesse microorganismo e afirma que o frequente setoramento em culturas de laboratório e flutuações na virulência de linhagens, podem ser devido à síntese ou dissociação de heterocarions ou, à produção de recombinantes de diplóides heterozigotos. Além disso, o mesmo autor, diz que variações devido a heterocariose podem ser reduzidas pelo isolamento de esporos em gerações sucessivas, pois os heterocarions não diplóides dissociam-se prontamente.

Mudanças adaptativas foram consideradas um possível método de variação em fitopatógenos (BUXTON, 1960 ; GAUMANN, 1950 ; TINLINE e McNEILL, 1969). Segundo BUXTON (1960) , adaptação em microorganismos é a aquisição de habilidade de desempenhar algum processo fisiológico que antes não podia realizar ou, pelo menos, não podia realizar efetivamente. O mesmo autor, afirma que o papel desempenhado pela adaptação, ainda é relativamente desconhecido e que as atuais investigações tomaram

duas principais direções, uma concernente à adaptação de fungos sob condições culturais e a outra à adaptação em patogenicidade.

MAŁONE (1968) e SHERIDAN (1968) encontraram que linhagens de *Helminthosporium avenae* desenvolviam resistência a organo-mercuriais usados no tratamento de sementes.

O efeito de passagem de hospedeiro, segundo BUXTON (1960), foi extensivamente usado em fungos por um grupo de fitopatologistas liderado por Marshall Ward, no final do século passado.

CHRISTENSEN (1929) verificou que a passagem de certos isolados de *H. sativum* em trigo, pode induzir modificações nos caracteres culturais; porém, BROWN e MILLER (1954) não observaram alteração nas características do conídio desse fungo, após duas gerações em diferentes variedades de aveia. GAYED (1962) chama a atenção para o fato de que alterações morfológicas do conídio não implicam, necessariamente, em modificações na virulência.

Estudos sobre o efeito de passagens seriadas de *H. turcicum* em variedades de milho suscetíveis, mostraram que a patogenicidade e caracteres culturais de dois isolados monoconidiais eram modificados (ROBERT e JENKINS, 1949). Entretanto, KINSEY e HOOKER (1973), baseando-se no tipo de lesão e número de esporos formados nas lesões, verificaram que a virulência e/ou agressividade de duas populações desse patógeno não era alterada, após seis passagens em "seedlings" de variedades suscetíveis e com resistência monogênica. Os autores supõem que a falta de adaptação do fungo deve estar associada ao reduzido número de passagens e/ou à ausência de tipos altamente agressivos da coleção de esporos usados.

Por outro lado, CHRISTENSEN e SCHNEIDER (1948) observaram que após cinco sucessivas passagens de uma linhagem de *H. sativum* em plantas de trigo, a patogenicidade não se alterava porém, os caracteres culturais divergiam da cultura original.

As causas da mudança na população dos patógenos têm sido atribuídas ao uso de variedades com resistência específica (WATSON, 1970) ; e a evidência para patogenicidade adaptativa, de algum modo, pode explicar o súbito aparecimento de doenças em áreas ou entre variedades de hospedeiro nas quais não foram previamente relatadas (BUXTON, 1960).



#### 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios e casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, entre 1974 e 1976 .

##### 4.1 - EFEITO DE MEIOS DE CULTURA E DA LUMINOSIDADE NA ESPORULAÇÃO DE *Helminthosporium sativum*

###### 4.1.1 - Isolado

A cultura de *H. sativum* utilizada neste experimento foi obtida de folhas da variedade de Trigo Lagoa Vermelha, procedente de Passo Fundo (RS) , com características semelhantes às descritas por BARNETT e HUNTER (1972). Dentre os vários isolamentos esta era uma das culturas que menos esporulava em BDA .

#### 4.1.2 - Meios de cultura para produção de conídios

Estudou-se a produção de conídios em quatro meios de culturas: BDA (extrato de batata, 20 g ; dextrose, 10 g ; agar, 12 g ; água, q.s.p. 1000 ml) , farinha de aveia agar (farinha de aveia, 60 g ; agar, 12 g ; água, q.s.p. 1000 ml) , farinha de cevada agar (farinha de cevada, 60 g ; agar, 12 g ; água, q.s.p. 1000 ml) e farinha de trigo agar (farinha de trigo, 60 g ; agar, 12 g ; água, q.s.p. 1000 ml) . Os dois primeiros meios foram feitos de acordo com TUIITE (1969).

Todos os meios, com pH inicial entre 6,0 e 6,5 , foram esterilizados em autoclave (20 minutos a 120°C) .

#### 4.1.3 - Métodos de plaqueamento, tratamentos e incubação

Os meios foram vertidos em placas de Petri, na base de 20 ml por placa, superpondo-se papel de filtro (Whatman nº 1) na superfície do meio de cultura solidificado (BEAN e WILCOXSON, 1964).

A partir de um isolado selvagem, transferiu-se um disco de cultura da região periférica da colônia para o centro de cada placa. Os discos de cultura, foram obtidos através de um vasador de rolha com 5,0 mm de diâmetro.

As placas assim inoculadas foram incubadas, durante dez dias, sob dois regimes de luz: luz contínua e escuridão contínua, no interior de uma Biotronet Mark III , distante 30 cm da fonte luminosa (dois tubos fluorescente GE de 40 watts, luz do dia, r 40 ID) . A escuridão foi obtida envolvendo-se as placas de Petri em folhas de alumínio. A temperatura manteve-se entre 22°C e 28°C .

Assim, o delineamento experimental foi um fatorial 4 x 2 (quatro meios de cultura em dois regimes de luz), em blocos ao acaso, com quatro repetições, num total de 32 parcelas, cada uma representada por uma placa.

#### 4.1.4 - Preparo da suspensão e método de avaliação

A suspensão de conídios foi obtida por lavagem e pincelamento da superfície da colônia. A avaliação foi baseada no número de conídios produzidos por placa de Petri, suspensos em 15 ml de água destilada esterilizada, contendo um dispersante (uma gota de Tween 80/100 mililitro), segundo ROTH e SCHAFER (1968), e contados em Hemocitômetro.

Na avaliação ainda foi feito teste da germinação dos conídios em água estéril.

## 4.2 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO DE *H. sativum* EM TESTES DE INOCULAÇÃO EM SEMENTE E EM "SEEDLING" DE TRIGO, AVEIA, E CEVADA

### 4.2.1 - Isolado

A cultura de *H. sativum* (código 43) foi isolada em meio BOA de lesões de folhas da variedade de trigo Frontana proveniente da lavoura do município de Passo Fundo (RS), e apresentava caracteres semelhantes aos descritos por BARNETT e HUNTER (1972). Foi escolhido este isolado selvagem devido à sua capacidade de produzir reduzida quantidade

de micélio e abundante quantidade de esporos ; o que facilitaria a obtenção dos conídios. A manutenção deste isolado foi feita em solo estéril, segundo TUIITE (1969), mantendo-o em refrigerador. Dentre os métodos empregados na conservação de culturas de *Helminthosporium spp.* por longo tempo, sem alterar sua virulência, a manutenção em solo estéril é a que oferece mais vantagens (FENNEL, 1960 ; JONE, 1974 ; SLEESMAN *et alii*, 1974).

#### 4.2.2 - Obtenção do inóculo

Para produção do inóculo, utilizaram-se caixas de Petri , com BDA , preparadas conforme 4.1.2 ; seguindo-se a técnica de placa-mento descrita em 4.1.3.

As placas (aproximadamente 40) foram incubadas em câmara escura à temperatura de  $24 (\pm 1) ^\circ\text{C}$  , durante dez a quatorze dias, segundo HARDING (1971).

#### 4.2.3 - Preparo da suspensão, padronização das concentrações, métodos de inoculação e tratamentos.

No final do período de incubação, os esporos foram suspensos de modo semelhante à técnica descrita no ítem 4.1.4 . A partir da suspensão concentrada, por diluição e contagem em Hemocitômetro, obteve-se as quatro seguintes concentrações:  $1 \times 10^4$  ;  $5 \times 10^4$  ;  $2,5 \times 10^5$  e  $1,25 \times 10^6$  conídios por mililitro. Nas diluições, também utilizou-se água estéril com o dispersante. A suspensão conidial padronizada foi inoculada em três espécies hospedeiras, quais sejam: trigo (*Triticum aes*

*tivum* L.) da variedade Frontana, aveia (*Avena sativa* L.) da variedade IORN 36/67 e cevada (*Hordeum vulgare* L.) da variedade Breuns Volla. A primeira proveniente do Centro Nacional de Pesquisas de Trigo (Passo Fundo, RS) e as duas últimas da Estação Experimental do Instituto Agrônômico (Capão Bonito, SP) .

Esta investigação, conduzida em casa-de-vegetação, foi subdividida em dois experimentos: 1) Inoculação em semente ; e 2) Inoculação em "seedling". Em qualquer dos experimentos, o delineamento experimental foi um fatorial 5 x 3 (quatro concentrações, mais a testemunha, em três hospedeiras) em blocos ao acaso, com três repetições, totalizando quinze tratamentos. Cada repetição era representada por um vaso com dez plantas.

#### 4.2.4 - Teste de patogenicidade

Em ambos os métodos de inoculação utilizaram-se vasos de alumínio com as seguintes dimensões: 15 cm de diâmetro na boca, 10 cm de diâmetro na base e 16 cm de altura ; contendo 1,80 litros de solo.

O substrato usado foi uma mistura de solo argiloso, matéria orgânica e areia (3:2:1) autoclavada a 127<sup>o</sup>C durante uma hora. Em cada vaso foram semeadas dez sementes pré-germinadas. A pré-germinação, usando-se sementes com a superfície previamente esterilizada em Q-Boa diluída (1,25% de hipoclorito de sódio), foi feita em papel toalha.

As testemunhas receberam apenas água esterilizada.

A técnica de inoculação em semente foi semelhante à empregada por SALLANS (1933) , isto é, imersão das sementes na suspensão de conídios durante vinte minutos aproximadamente. Em seguida, procedeu-se a semeadura nos vasos.

A técnica de inoculação em "seedling" foi semelhante à utilizada por ARNY (1951) e SILVA (1966) , pulverizando-se 10 mililitros da suspensão de esporos por vaso, quando as plantinhas estavam com a segunda folha bem desenvolvida ; e utilizando-se a torre de Potter com 10 libras de pressão, aproximadamente, segundo CLARK e DICKSON (1958) ; SAYAGO (1973) e YORINORI e THURSTON (1971).

Antes da inoculação os "seedlings" permaneceram em câmara úmida durante 24 horas para aumentar a eficiência da inoculação, comprovada pelos resultados obtidos preliminarmente. Após a inoculação, os "seedlings" foram incubados em câmara úmida durante 48 horas, segundo BEAN e WILCOXSON (1964).

As inoculações foram sempre feitas entre 17:30 e 18:30 horas. A temperatura na casa-de-vegetação, durante o experimento, variou na faixa de 25<sup>o</sup> a 30<sup>o</sup>C .

#### 4.2.5 - Métodos de avaliação

As leituras foram feitas uma semana após a inoculação.

No teste de inoculação em semente, a avaliação foi baseada na altura e no número de plantas vivas por vaso. No teste de inoculação em "seedling" a avaliação foi baseada no número de lesões na segunda folha (dez folhas por vaso). Para análise da variância do número de lesões os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  .

#### 4.3 - EFEITO DE PASSAGENS SERIADAS DE UM ISOLADO DE *H. sativum* EM TRÊS ESPÉCIES HOSPEDEIRAS

##### 4.3.1 - Isolado

O isolado usado neste ensaio foi o mesmo descrito em 4.2.1, até então, conservado em solo estéril.

##### 4.3.2 - Obtenção e preparo do inóculo

O inóculo foi obtido e preparado de modo semelhante ao experimento anterior. A concentração do inóculo, antes de cada passagem, foi ajustada para aproximadamente  $1 \times 10^5$  conídios por ml. Para avaliar a patogenicidade de cada isolado após as quatro passagens, antes da inoculação cruzada, a concentração foi padronizada em  $1,25 \times 10^6$  conídios por ml, tendo em vista os resultados do experimento anterior.

##### 4.3.3 - Passagens seriadas sobre plantas hospedeiras e tratamentos

O isolado 43 foi seriadamente passado, quatro vezes nas plantas hospedeiras. As espécies hospedeiras, os materiais e a técnica de inoculação (em "seedling") empregadas foram as mesmas descritas no experimento anterior.

A fim de aumentar o inóculo, no intervalo de cada passagem, quatorze dias após a inoculação, conídios de lesões esporulantes foram transferidos para BDA com o auxílio de lupa binocular (120 x) e alça de platina. A multiplicação do inóculo foi conduzida nas mesmas condi-

ções do experimento anterior. LUKENS (1960) verificou que esse meio de cultura, nessas condições, não alterou a patogenicidade de *Helminthosporium vagans*.

Após a quarta passagem, os quatro isolados (a cultura original como testemunha e as três subculturas) foram testados nas três hospedeiras (trigo, aveia e cevada), de modo a constituir um ensaio fatorial 4 x 3 em blocos ao acaso, com quatro repetições, totalizando doze tratamentos. Cada repetição era representada por um vaso com dez plantas.

#### 4.3.4 - Métodos de avaliação

Neste experimento utilizou-se dois métodos de avaliação:

- 1) número de lesões formadas na segunda folha aos três dias após a inoculação , e
- 2) número de esporos formados por isolado *in vitro* , segundo técnica descrita em 4.1.2 e 4.1.4 , usando-se três repetições (caixas de Petri) por tratamento.

Assim, foi comparada a esporulação das três subculturas com a esporulação do isolado original (antes e após conservação em solo estéril).



## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - EFEITO DE MEIOS DE CULTURA E DA LUMINOSIDADE NA ESPORULAÇÃO DE *Helminthosporium sativum*

Os resultados deste experimento são apresentados, resumidamente, na Tabela 1 , e os dados originais e a análise da variância no Apêndice 1 .

TABELA 1 - Efeito do meio de cultura e regime de luz na formação de conídios de *H. sativum*.

Meio de Cultura	Número médio de conídios ( $\times 10^4$ ) por placa sob (1)		Média
	Luz contínua	Escuridão contínua	
BDA	63,50 a	113,25 b	88,37
Trigo	60,50 a b	116,75 b	88,66
Aveia	36,25 a b	81,75 b	59,00
Cevada	17,25 b	417,50 a	217,37

(1) Média de quatro repetições, cada repetição representada pela contagem de esporos em hemocitômetro por placa.

Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente, ao nível de 1% (teste de Tukey).

C. V. = 17,37%

A análise da variância mostrou que a produção de conídios sob escuridão contínua foi significativamente maior que sob luz contínua em todos os meios de cultura, havendo interação significativa entre meio e regime de luz. O melhor meio para esporulação sob escuridão contínua foi farinha de cevada agar, enquanto sob luz contínua foram os outros (BDA, farinha de trigo agar e farinha de aveia agar), que não diferiram significativamente entre si (ao nível de 1%).

Além desses resultados, observou-se que a germinação dos esporos produzidos, tanto na presença como na ausência de luz, em água estéril, foi de 90 a 100%.

5.2 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO DE *H. sativum* EM TESTES DE INOCULAÇÃO EM SEMENTE E EM "SEEDLING" DE TRIGO, DE AVEIA E DE CEVADA

Os resultados deste experimento, instalado em 20 de maio e colhido em 23 de junho de 1975, quanto ao teste de inoculação em semente, são apresentados, resumidamente, nas Tabelas 2 e 3, e quanto ao teste de inoculação em "seedling", na Tabela 4. Os dados originais correspondentes e suas análises estatísticas se encontram no Apêndice 2.

TABELA 2 - Efeito da concentração do inóculo na sobrevivência de plantas de três espécies gramíneas:

Concentração	Número médio de plantas sobreviventes por vaso (1)			Média
	Trigo	Aveia	Cevada	
C <sub>0</sub>	10,00	10,00 a	10,00 a	10,00
C <sub>1</sub>	10,00	8,66 a b	9,33 a	9,33
C <sub>2</sub>	10,00	9,00 a b	8,66 a	9,22
C <sub>3</sub>	10,00	8,00 a b c	9,00 a	9,00
C <sub>4</sub>	10,00	6,00 c	4,66 b	6,88

(1) Média de três repetições, cada repetição representada por um vaso, contendo dez plantinhas.

Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente ao nível de 1% (teste de Tukey).

C<sub>0</sub> = testemunha;

C<sub>1</sub> = 1 × 10<sup>4</sup> conídios por ml ;

C<sub>2</sub> = 5 × 10<sup>4</sup> conídios por ml ; C<sub>3</sub> = 2,5 × 10<sup>5</sup> conídios por ml ;

C<sub>4</sub> = 1,25 × 10<sup>6</sup> conídios por ml ;

C. V. = 8,97 %

TABELA 3 - Efeito da concentração do inóculo no desenvolvimento de plantas de três espécies gramíneas.

Concentração	Altura média das plantas (1)			Médias (2)
	Trigo	Aveia	Cevada	
C <sub>0</sub>	24,33	16,33	16,66	19,11 a
C <sub>1</sub>	22,66	15,66	16,33	18,22 a b
C <sub>2</sub>	21,66	13,66	14,00	16,44 b
C <sub>3</sub>	20,66	8,66	11,66	13,66 c
C <sub>4</sub>	17,66	6,33	7,33	10,44 d
Média (2)	21,40 a	12,13 b	13,20 b	15,57

(1) Média de três repetições, cada repetição representada por um vaso contendo dez plantinhas.

(2) Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente ao nível de 1% (teste de Tukey).

C<sub>0</sub> = testemunha;

C<sub>1</sub> = 1 x 10<sup>4</sup> conídios por ml ;

C<sub>2</sub> = 1 x 10<sup>4</sup> conídios por ml ;

C<sub>3</sub> = 2,5 x 10<sup>5</sup> conídios por ml ;

C<sub>4</sub> = 1,25 x 10<sup>6</sup> conídios por ml .

C. V. = 9,54%

TABELA 4 - Efeito da concentração do inóculo na incidência de doença em folhas de três espécies gramíneas.

Concen- tração	Número médio de lesões por folha (1)						Média
	Trigo		Aveia		Cevada		
C <sub>0</sub>	0,00	b	0,00	c	0,00	d	0,00
C <sub>1</sub>	0,03	b	0,03	b c	0,30	d	0,12
C <sub>2</sub>	0,30	b	0,70	b c	8,66	c	3,20
C <sub>3</sub>	5,00	a	1,66	a b	23,66	b	10,07
C <sub>4</sub>	9,00	a	4,33	a	50,66	a	21,33

(1) Média de três repetições, cada repetição representada por um vaso contendo dez plantas.

Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente ao nível de 1% , pelo teste de Tukey para dados transformados em

$$\sqrt{x + 0,5}$$

C<sub>0</sub> = testemunha;

C<sub>1</sub> = 1 x 10<sup>4</sup> conídios por ml;

C<sub>2</sub> = 5 x 10<sup>4</sup> conídios por ml;

C<sub>3</sub> = 2,5 x 10<sup>5</sup> conídios por ml;

C<sub>4</sub> = 1,25 x 10<sup>6</sup> conídios por ml.

C. V. = 12,66%

A análise da variância (vide Apêndice 2) revelou efeito significativo (ao nível de 1%) de hospedeiras e de concentrações nos três métodos de avaliação. Houve interação (hospedeira x concentração) no número de plantas sobrevivente (Tabela 2) e no número de lesões (Tabela 4) ; porém, não houve interação na altura de plantas (Tabela 3).

O desdobramento da interação, correspondente aos resultados da Tabela 2 , mostrou que a significância, ao nível de 1% , de hospedeiras dentro de concentrações foi devido apenas ao efeito da concentração  $C_4$  ( $1,25 \times 10^6$  confídios/ml) sobre o número de plantas de aveia e de cevada sobreviventes. Nesse aspecto, enquanto as concentrações não mostraram diferença significativa para trigo, houve alta significância para concentrações dentro de aveia e cevada.

O desdobramento da interação, correspondente aos resultados da Tabela 4 , revelou que a variação de hospedeiras dentro das concentrações 0 e  $1 \times 10^4$  confídios por ml não afeta significativamente o número de lesões por folha. Entretanto, as hospedeiras tiveram efeito significativo, ao nível de 1% , quando as concentrações foram  $5 \times 10^4$  ;  $2,5 \times 10^5$  e  $1,25 \times 10^6$  confídios/ml. Por outro lado, a variação das concentrações dentro das hospedeiras teve efeito significativo (ao nível de 1%) sobre o número de lesões, conforme está indicado na Tabela 4 .

Para menor suscetibilidade à inoculação em semente, destacou-se o trigo (vide Tabelas 2 e 3) , enquanto à inoculação em "seedling" destacou-se a aveia (vide Tabela 4) .

O efeito da concentração do inóculo, em ambos os métodos de inoculação, aumentou a medida que as concentrações aumentaram, exceto para número de plantas de trigo sobreviventes, no qual não houve variação.

A análise do coeficiente da correlação linear entre o número de lesões em folha e o número de plantas sobreviventes apresentou valor  $r = - 0,57$  com  $t = - 4,04$  ; enquanto a correlação entre o número de lesões e a altura das plantas apresentou valor  $r = - 0,47$  com  $t = - 3,52$  , ambos altamente significativos.

### 5.3 - EFEITO DE PASSAGENS SERIADAS DE UM ISOLADO DE *H. sativum* EM TRÊS ESPÉCIES HOSPEDEIRAS

Os resultados deste experimento, instalado em 5 de outubro de 1975 e colhido em 20 de janeiro de 1976 , quanto ao número de lesões formadas em folhas, são apresentados nas Tabelas 5 e 6 , e quanto ao número de conídios formados *in vitro* , na Tabela 7 . Os dados originais e as análises estatísticas se encontram no Apêndice 3 .

TABELA 5 - Reação de três espécies gramíneas a um isolado de *H. sativum* de trigo passado quatro vezes em plantas de trigo, aveia e cevada.

Isolado	Número médio de lesões por folha/vaso (1)			(2)
	Trigo	Aveia	Cevada	Média
Iof	13,75	2,00	43,00	19,58 c
It	30,00	14,25	52,75	32,33 b
Ia	34,00	23,00	62,75	39,91 a
Ic	25,50	10,25	53,25	29,66 b
Média (2)	25,81 b	12,37 c	52,93 a	30,37

(1) Média de quatro repetições, cada repetição representada por um vaso contendo dez plantas, avaliando-se uma folha por planta.

(2) Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente ao nível de 1% (teste de Tukey).

Iof = isolado da cultura original (testemunha);

It = subcultura da cultura original passada em trigo;

Ia = subcultura da cultura original passada em aveia;

Ic = subcultura da cultura original passada em cevada.

C. V. = 14,26% .

A fim de que se pudesse comparar o efeito das passagens seriadas no número de lesões e esporulação *in vitro*, foi necessário



investigar a possível variação da cultura original (testemunha) para estes fatores, após conservação em solo estéril.

O efeito da manutenção da cultura original, durante oito meses em solo, sobre a produção de lesões é mostrado na Tabela 6, e sobre a esporulação na Tabela 7. Cabe ressaltar que foi necessário analisar esse efeito sobre o número de lesões separadamente, devido ao número de repetições diferente. Assim, os dados da Tabela 6 foram obtidos a partir das Tabelas 4 (concentração  $C_4$  - vide Apêndice 2) e 5 (repetições 1, 3 e 4 de Iof - vide Apêndice 3).

TABELA 6 - Reação de três espécies gramíneas a um isolado de *H. sativum*, conservado oito meses em solo estéril

Isolado	Número médio de lesões por folha/vaso (1)			Média (2)
	Trigo	Aveia	Cevada	
Ioi	9,00	4,33	50,66	21,33 a
Iof	13,66	1,33	40,66	18,55 a

(1) Média de três repetições.

(2) Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente ao nível de 1% (teste de Tukey).

Ioi = isolado da cultura original antes da conservação em solo estéril (20/05/75) ;

Iof = isolado da cultura original após a conservação em solo estéril (20/01/76) .

C. V. = 18,05% .

TABELA 7 - Efeito de passagens seriadas de um isolado de *H. sativum* na formação de conídios em BDA , em condições de escuridão contínua.

Isolado	Número de conídios ( $\times 10^4$ ) por placa nas repetições			Média	(1)
	1	2	3		
	Ioi	154	180		
Iof	150	135	148	144,33	d
It	348	366	360	358,00	a
Ia	225	222	230	225,66	c
Ic	267	330	310	302,33	b

(1) Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente ao nível de 1% (teste de Tukey).

Ioi = Isolado da cultura original antes da conservação em solo estéril (20/05/75);

Iof = isolado da cultura original após a conservação em solo estéril (20/01/76);

It = subcultura da cultura original passada em trigo;

Ia = subcultura da cultura original passada em aveia;

Ic = subcultura da cultura original passada em cevada.

C. V. = 6,62% .

A análise da variância revelou efeito significativo (ao nível de 1%) de hospedeiras e de isolados. A interação (hospedeira x isolado) não significativa indica que cada hospedeira, apesar da diferença significativa entre elas, reagiu igualmente a todos os isolados ; podendo-se assim ordenar as hospedeiras em ordem crescente de suscetibilidade - aveia , trigo , cevada. A aveia comportou-se como a mais resistente confirmando resultados do experimento anterior.

Após a quarta passagem, em qualquer uma das hospedeiras, os isolados produziram maior número de lesões e número de conídios em relação ao isolado da cultura original.

Como se pode ver pelas Tabelas 5 e 7 , os isolados diferiram significativamente, mas não na mesma ordem. Enquanto o isolado passado em aveia destacou-se para produção de lesões, o isolado passado em trigo destacou-se para esporulação.

A comparação do isolado original antes e após a conservação em solo (Tabelas 6 e 7) , na reação das três gramíneas e na esporulação *in vitro* , não revelou diferença significativa, ao nível de 1% .

Todos os isolados, após a última passagem, aos dez dias de idade, apresentavam características culturais semelhantes às do isolado original, isto é, colônia com coloração pardo escura, com micélio praticamente ausente e com diâmetro de, aproximadamente 8 cm.

Comparando-se a esporulação em farinha de trigo, em farinha de aveia e em farinha de cevada (experimento 5.1) com a esporulação em BDA do isolado 43 passado em trigo, em aveia e em cevada (experimento 5.3) , verificou-se que o valor da correlação linear ,  $r = 0,16$  com  $t = 0,43$  , não foi significativo.

## 6 - DISCUSSÃO

Segundo LILLY e BARNET (1951) não há um conjunto universal de condições externas que permitam a frutificação de todos os fungos. Luz, temperatura, aeração e umidade são fatores importantes na esporulação de muitos fungos (TUIITE, 1969).

Diante dos resultados do primeiro experimento verifica-se que a esporulação de *H. sativum* depende, além do regime luminoso, do meio de cultura empregado. TRIONE e LEACH (1969) demonstraram que a região de comprimento de onda azul é a maior e mais efetiva componente da luz branca capaz de inibir a esporulação de fungos fotossensíveis.

Na produção de inóculo é importante considerar a uniformidade e a manutenção da patogenicidade do mesmo (LUKENS, 1960), daí a necessidade de se estudar esses aspectos em um maior número de isolados, considerando-se, inclusive, a facilidade na obtenção do meio de cultura. Na maior parte dos trabalhos com esse fungo tem sido emprega-

do o BDA que, pelos resultados do terceiro experimento, parece não influir na qualidade do inóculo. Entretanto, em trabalhos de melhoramento para resistência são necessários meios mais práticos e econômicos nos quais, sem alterar a patogenicidade do inóculo, o fungo esporule abundantemente.

A concentração do inóculo, entre outros, é um dos mais importantes fatores na seleção de variedades para resistência à doenças. GARRET (1956) afirma que os fungos que parasitam raízes exigem maior quantidade de inóculo que outros patógenos. Pelos resultados do segundo experimento observa-se que, para uma mesma concentração, o índice de doença também está condicionado à metodologia de inoculação e à espécie hospedeira empregadas. De um modo geral, os resultados desse experimento estão de acordo com VAN DER PLANK (1975), em que a doença é proporcional à quantidade de inóculo. A aveia, que mostrou-se mais resistente no teste de inoculação em "seedlings", comportou-se como a mais suscetível no teste de inoculação em semente. Seria interessante avaliar-se também o peso seco dessas plantas, as quais apresentaram bastante diferença no ataque de raízes. A avaliação baseada no número de plantas sobreviventes e altura de plantas (inoculação em sementes), e no número de lesões em folhas (inoculação em "seedlings") é equivalente, uma vez que houve correlação altamente significativa entre essas variáveis.

Segundo TUIITE (1969) o objetivo de uma inoculação frequentemente determina a técnica a ser empregada. Os resultados do segundo experimento sugerem que a inoculação em "seedlings", conforme SILVA (1966) e outros, além de ser uma técnica mais simples, pode dar uma idéia do comportamento geral das variedades de trigo e cevada ao *H. sa-*

*tivum*. Apesar disso, carecemos de maiores informações a respeito da incidência desse fungo como causador de podridões de colo e raízes em gramíneas no Brasil.

Segundo VAN DER PLANK (1968) , patogenicidade inclui tanto agressividade como virulência e não há evidência alguma para uma correlação positiva entre elas, embora virulência aumentada possa ser acompanhada de agressividade diminuída. Raças virulentas são aquelas que apresentam interação diferencial com variedades do hospedeiro ; enquanto, raças agressivas não apresentam essa interação, apenas diferindo na quantidade de doença dentro das variedades. O mesmo autor, ainda afirma que raças com virulência desnecessária são menos abundantes e, portanto, presumivelmente devem ser julgadas como menos aptas a sobreviver. Os resultados obtidos por SCHEIFELE *et alii* (1968) com *Helminthosporium turcicum* confirmaram essas afirmações. Por outro lado, a tendência é de as raças com agressividade intermediária sobreviverem melhor que aquelas não agressivas ou extremamente agressivas (VAN DER PLANK, 1968).

Os resultados do experimento 5.3 , para número de lesões (Tabela 5) , indicam que as hospedeiras diferiram em resistência horizontal e o patógeno em agressividade, não havendo interação diferencial. Indicam também, que as espécies de gramíneas empregadas exerceram pressão de seleção sobre o isolado original na direção de agressividade do patógeno sobre o trigo, a aveia e a cevada. CASTRO *et alii* (1974) observaram que diferentes fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultura, podem selecionar culturas de *H. sativum* com diferentes caracteres morfológicos.

O efeito seletivo de quatro passagens seriadas, demonstrado no presente experimento (Tabela 5) aumentando a patogenicidade, pode ser explicado com base na dissociação de heterocarions a partir de um isolado provavelmente heterocariótico.

CHRISTENSEN e SCHNEIDER (1948), após cinco sucessivas gerações de um isolado de *H. sativum* em "seedlings" da variedade de trigo Marquis, não encontraram modificação na patogenicidade do fungo. Os autores empregaram uma linhagem derivada de muitos isolamentos monospóricos e que há 28 anos era cultivada em meios de cultura artificial; além disso, os testes de patogenicidade foram baseados na reação das plantas em solo infestado com o patógeno.

Embora o mecanismo de adaptação ainda não seja conhecido com segurança, há fortes evidências sobre sua ocorrência. Assim, não se pode afastar a hipótese que futuramente, dentro de certas condições, uma seleção direcional venha influir na população do patógeno favorecendo a prevalência de raças mais agressivas. Segundo HARDING (1972), *Helminthosporium victoriae* e *Helminthosporium maydis* têm demonstrado potencial de agressividade superior às outras espécies de *Helminthosporium*, porém o cultivo de variedades resistentes pode, por pressão de seleção, favorecer o surgimento de raças mais agressivas de *H. sativum*.

Seria interessante que maiores estudos fossem feitos com inoculação em outras variedades dessas espécies hospedeiras e em outros órgãos e/ou estágios de desenvolvimento das plantas; tendo em vista o que se verifica com *Phytophthora infestans* e *Bacterium stewartii* (GAUMANN, 1950), em que a agressividade pode ser aumentada ou reduzida,

respectivamente, quando os patógenos são passados em hospedeira suscetível.

O fato de a seleção para produção de lesões e produção de conídios não funcionar igualmente para a mesma hospedeira, indica que a pressão de seleção não é uniforme para todos os caracteres.

Portanto as alterações na agressividade são importantes, não somente no problema de epidemias como no de adaptação de tipos mais patogênicos.

Teoricamente é possível que raças mais agressivas produzam mais toxina ou sejam capazes de induzir maior produção de fitoalexinas; e nessa área maiores investigações são necessárias.

Os dados das Tabelas 6 e 7, indicam que o uso de solo estéril para conservação de *H. sativum* é um método, além de prático, eficiente para reduzir variações que frequentemente ocorrem na transferência e preservação de fungos, confirmando metodologia empregada por outros pesquisadores (FENNEL, 1960 ; JONES, 1974 ; SLEESMAN *et alii*, 1974).

Embora tenha-se utilizado isolados diferentes, a ausência de correlação entre a esporulação do fungo em meios de cultura com farinha de trigo, aveia e cevada, e a esporulação em BDA do isolado passado em plantas de trigo, aveia e cevada, demonstra que a pressão de seleção dos dois ambientes para produção de conídios, não funciona igualmente. Outras pesquisas poderão esclarecer se há correlação entre a esporulação no meio de cultura e a esporulação na lesão da planta hospedeira.



## 7 - CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- 7.1 - A esporulação de *Helminthosporium sativum* é inibida pela luz fluorescente (luz contínua no interior da Biotronete), independente do meio de cultura. O meio de cevada agar com superposição de papel de filtro, sob escuridão contínua, propicia abundante produção de conídios.
- 7.2 - Na seleção de variedades para resistência ao *H. sativum* deve-se levar em consideração: as condições (meio de cultura, regime luminoso) para produção do inóculo, a concentração do inóculo, a espécie hospedeira, o método de inoculação e o método de avaliação.

7.3 - A passagem de *H. sativum* sobre diferentes espécies hospedeiras induz uma seleção direcional, alterando a patogenicidade do fungo, que pode ser verificada tanto pelo teste de ordenamento como pela análise de variância.

8 - SUMMARY

The present research is concerned with the behavior of *Helminthosporium sativum* P. K. & B. *in vitro* and *in vivo*, with the objective of clarifying some aspects of inoculum production and the pathogenicity of one isolate, after four generations passing through three host species.

The author studied certain environmental factors that promote sporulation. The following conclusions are made: continuous illumination (fluorescent light), independent of the culture medium, inhibits conidial formation; among the culture media studied (PDA, wheat flour agar, oatmeal agar and barley meal agar) the best for inoculum production under continuous darkness, was barley meal agar.

Seeds and seedlings of wheat, oats and barley were inoculated with four concentrations of inoculum ( $1 \times 10^4$ ;  $5 \times 10^4$ ;  $2,5 \times 10^5$  and  $1,25 \times 10^6$  conidia per ml). It was concluded that generally the disease incidence increased with the quantity of inocu-

lum ( $1 \times 10^4$  ;  $5 \times 10^4$  ;  $2,5 \times 10^5$  and  $1,25 \times 10^6$  conidia per ml). It was concluded that generally the disease incidence increased with the quantity of inoculum. Nevertheless the decreasing order of resistance, for the hosts used, varied with the function of inoculation method.

One isolate of *H. sativum* was inoculated serially into seedlings of wheat, oat and barley in the greenhouse. After four serial inoculations, each host was inoculated with subcultures from other hosts.

Based on the number lesions and sporulation *in vitro*, the author concluded that any of the hosts could put selection pressure on the pathogen changing its pathogenicity.

9 - LITERATURA CITADA

- ANDERSEN, A. L., 1952. Development of wheat headblight incited by *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 42: 453-456.
- ARNY, D. C., 1951. Inheritance of resistance to spot blotch in barley seedlings. Phytopathology 41: 691-698.
- ASWORTH, L. J. , K. A. LAHR e R. J. COLLINS, 1960. Pathogenic specialization of *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 50: 627.
- BARNETT, H. L. e B. B. HUNTER, 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota. 241 p.
- BEAN, G. A. e R. D. WILCOXSON, 1964. *Helminthosporium* leaf spot of bluegrass. Phytopathology 54: 1065-1071.

- BROWN, A. R. e J. H. MILLER, 1954. A comparative study of *Helminthosporium sativum* P. K. & B. and *H. victoria* M. & M. on oats. Agron. Jour. 46: 63-67.
- BUXTON, E. W., 1960. Heterokaryosis, saltation and adaptation. In: Plant Pathology, 2, The Pathogen, Cap. 10, 359-405. (HORSFALL, J. G. e A. E. DIMOND, eds., New York, Academic Press).
- CASTRO, C., H. M. SILVA, W. S. P. PEREIRA e P. C. T. CARVALHO, 1974. Variabilidade de *Helminthosporium sativum* P. K. & B. sob pressão de seleção. In: Anais do V Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, p. 112-113.
- CHANG, HO-C., 1974. Light effects on the sporulation of some species of *Helminthosporium*. Bot. Bull. Academia Sinica 15: 44-48.
- CHRISTENSEN, J. J., 1925. Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 15: 785-796.
- CHRISTENSEN, J. J., 1926. Physiologic specialization and parasitism of *Helminthosporium sativum*. Technical Bull. 37: Univ. of Minn. Agric. Exp. Station. 101 p.
- CHRISTENSEN, J. J., 1929. The influence of temperature on the frequency of mutation in *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 19: 155-162.
- CHRISTENSEN, J. J. e F. R. DAVIES, 1937. Nature of variation in *Helminthosporium sativum*. Mycologia 29: 85-99.
- CHRISTENSEN, J. J. e C. L. SCHNEIDER, 1948. The effect of repeated passage of *Helminthosporium sativum* through the host on genetic variation and pathogenicity. Phytopathology 38: 5.

- CLARK, R. V. e J. G. DICKSON, 1958. The influence of temperature on disease development in barley infected by *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 48: 305-310.
- CLARK, R. V. e V. R. WALLEN, 1969. Seed infection of barley by *Cochliobolus sativus*, and its influence on yield. Can. Pl. Dis. Surv. 49: 60-64.
- DICKSON, J.G., 1956. Diseases of field crops. Mc Graw-Hill, New York, 517 p.
- DOSDALL, L. e J. J. CHRISTENSEN, 1923. Variations in the length of spores *Helminthosporium sativum* P.K. & B. under different conditions growth. Phytopathology 13: 50.
- ELLIOT, E. W., 1949. The effect of sugar concentration on conidial size of some species of *Helminthosporium*. Phytopathology 39: 953-58.
- FENNELL, D. I., 1960. Conservation of fungous cultures. Botanical Review 26: 79-141.
- GARRET, S. D., 1956. Biology of Root-Infecting Fungi. Cambridge Univ. Press, London and New York, 293 p.
- GARRET, S. D., 1963. A comparison of cellulose-decomposing ability in five fungi causing cereal foot rots. Trans. Brit. Mycol. Soc. 46: 572-576.
- GARRET, S. D., 1971. Effects of nitrogen level on survival of *Phialophora radicumicola* and *Cochliobolus sativus* in pure culture on cellulose. Trans. Brit. Mycol. Soc. 57: 121-128.
- GAUMANN, E., 1950. Principles of Plant Infection. Crosby Lockwood & Son, Ltd. London. 543 p.

- GAYED, S. K., 1962. The pathogenicity of six strains of *Helminthosporium sativum* to three cereals with special reference to barley. Mycopathol. et Mycol. Appl. XVIII: 271-279.
- HAMILTON, G. D. , R. V. CLARK , A. E. HANNAH e R. LOISELLE, 1960. Reaction of barley varieties and selection to root rot and seedling blight incited by *Helminthosporium sativum* P. K. & B. Can. J. Plant Sci. 40: 713-720.
- HARDING, H., 1971. Effect of *Bipolaris sorokiniana* permination and seedling survival of varieties or lines of 14 *Triticum spe* cies. Can. J. Bot. 49: 281-287.
- HARDING, H., 1972. Reaction to common root rot of 14 *Triticum spe* cies and the incidence of *Bipolaris sorokiniana* and *Fusarium spp.* in subcrown internode tissue. Can. J. Bot. 50: 1805-1810.
- HOSFORD, R. M. Jr. , G. R. M. SOLANGI e R. L. KIESLING, 1975. Inheritance in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology 65: 699-703 .
- HSI, C. H., 1955. Dryland root rot of 1953/54 winter wheat in eastern New Mexico. Pl. Dis. Repr. 38: 373-377.
- JOHNSON, E. C., 1914. A study of some imperfect fungi isolated from wheat, oat and barley plants. Jour. Agr. Research I: 475-490.
- JOHNSON, T. W. e J. E. HALPIN, 1952. Influence of light on the morphology and production of conidia in some species of Dematiaceae. Phytopathology 42: 342.
- JONES, J. P., 1974. Prolonged storage of *Helminthosporium victoriae* in soil. Phytopathology 64: 1158.



- KINSEY, J. G. e A. L. HOOKER, 1973. Changes in *Helminthosporium turcicum* populations following seried host passage. Plant. Dis. Reprtr. 57: 590-591.
- LILLY, V. G. e H. L. BARNETT, 1951. Physiology of the Fungi. Mc Graw-Hill, New York, 464 p.
- LUKENS, R. J., 1960. Conidial production from filter paper cultures of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. Phytopathology 50: 867-868.
- LUTTRELL, E. S., 1954. Approaches to the classification of *Helminthosporium* species. Pl. Dis. Reprtr. 228 (suppl.): 111-113.
- MACHACEK, J. E., 1943. An estimate of loss in Manitoba from common root rot in wheat. Sci. Agr. 24: 70-79.
- McKINNEY, H. H., 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. Jour. Agric. Res. XXVI: 195-217.
- MALONE, S. P., 1968. Mercury-resistant *Pirenophora avenae* in North Ireland seed oats. Plant Path. 17: 41-45.
- MERONUCK, R. A. e E. H. PEPPER, 1968. Chlamyospore formation in conidia of *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 58: 866.
- MORTON, O. J., 1962. Influence of temperature, humidity and inoculum concentration on development of *Helminthosporium sativum* and *Septoria passerinii* in exercised barley leaves. Phytopathology 52: 704-708.
- MUSE, R. R. , H. B. COUCH , L. O. MOORE e B. O. MUSE, 1972. Pectolytic and cellulolytic enzymes associated with *Helminthosporium* leaf spot on Kentucki bluegrass. Can. J. Microbiol. 18: 1091-1098.

- PON, O. S., 1952. A new light-colored race of *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 42: 472.
- ROBLES, L. H., 1949. The pathogenicity of species of *Helminthosporium* on corn. Phytopathology 39: 1020-1028.
- RANGASWAMI, G. e T. S. GOVINDARAJAN, 1961. Comparative study of parent and the variants of *Helminthosporium sativum* obtained by ultraviolet irradiation. Indian Jour. Microbiol. 1 (4): 163-168.
- ROBERT, A. L. e M. T. JENKINS, 1949. Variability in monoconidial and hyphal-tip isolates of *Helminthosporium turcicum*. Phytopathology 39: 504.
- ROTH, J. N. e J. F. SCHAFER, 1968. Response of barley seedling to some foliage organisms. Pl. Dis. Repr. 52: 215-217.
- SALLANS, B. J., 1933. Methods of inoculation of wheat with *Helminthosporium sativum* P. K. & B. Scientific Agriculture XIII: 515-527.
- SALLANS, B. J., 1948. Interrelation of common root rot and other factors with wheat yields in Saskatchewan. Sci. Agr. 28: 6-20.
- SALLANS, B. J. e R. O. TINLINE, 1965. Resistance in wheat to *Cochliobolus sativus*, a cause of common root rot. Can. J. Plant. Sci. 45: 343-351.
- SANFORD, G. B. e W. C. BROADFOOT, 1934. On the prevalence of pathogenic forms of *Helminthosporium sativum* and *Fusarium culmorum* in the soil of wheat fields and its relation to the root rot problem. Can. J. Research 10: 264-274.

SÃO PAULO, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1976. "Normas para a elaboração de Dissertação e Teses", Piracicaba, 24 p.

SAYAGO, M. A., 1973. Avaliação de Fungicidas no Controle da Ferrugem do Cafeeiro *Hemileia vastatrix* Berk & Br. Piracicaba, ESALQ/USP, 62 p. (Tese de Mestrado).

SCHEIFELE, G. L. , R. R. NELSON e C. C. WERNHAM, 1968. Studies on stabilizing selection in *Trichometasphaeria turcica* (*Helminthosporium turcicum*) . Pl. Dis. Repr. 52: 427-430.

SHERIDAN, J. E. , J. H. TICKLE e Y. S. CHIN, 1968. Resistance to mercury of *Pirenophora avenae* (conidial state *Helminthosporium avenae*) in New Zeland seed oats. N. Z. J. Agric. Res. 11: 601-606.

SILVA, A. R., 1966. Melhoramento da variedades de trigo às diferentes regiões do Brasil. Serviço de Informação Agrícola (SIA). Minist. Agricultura, Rio de Janeiro, 82 p.

SLEESMAN, J. P. , P. O. LARSEN e J. SAFFORD, 1974. Maintenance of stock cultures of *Helminthosporium maydis* (races T and O) . Pl. Dis. Repr. 58: 334-336.

TINLINE, R. D., 1982. *Cochliobolus sativus* . V. Heterokaryosis and parasexuality. Can. J. Bot. 40: 425-437.

TINLINE, R. D. e B. H. McNEILL, 1969. Parasexuality in Plant pathogenic fungi. Ann. Rev. Phytopathology 7: 147-170.

- TOCHINAI, Y. e T. UI, 1953. Studies on the *Helminthosporium* of cereals in Hokkaido 1. Influences of environmental conditions on foot-rot of the seedlings. Mem. Fac. Agric. Hokkaido 1 (2): 113-126.
- TRIONE, E. J. e C. M. LEACH, 1969. Light induced sporulation and sporogenic substances in fungi. Phytopathology 59: 1077-1083.
- TUITE, J., 1969. Plant pathological methods fungi and bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Company. 233 p.
- VAN DER PLANK, J. E., 1968. Disease Resistance in Plants. Academic Press, New York. 206 p.
- VAN DER PLANK, J. E., 1975. Principles of Plant Infection. Academic Press, New York. 216 p.
- VENDRIG, J. G., 1956. De levenscyclus var *Helminthosporium sativum* P. K. & B. op Tarwe en Gerst (The life-cycle of *Helminthosporium sativum* P. K. & B. on wheat and barley). Abs. in Tijdschr. Plziekt 62: 30.
- WALKER, J. C., 1965. Use of environmental factor in screening for disease resistance. In: Annual Review of Phytopathology 3: 197-208.
- WATSON, I. A., 1970. Changes in virulence and population shifts in plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 8: 209-230.
- WOOD, L. S., 1959. Genetic variation of *Helminthosporium sativum* in relation to seedling blight of small grains. Diss. Abstr. 20: 1136.

- WOOD, L. S., 1962. Relation of variation in *Helminthosporium sativum* to seedling blight of small grains. Phytopathology 52: 493-498.
- WOOD, L. S. , J. J. CHRISTENSEN e J. W. LAMBERT, 1954. *Helminthosporium sativum* becomes destrutive on hitherto resistant varieties of barley. Phytopathology 44: 511.
- YADAV, B. S., 1963. Effect of ultraviolet and visible radiation on the sporulation of species of *Helminthosporium*. Diss. Abstr. 24: 1786-1787.
- YORINORI, J. T. e H. D. THURSTON, 1971. Factors wich may affect general resistance in rice to *Pyricularia oryzae* Cav. In: Seminar on horizontal resistance to the blast disease of rice. Cali, Colômbia, 13 p.

10 - APÉNDICE

APÊNDICE 1

Dados originais, correspondentes aos resultados apresentados na Tabela 1 e sua análise estatística

Meio de Cultura	Repe- tição	Número de conídios ( $\times 10^4$ ) por placa sob	
		Luz contínua	Escuridão contínua
BDA	1	75	110
	2	67	120
	3	53	112
	4	59	111
Trigo	1	55	122
	2	65	135
	3	52	100
	4	70	110
Aveia	1	31	87
	2	48	84
	3	28	70
	4	38	86
Cevada	1	20	444
	2	18	350
	3	15	456
	4	16	420

Análise da Variância

Fonte de Variação	G. L.	Q. M.	F	
Repetições	3			
Tratamentos	7	65.128,80	167,87	**
Meios (M)	3	40.027,10	103,17	**
Regime luminoso (R)	1	152.213,80	392,33	**
Interação M x R	3	61.202,30	157,75	**
R dentro de M <sub>1</sub>	1	4.950,10	12,76	**
R dentro de M <sub>2</sub>	1	6.928,10	17,86	**
R dentro de M <sub>3</sub>	1	4.140,30	10,67	**
R dentro de M <sub>4</sub>	1	320.400,10	825,83	**
M dentro de R <sub>1</sub>	3	1.903,40	4,90	**
M dentro de R <sub>2</sub>	3	99.325,40	256,01	**
Resíduo	21	387,97		

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

DMS pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, para:

Regimes de luz dentro de meios = 39,48

Meios dentro de regimes de luz = 45,48

C. V. = 17,37%



APÊNDICE 2

Dados originais correspondentes aos resultados das Tabelas 2 e 3, e suas análises estatísticas.

Concen- tração	Repe- tição	Número de plantas sobre vivas por vaso			Altura das plantas (cm) por vaso		
		Trigo	Aveia	Cevada	Trigo	Aveia	Cevada
C <sub>0</sub>	1	10	10	10	26	16	15
	2	10	10	10	23	15	18
	3	10	10	10	24	18	17
C <sub>1</sub>	1	10	9	9	21	16	15
	2	10	9	10	23	17	17
	3	10	9	9	24	14	17
C <sub>2</sub>	1	10	9	9	22	14	13
	2	10	9	9	20	12	14
	3	10	9	8	23	15	15
C <sub>3</sub>	1	10	9	9	20	11	11
	2	10	9	9	21	8	13
	3	10	6	9	21	7	11
C <sub>4</sub>	1	10	6	7	20	8	7
	2	10	6	5	16	5	8
	3	10	6	2	17	6	7

Análise da Variância do número de plantas sobreviventes por vaso.

Fonte de Variação	G. L.	O. M.	F	
Repetições	2			
Tratamentos	14	7,70	12,03	**
Hospedeiras (H)	2	14,00	21,87	**
Concentrações (C)	4	12,50	19,53	**
Interação H x C	8	3,75	5,85	**
C dentro de H <sub>1</sub>	4	0,00	0,00	
C dentro de H <sub>2</sub>	4	6,75	10,55	**
C dentro de H <sub>3</sub>	4	13,50	21,09	**
H dentro de C <sub>0</sub>	2	0,00	0,00	
H dentro de C <sub>1</sub>	2	1,00	1,56	
H dentro de C <sub>2</sub>	2	1,50	2,34	
H dentro de C <sub>3</sub>	2	3,00	4,68	
H dentro de C <sub>4</sub>	2	23,00	35,93	**
Resíduo	28	0,64		

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

DMS pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, para:

Concentrações dentro de hospedeiras = 2,35

Hospedeiras dentro de concentrações = 2,07

C. V. = 8,97%

Análise da variância da altura das plantas por vaso

Fonte de Variação	G. L.	Q. M.	F	
Repetições	2			
Tratamentos	14	89,52	40,64	**
Hospedeiras (H)	2	385,63	174,49	**
Concentrações (C)	4	113,05	51,15	**
Interação H x C	8	4,26	1,92	
Resíduo	28	2,21		

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

DMS pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, para:

Concentrações = 2,51

Hospedeiras = 1,71

C. V. = 9,54%

Dados, reais e transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ , correspondentes aos resultados apresentados na Tabela 4, e sua análise estatística.

Concen- Tração	Repe- tição	Número médio de lesões por folha/vaso					
		Trigo		Aveia		Cevada	
		Reais	$\sqrt{x+0,5}$	Reais	$\sqrt{x+0,5}$	Reais	$\sqrt{x+0,5}$
C <sub>0</sub>	1	0,0	0,70	0,0	0,70	0,0	0,70
	2	0,0	0,70	0,0	0,70	0,0	0,70
	3	0,0	0,70	0,0	0,70	0,0	0,70
C <sub>1</sub>	1	0,0	0,70	0,1	0,77	0,2	0,83
	2	0,0	0,70	0,0	0,70	0,3	0,89
	3	0,1	0,77	0,0	0,70	0,1	0,77
C <sub>2</sub>	1	0,2	0,83	0,7	1,09	8,0	2,91
	2	0,3	0,89	0,6	1,04	10,0	3,24
	3	0,1	0,77	0,8	1,14	8,0	2,91
C <sub>3</sub>	1	5,0	2,34	2,0	1,58	20,0	4,52
	2	3,0	1,87	1,0	1,22	27,0	5,24
	3	7,0	2,73	2,0	1,58	24,0	4,94
C <sub>4</sub>	1	6,0	2,54	3,0	1,87	50,0	7,10
	2	11,0	3,39	5,0	2,34	59,0	7,71
	3	10,0	3,24	5,0	2,34	43,0	6,59

Análise da Variância

Fonte de Variação	G. L.	Q. M.	F	
Repetições	2			
Tratamentos	14	10,5493	160,56	**
Hospedeiras (H)	2	19,1150	290,94	**
Concentrações (C)	4	19,4850	296,57	**
Interação H x C	8	3,9387	59,94	**
C dentro de H <sub>1</sub>	4	3,5803	54,49	**
C dentro de H <sub>2</sub>	4	1,1392	17,34	**
C dentro de H <sub>3</sub>	4	22,6442	344,66	**
H dentro de C <sub>0</sub>	2	0,0000	0,00	
H dentro de C <sub>1</sub>	2	0,0113	0,17	
H dentro de C <sub>2</sub>	2	4,2943	65,36	**
H dentro de C <sub>3</sub>	2	9,6263	146,52	**
H dentro de C <sub>4</sub>	2	20,9422	318,75	**
Resíduo	28	0,0657		

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

DMS pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, para:

Concentrações dentro de hospedeiras = 0,75

Hospedeiras dentro de concentrações = 0,66

C. V. = 12,66%

APENDICE 3

Dados originais, correspondentes aos resultados da Tabela 5 e sua análise estatística.

Isolado	Repetição	Número médio de lesões por folha/vaso		
		Trigo	Aveia	Cevada
Iof	1	16	2	45
	2	14	4	32
	3	12	1	46
	4	13	1	49
It	1	36	10	53
	2	26	15	40
	3	30	18	60
	4	28	14	58
Ia	1	38	21	68
	2	34	22	57
	3	28	26	64
	4	36	23	62
Ic	1	29	12	59
	2	20	8	55
	3	23	11	48
	4	30	10	51

Análise da Variância

Fonte de Variação	G. L.	Q. M.	F	
Repetições	3			
Tratamentos	11	1.479,79	79,96	**
Hospedeiras (H)	2	6.831,06	364,51	**
Isolados (I)	3	847,36	45,21	**
Interação H x I	6	12,25	0,65	
Resíduo	33	18,74		

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

DMS pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, para:

Hospedeiras = 5,50

Isolados = 5,16

C. V. = 14,26%

Análise da variância do número de lesões por folha/vaso, correspondente aos resultados da Tabela 6 .

Fonte de Variação	G. L.	Q. M.	F
Repetições	2		
Tratamentos	5	1.440,60	100,69 **
Hospedeiras (H)	2	3.566,50	249,40 **
Isolados (I)	1	2,00	0,14
Interação H x I	2	34,00	2,38
Resíduo	10	14,30	

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

DMS pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, para

Isolados = 6,87

C. V. = 18,05%

Análise da variância do número de confídios por placa, correspondente aos resultados da Tabela 7.

Fonte de Variação	G. L.	Q. M.	F
Repetições	2		
Isolados	4	24.777,50	99,06 **
Resíduo	8	250,12	

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

DMS pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, para

Isolados = 27,0

C. V. = 6,62%