

CARLOS A. ZAMBRANO PÉREZ

Engenheiro Agrônomo

Universidad Centro Occidental

Barquisimeto - Venezuela

**EFEITO DE LUZ E NUTRIÇÃO NA REPRODUÇÃO DE *Mycosphaerella*
melonis (PASS.) CHIU & WALKER**

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de "Mestre" (Magister Scientiae)

P I R A C I C A B A
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

1 9 7 2

A

meus pais,

espôsa

e

filhas,

dedico

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos:

À Universidade Centro Occidental (Barquisimeto - Venezuela), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Departamento de Fitopatologia os quais tornaram possível a participação no Curso de Pós-Graduação e a materialização desta pesquisa.

Ao Professor Dr. HIROSHI KIMATI pela valiosa colaboração como orientador deste trabalho e pela revisão dos originais.

Ao Professor Dr. FERDINANDO GALLI, Diretor da ESALQ, pelas atenções e estímulo no transcorrer do Curso de Pós-Graduação de Fitopatologia.

Ao Professor Dr. DECIO BARBIN do Departamento de Matemática e Estatística.

Aos Professores Dr. HASIME TOKESHI, Dr. CAIO O. N. CARDOSO e Dr^a. ELKE J.B. NOGUEIRA CARDOSO pela prestimosa colaboração na revisão dos originais e sugestões.

Ao Professor Dr. GILBERTO CASADEI DE BATISTA pela prestimosa colaboração.

Ao Engenheiro Agrônomo ROSA MARIA G. CARDOSO, do Instituto Biológico e Engenheiro Agrônomo, M.S., YODIRO MASUDA da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, pelos isolados de M. melonis que me puseram à disposição.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação de Fitopatologia.

Ao WALTER S.P. PEREIRA, estagiário do Departamento de Fitopatologia, pela imprescindível ajuda.

Aos funcionários da Biblioteca Central da ESALQ.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. Local e época da investigação	8
3.2. Isolados de <u>M. melonis</u>	8
3.3. Produção de inóculo	8
3.3.1. Meios de cultura para produção de inóculo	8
3.3.2. Métodos para produção de inóculo	10
3.4. Método de avaliação	10
3.5. Ensaios	11
3.5.1. Efeito da luz branca na esporulação de 10 iso- lados de <u>M. melonis</u>	11
3.5.2. Efeito da luz U.V.-curta na esporulação de 10 isolados de <u>M. melonis</u>	11
3.5.3. Influência das fontes de nitrogênio na esporu- lação de <u>M. melonis</u>	11
3.5.3.1. Fontes de nitrogênio	12
3.5.3.2. Método de plaqueamento e incubação	12
3.5.4. Influência da relação C/N na reprodução de <u>M.</u> <u>melonis</u>	12
3.5.5. Comportamento dos isolados 1, 136 e 557 em di- ferentes meios de cultura	13
3.5.6. Teste de inoculação cruzada	13
3.5.6.1. Condições da casa de vegetação	13
3.5.6.2. Espécies de cucurbitáceas	14

3.5.6.3. Isolados testados	14
3.5.6.4. Testes de patogenicidade	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Efeito da luz branca na esporulação de 10 isolados de <u>M. melonis</u>	15
4.2. Efeito da luz U.V.-curta na esporulação de 10 isolados de <u>M. melonis</u>	15
4.3. Influência das fontes de nitrogênio na esporulação de <u>M. melonis</u>	17
4.4. Influência da relação C/N, na reprodução de <u>M. melonis</u>	21
4.4.1. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de <u>M. melonis</u> , na luz branca	21
4.4.2. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de <u>M. melonis</u> na escuridão	23
4.4.3. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/Caseína, na reprodução de <u>M. melonis</u> , na luz branca	29
4.4.4. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/Caseína, na reprodução de <u>M. melonis</u> , na escuridão	32
4.5. Comportamento dos isolados 1, 136 e 557 em diferentes meios de cultura	39
4.6. Testes de patogenicidade	42
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	49
7. RESUMO	51
8. SUMMARY	53
9. BIBLIOGRAFIA CITADA	55

LISTA DOS QUADROS

	Pág.
1. Isolados de <u>Mycosphaerella melonis</u>	9
2. Efeito da luz branca na esporulação de 10 isolados de <u>M. melonis</u>	15
3. Efeito da luz ultravioleta-curta na esporulação de 10 isolados de <u>M. melonis</u>	16
4. Influência das fontes de nitrogênio na esporulação de <u>M. melonis</u> , na luz branca	18
5. Influência das fontes de nitrogênio na esporulação de <u>M. melonis</u> , na escuridão	19
6. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de <u>M. melonis</u> , na luz branca	22
7. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de <u>M. melonis</u> na luz	23
8. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de <u>M. melonis</u> , na escuridão	25
9. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de <u>M. melonis</u> , na escuridão	26
10. Análise da variância para os efeitos das doses de nitrogênio dentro das doses de carbono	27
11. Médias das doses de nitrogênio dentro das doses de carbono	27
12. Análise da variância para os efeitos das doses de carbono dentro das doses de nitrogênio	28
13. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de <u>M. melonis</u> , na luz branca	31
14. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de <u>M. melonis</u> , na luz branca	32
15. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de <u>M. melonis</u> na escuridão	33

	Pág.
16. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de <u>M. melonis</u> , na escuridão	35
17. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de <u>M. melonis</u> , na escuridão	36
18. Análise da variância para os efeitos das doses de nitrogênio dentro das doses de carbono	37
19. Médias das doses de nitrogênio dentro de carbono	37
20. Análise da variância para os efeitos das doses de carbono dentro das doses de nitrogênio	38
21. Médias das doses de carbono dentro das doses de nitrogênio	38
22. Comportamento dos isolados 1, 136, 557 em diferentes meios de cultura e na luz	40
23. Comportamento dos isolados 1, 136 e 557 em diferentes meios de cultura e na escuridão	41
24. Teste de patogenicidade dos isolados 136, 1, 557, 582 e 140, de <u>M. melonis</u>	42

1. INTRODUÇÃO

As cucurbitáceas constituem um alimento de grande importância nas áreas tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. No Brasil, essa importância fica evidente quando se considera que, só as culturas de melão e melancia, tiveram, em 1969, uma receita de Cr\$ 46.649.715, Cr\$.. 18.991.234 mais do que a de 1967 (2). Nesse contexto econômico entra o fungo Mycosphaerella melonis, agente da Podridão Gomosa do caule, pois é considerado um dos principais problemas, principalmente em melancia, melão e abóbora (14,17).

Apesar dessa manifesta importância, são poucos os trabalhos nacionais e mesmo na literatura mundial, havendo lacunas a serem preenchidas.

Uma dessas lacunas é o estudo de fatores que influem na reprodução de Mycosphaerella. Trabalhos desse tipo têm grande interesse pois servem de base, por exemplo, para estudos que dependem de inóculo padronizado.

O problema da esporulação em M. melonis foi abordado em diferentes épocas mas sob diferentes pontos de vista e usando-se diferentes isolados. O presente trabalho visa obter uma melhor compreensão do efeito dos fatores luz e nutrição na esporulação de diferentes isolados desse fungo e verificar a patogenicidade dos isolados em várias espécies de cucurbitáceas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Podridão de micosferela, constatada pela primeira vez na França, em 1891, tem sido reconhecida em numerosas regiões do mundo, afetando grande número de Cucurbitáceas: pepino (Cucumis sativus L.), melão (Cucumis melo L.), melancia (Citrullus vulgaris L.), abóbora (Cucurbita spp.), chuchu (Sechium edule L.), melão de São Caetano (Momordica charantia L.), bucha (Luffa cylindrica L.) e maxixe (Cucumis anguria L.) (5, 16, 37). Segundo CHUPP e SHERF (7) o espectro de hospedeiro se estenderia, possivelmente a outras espécies das Cucurbitáceas.

No Brasil, constatada pela primeira vez em 1954, em melão cantaloupe proveniente de Campinas, tem-se tornado problema notoriamente importante nessa e em culturas de melancia e abóbora (13, 14, 17).

O fungo causador dessa doença foi descrito, pela primeira vez, em 1891, na sua fase imperfeita, recebendo o nome de Ascochyta cucumis Fautr. e Roum (5, 44). Foi entretanto, denominado sucessivamente, ainda na sua fase imperfeita, de: Phyllosticta citrullina Chester, Ascochyta citrullina (Chester) C.O.Sm., Diplodina citrullina (C. O. Sm.) Gross e Ascochyta melonis Poteb. (5).

CHIU e WALKER (5), considerando que a extrema variabilidade do estágio imperfeito do fungo, em tamanho de picnídio e em tamanho e septação de conídios, era a causa de tantos nomes, aceitou implicitamente a identidade de todos êles, dando prioridade a Fautrey e Roumeguère.

A fase sexual foi descrita pela primeira vez em 1891 como Didymella melonis Pass. e, posteriormente, como Sphaerella citrullina (Chester) C.O.Sm., Mycosphaerella citrullina (C.O.Sm.) Gross e Sphaerella

melonis Ferraris (5). CHIU e WALKER (5), fazendo revisão taxonômica da espécie, dão prioridade a Passerini, mas denomina-a, erradamente, de Mycosphaerella cucumis (Fautr e Roum) CHIU e WALKER. No mesmo ano CHIU e WALKER (6) corrigem o erro, sem comentários, denominando-a de Mycosphaerella melonis (Pass.) CHIU e WALKER. Essa nomenclatura é usada por pesquisadores como RANKIN (32), EPPS (12), FIGUEIREDO et al. (13, 14, 15), FLETCHER e PREECE (16), SITTERLY (38), BROWN e PREECE (3). No entanto, talvez porque a prioridade, dada por CHIU e WALKER (5) a Passerini, fôsse baseada na suposição da observação de ascas abortadas por paráfises, outros pesquisadores (9, 34, 35, 36), preferem a binominal Mycosphaerella citrullina (C.O. Sm.) Gross. Um terceiro grupo (10, 31, 40) segue a última nomenclatura mas acompanhada entre parênteses pela de Chiu e Walker. Essa indecisão é flagrante no trabalho de Moore e Moore, que defendem como correta a nomenclatura de Chiu e Walker (16) mas traz por título: "Stem rot of melon (Mycosphaerella citrullina)".

O estudo da variabilidade de esporulação em M. melonis foi iniciado por WIAINT (44) que, cultivando isolados de diferentes cucurbitáceas em BDA, de 21,1 a 23,8 C, observou que alguns, ocasionalmente, esporulam abundantemente e muitos pobremente. Tentativas foram então feitas pelo mesmo autor no sentido de melhorar a esporulação, utilizando outros meios de cultura (fubá-agar, farinha de aveia-agar, vagem e casca de pepino esterilizado e hastes esterilizadas de diferentes cucurbitáceas) e o efeito de fermentos da cultura em BDA e longos períodos de escuridão, sem, contudo, conseguir bons resultados. Observou ainda, que 2 isolados do total de 100 a 200, depois de permanecerem quase completamente estéreis por algum tempo, desenvolveram, repentinamente, setores abundantemente esporulantes. Repicagens desses setores continuaram a produzir abundante número de esporos.

O aparecimento de tais setores é, segundo Wiant, favorecido pelo secamento da cultura. Essa sugestão decorre do fato de ter êle conseguido em BDA, setores esporulantes em 44 dos 108 isolados não esporulantes de pepino, conservados por 7 a 8 meses em tubos com BDA.

CHIU e WALKER (5) trabalhando com apenas um isolado de M.melonis, isolado de caule de melancia da variedade Hawkerbury, encontrou que o tipo selvagem As (abundantes picnídios, peritécios e pseudoperitécios de cor marrom a preto) foi extremamente variável, mutando espontaneamente para A (geralmente estéril, com micélio branco idêntico a As), A-1 (micélio branco aereo e submerso; desenvolvimento lento, idêntico a As), B-a (micélio escasso, picnídios numerosos e pequenos, aparecendo mais tarde peritécios e pseudoperitécios de cor preta), B-la (inicialmente micélio esparso com picnídios numerosos e grandes posteriormente, peritécios e pseudoperitécios são encontrados distribuídos ao acaso na cultura) e B-lb (idêntico a B-la, só que nos primeiros estádios de desenvolvimento os corpos de frutificação são mais claros). Os autores observaram que o mutante A tende a mutar para As; enquanto que A-1, B-a e B-la são muito estáveis, e sugeriram que B-lb era, aparentemente, um variante de B-la. Determinaram ainda que a esporulação do tipo A pode ser induzida por nutrição. Assim, obtiveram abundante esporulação em meio de aveia-agar, quando se-lhe adicionou dextrose, mas foi impedida quando se-lhe adicionou peptona. A adição de peptona e dextrose juntos não inibiram a esporulação. Concluíram que é possível que certos nutrientes ou fatores de desenvolvimento no meio capacitem o mutante A a ser tão fértil como o tipo selvagem As. Entretanto, quando os meios acima foram usados para culturas de outros isolados estéreis (A-1, A-2 e B-3) os últimos obtidos por irradiação, a esporulação não foi observada. Todos os tratamentos foram sempre incubados a 24 C.

CHIU e WALKER (5) foram também os primeiros a estudar os

efeitos da luz, em M. melonis. Em sua pesquisa usaram isolados não esporulantes do tipo A, com 7 dias de idade, cultivados em meio de BDA. Foram usados para os tratamentos lâmpadas de mercúrio-quartzo (Westinghouse Steri-lamp) e intervalos de 1/2, 1, 5, 10, 20, 30 e 40 minutos de exposição à luz; após irradiação, as culturas em caixas de Petri foram incubadas no escuro a 24 C. Resultados obtidos, aos 4 ou 5 dias, indicaram que exposições de 15 a 20 minutos foram os melhores tempos para estimular a esporulação.

SOWELL e POINTER (40) obtiveram, para teste de resistência varietal de melancia, abundante esporulação do isolado CS-1 de M. melonis, originário de pés de melão afetados. Para isso o fungo foi cultivado em meio de vagem, sob luz fluorescente à temperatura de 20 a 30 C.

CURREN (9) relata que um isolado de origem multiconidial obtido de abóbora, quando mantido sob luz constante, desenvolveu picnídios e abundante produção de conídios. Usou como substrato BDA, e como fonte de luz 4 lâmpadas fluorescentes, as quais forneciam uma intensidade luminosa de aproximadamente 92 ft-c sobre as caixas de petri.

CURREN (10) trabalhando com dois isolados de M. melonis, um de frutos de abóbora e outro de pepino, encontrou abundante esporulação de ambos. Usou para sua pesquisa diferentes meios de cultura e os tratamentos foram colocados tanto na luz e na escuridão. A fonte luminosa consistiu em duas lâmpadas fluorescentes (Sylvania "life line" F40-CW) suspensas a 64 cms acima da cultura e com intensidade aproximadamente de 180 ft-c. A temperatura de incubação foi de aproximadamente 25 C. Nos meios de BDA, V-8 juice e meio de peptona ("Phytone": Baltimore Biological Laboratory), os fungos apresentaram boa esporulação; entretanto, em meios com KNO₃, ácido-DL-aspártico e caseína, como fontes nitrogenadas, só se desenvolveu bem a fase

fungo. Notou também diferenças entre as caixas de plástico e vidro, com maior esporulação de M. melonis nas primeiras. É interessante notar que usei sempre micélio como inóculo.

ZAMBRANO et al (45), submetendo um único isolado de M. melonis, originário de melancia, a vários tratamentos, observaram que: 1) a luz dentro da faixa visível do espectro não teve efeito positivo no crescimento e reprodução de M. melonis; 2) o efeito da irradiação com luz ultravioleta curta de 254nm, dependeu do meio de cultura usado e da forma de inoculação; 3) em geral, em meio de melancia houve uma maior formação de estruturas reprodutivas que em meio de BDA; 4) a inoculação com suspensão de conídios foi mais efetiva do que a de discos com micélio; 5) a irradiação estimula uma maior formação de estruturas sexuais, em meio de melancia, ao se inocular conídios; por outro lado, inoculando discos com micélio aumenta a formação de estruturas assexuais.

Além desses trabalhos nada mais se encontra, na literatura consultada, sobre os fatores que influem na esporulação de M. melonis. Entretanto, quando se consideram outros fungos, sabe-se que existem muitos outros fatores, como fontes de nitrogênio e relação C/N, que deverão ser favoráveis para que se manifeste a competência genética de esporulação em fungos (21). Além disso, segundo HAWKER (20), o efeito de fatores nutricionais é muito importante e muito variável com diferentes espécies e diferentes tipos de esporo.

Os primeiros estudos sobre patogenicidade foram feitos por GROSSENBACHER (18), usando como técnica de inoculação ferimentos no caule das plantas de melão (Cucumis melo L.). O autor inoculou outras cucurbitáceas, verificando que nenhuma era suscetível.

CHIU e WALKER (6) relataram que conídios, ascósporos e micélio de M. melonis de isolados originários de melancia, foram igualmente

infectivos sobre cotilédones e folhas jovens de melão e melancia. Folhas de pepino e abóbora foram muito resistentes a qualquer tipo de inóculo usado. Sintomas no hipocótilo e no caule de todas as cucurbitáceas testadas só ocorriam quando havia ferimentos, áreas fracas ou extensão das lesões dos cotilédones. Pepino e abóbora foram muito resistentes à formação de lesões no hipocótilo, quando jovens, porém ambos tornam-se muito suscetíveis, quando velhos.

Resistência a M. melonis em melancia não era conhecida até 1962 quando, então, SOWELL e POINTER (40), trabalhando com 439 introduções de melancia e o isolado CS-1, de melão, mostraram que P.I.189225 apresentava resistência. Neste trabalho os autores procuraram padronizar nos ensaios finais o potencial de inóculo para 1 a 5×10^5 conídios/ml. O método de inoculação foi o de pulverização da suspensão de esporos em plantas no estágio de "seedling".

No Brasil, FIGUEIREDO e CARDOSO (13), trabalhando com diferentes espécies de cucurbitáceas e empregando o método de inoculação de micélio, sobre ferimentos no caule, confirmam a alta patogenicidade do fungo M. melonis, isolado de melancia. FIGUEIREDO et al (14) relatam que no Brasil não se tem exata noção do grau de suscetibilidade das diferentes cucurbitáceas ao ataque do fungo M. melonis.

SOWELL et al (41), testando a resistência de introduções de Cucumis melo, cita que foi usado, inicialmente, o isolamento CS-1 e, posteriormente, o 464-8, este mais virulento que aquele, mas ambos originários de pés de melão. Neste trabalho chegaram à conclusão que P.I. 140472 mostrou o mais alto nível de resistência, próximo à imunidade em condições de campo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local e época da investigação

O trabalho aqui apresentado 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, Piracicaba, entre março e dezembro de 1971.

3.2. Isolados de M. melonis

As culturas de M. melonis utilizadas neste trabalho apresentaram-se no Quadro 1.

3.3. Produção de inóculo

3.3.1. Meios de cultura para produção do inóculo

Tanto micélio como conídios foram produzidos em caixas de petri contendo um dos seguintes meios de cultura: 1) V-8 juice, producto da Cambell Soup. Co., (43); 2) BDA tomado de Sourcebook of Lab. Exc. Pl.Pathol. (23); 3) Czapek (23). Os meios V-8 juice e BDA tinham o pH ajustado aproximadamente de 5,5 a 6,0, antes de autoclavagem; o meio de Czapek, ficou com pH 7. Os três meios foram usados por CURREN (10).

Quadro 1. Isolados de Mycosphaerella melonis

Número do isolado	Espécie de cultura	Lugar da colheita	Procedência
136	Pepino (<u>Cucumis sativus</u> L.)	Faz.Lageado Botucatu	Fac.de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.
140	Melão (<u>Cucumis melo</u> L.)	Vera Cruz	Fac.de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.
192	Melancia (<u>Citrullus vulgaris</u> L.)	Faz.São Manoel	Fac.de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.
557	Abóbora (<u>Cucurbita</u> sp.)	Jurucê	Inst. Biológico
582	Chuchu (<u>Sechium edule</u> L.)	Inst. Biol.	Inst. Biológico
409	Melancia (<u>Citrullus vulgaris</u> L.)	Inst. Biol.	Inst. Biológico
431	Melão (<u>Cucumis melo</u> L.)	Inst. Biol.	Inst. Biológico
630	Melão (<u>Cucumis melo</u> L.)	Inst. Biol.	Inst. Biológico
1	Melancia (<u>Citrullus vulgaris</u> L.)	Tupã	Deptº.de Fitopatologia da ESAIQ-Piracicaba.
2	Pepino (<u>Cucumis sativus</u> L.)	Mogi das Cruzes	Deptº.de Fitopatologia da ESAIQ-Piracicaba.

3.3.2. Métodos para produção do inóculo

Para a produção do inóculo foram usados os isolados e meios descritos nos itens 3.2. e 3.3.1. respectivamente. Foram utilizados dois métodos na produção do inóculo. Quando se trabalhou com micélio, empregou-se o método de LEACH (25), usado para Ascochyta pisi Lib. Neste caso se transferiu uma pequena porção da extremidade da colônia do fungo obtida no escuro. Entretanto, quando se trabalhou com conídios, usou-se o método de CURREN (10), usado para Mycosphaerella melonis (Pass.) Chiu e Walker, mas com modificação: em vez de as caixas de Petri contendo discos com micélio serem colocadas diretamente na luz (aproximadamente a 180 ft-c), permaneceram previamente por 24 a 48 horas em escuridão de 24 a 26 C e, após esse período, foram submetidas por um período de 7 a 10 dias, dentro de uma Biotronette Mark III, a uma intensidade luminosa de 150 a 300 ft-c (medidas com luxímetro Dr. B. Lange, Belzlim), fornecida por uma fonte luminosa de quatro tubos de luz fluorescente branca de 40 watts (General Electric - luz do dia - F40-LD). A temperatura foi controlada entre 25 e 27 C, a umidade dentro da câmara foi de 60%; usaram-se caixas de Petri Pyrex (Corning-3160), pois segundo LEACH (25), transmitem bem a luz ultravioleta-curta.

3.4. Método de avaliação

Os tratamentos dos diferentes ensaios, sempre com três repetições, foram colocados na Biotronette Mark III ao acaso (onde a intensidade da luz varia entre 150 a 300 ft-c) e na estufa. Os ensaios sobre luz foram examinados com 7 a 15 dias e os colocados na escuridão (estufa) examinados com 15 a 25 dias. Examinaram-se 10 campos por caixa de petri, ao microscópio estereoscópico (75 aumentos), fazendo-se a contagem.

3.5. Ensaios

3.5.1. Efeito da luz branca na esporulação de 10 isolados de M.melonis

Para êste ensaio foram utilizados os meios de cultura de BDA, V-8 juice e Czapek, descritos em 3.3.1. e os isolados do Quadro 1.

O método de plaqueamento empregado foi o de transferencia de micélio jovem, da periferia das caixas de Petri, sôbre os meios de cultura. Após vários testes preliminares de luz e temperatura, as caixas foram colocadas entre 150 a 300 ft-c, com temperaturas de 25 a 27 C. A incubação foi feita como já foi descrito no ítem 3.3.2., as caixas foram colocadas na escuridão por 24 a 48 horas e logo passadas a Biotronette Mark III, onde ficaram por 7 a 10 dias. Os tratamentos colocados na escuridão, ficaram 10 a 20 dias na estufa com temperaturas entre 24 e 26 C. No Quadro 2 são apresentados os tratamentos.

3.5.2. Efeito da luz ultravioleta-curta na esporulação de 10 isolados de M. melonis.

Os materiais e métodos deste ensaio foram idênticos aos do anterior, com exceção do tipo de lâmpada e tempo de exposição. Usou-se uma lâmpada germicida tipo "A" da General Electric, de 254 nm e com uma intensidade calculada de 272 micro-watts/cm², quando a lâmpada foi colocada a 25 cms de altura das caixas de petri; os tempos de exposição usados foram de 30, 60, 90, 120 e 180 segundos. A incubação foi feita em estufa a 26 C, durante 15 dias (Quadro 3).

3.5.3. Influência das fontes de nitrogênio na esporulação de M.melonis

As técnicas empregadas para produção do inóculo foram as mesmas do ítem 3.3.2. No ensaio usou-se o isolado 1 de melancia, usado por ZAMBRANO et al (45).

3.5.3.1. Fontes de nitrogênio

Sete fontes de nitrogênio, em seis diferentes níveis de concentração, perfazendo um total de 42 tratamentos (Quadros 4 e 5), foram adicionados a um meio basal constituído de: dextrose, 10,0 g; KH_2PO_4 , 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g; agar, 20,0 g; água, qsp 1.000 ml. Dextrose foi adicionada baseando em CHIU e WALKER (5) e CURREN (10); os demais componentes em LILLY e BARNETT (28), exceto que vitaminas e micronutrientes não foram adicionados pressupondo-se que agar comum os fornece. O pH dos 42 tratamentos foi de 5,5 a 6,0, antes de colocar o agar e da autoclavagem.

3.5.3.2. Método de plaqueamento e incubação

Conídios, produzidos conforme 3.3., com idade de 7 a 10 dias, foram suspensos em água esteril e plaqueados nos meios, preparados conforme 3.5.3.1., na quantidade de 1 ml/placa. O plaqueamento foi feito sobre discos de papel de filtro Whatman nº 1, superposto na superfície dos meios agarizados. Esta técnica foi empregada por JENKINS (22), que apresenta as vantagens do papel filtro na visualização e contagens de estrutura reprodutivas. Em ensaios preliminares notamos que o uso do papel de filtro permitia uma distribuição uniforme dos picnídios e peritécios, o que facilitava a contagem. A incubação foi feita conforme 3.3.2. Os tratamentos submetidos a escuridão, ficaram na estufa durante 10 a 20 dias, a temperatura entre 24 e 26 C.

3.5.4. Influência da relação C/N na reprodução de M. melonis

Os materiais e métodos empregados neste ensaio foram idênticos ao item 3.5.3., com exceção dos níveis e fontes de nitrogênio e carbono usados. Foram combinados 4 níveis de nitrogênio inorgânico (NaNO_3) (Quadros 6 e 8) e 4 de orgânico (caseína) (Quadros 13 e 15) com 3 níveis de dextrose.

Os ensaios foram colocados na luz e na escuridão, dando-nos 12 tratamentos por ensaio.

A análise estatística foi feita segundo o modelo de experimento inteiramente casualizado, com os dados transformados em \sqrt{X} segundo o recomendado por SNEDECOR (39). Para as comparações de médias foi aplicado o teste de Tukey, segundo PIMENTEL GOMES (30).

3.5.5. Comportamento dos isolados 1, 136 e 557 em diferentes meios de cultura

As técnicas empregadas, tais como, meios de cultura, preparo da suspensão, método de plaqueamento e incubação, foram os mesmos usados nos experimentos anteriores, com exceção dos meios que levam NaNO_3 e caseína, os quais foram escolhidos das melhores relações C/N, obtidas nos ensaios descritos em 3.5.4., após a análise estatística. Resultados nos Quadros 22 e 23.

3.5.6. Teste de inoculação cruzada

3.5.6.1. Condições da casa de vegetação

Os testes de inoculação cruzada foram efetuados em estufa sob condições controladas de temperatura e umidade; as temperaturas foram registradas diariamente, procurou-se controlar uma máxima de 27 a 30 C e uma mínima de 19 a 23 C, de acordo com o recomendado por vários autores (31, 40).

A semeadura foi efetuada em vasos de barro com as seguintes dimensões: 15 cms. de diâmetro na boca, 10 cms. na base e 12 cms. de altura. De cada vaso foram selecionadas 5 plantas de um total de 10, para serem inoculadas quando as plantas apresentassem as duas primeiras folhas verdadeiras. Foram feitas 3 repetições por tratamento (Quadro 24).

3.5.6.2. Espécies de cucurbitáceas

As espécies de cucurbitáceas utilizadas nos ensaios foram: melancia das variedades Fairfax, Flórida gigante; melão da variedade Casca de carvalho; pepino das variedades Marketer I-2205, Verde paulistano, Aodai; abóbora das variedades Menina e Caserta e; maxixe liso e espinhudo.

3.5.6.3. Isolados testados

Os isolados usados nos ensaios foram: 1 de melancia, 140 de melão, 136 de pepino, 557 de abóbora e 582 de chuchu.

3.5.6.4. Teste de patogenicidade

O inóculo foi produzido nos meios descritos em 3.3. O método de inoculação empregado foi o de pulverização de uma suspensão de conídios sobre as folhas das plantas, quando estas tinham formado as duas primeiras folhas verdadeiras. Ensaio preliminar de inoculação em pepino e abóbora nos cotiledones não deram reação de doença. O inóculo foi preparado segundo BARNE e EPPS (1), e conforme a SOWELL e POINTER (40), e SOWELL et al (41). A idade das culturas foi sempre de 7 a 10 dias.

Após a inoculação, as plantas foram incubadas durante 48 horas em câmara úmida, de acordo com o recomendado por SOWELL e POINTER (40).

A avaliação dos sintomas foi feita 5 a 15 dias após, considerando-se resistentes as plantas sem lesões e suscetíveis as mortas ou com lesões no caule. As testemunhas não foram inoculadas.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da luz branca na esporulação de 10 isolados de *M. melonis*

Este ensaio foi instalado a 15/6/1971 e colhido entre 21 e 23/6/71, sendo os resultados apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Efeito da luz branca na esporulação de 10 isolados de *M. melonis*

Isolados	Meios de cultura					
	BDA		V-8		Czapek	
	Luz	- Escuridão	Luz	- Escuridão	Luz	- Escuridão
409	0	0	0	0	0	0
192	4,5	0	6,7	0	0	0
1	36,9	0	42,6*	0	26,2	0
431	0	0	0	0	0	0
630	0	0	0	0	0	0
140	14,3	0	18,2	0	10,5	0
136	28,2	0	38,5	0	23,4	0
2	13,4	0	16,5	0	0	0
557	38,5	0	39,6	0	25,3	0
582	13,6	0	14,5	0	0	0

Estes resultados são médias de picnídios por campo (3,14 mm² ou aumento microscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por tratamento, cada um com 3 repetições.

* Tratamentos onde se observaram peritécios.

Os resultados deste experimento mostram que os isolados desenvolvidos em completa escuridão não esporularam, formando micélio aéreo branco e, micélio verde-escuro, submerso no meio de cultura.

A maior amplitude de variação deste ensaio foi de 10,10 picnídios por campo microscópico, apresentando-se com o isolado 1 no meio de V-8 juice.

4.2. Efeito da luz ultravioleta-curta na esporulação de 10 isolados de *M. melonis*

O experimento foi instalado em 19/6/1971 e colhido entre 4 e 6/7/71, os resultados apresentam-se no Quadro 3.

Quadro 3. Efeito da luz ultravioleta-curta na esporulação de 10 isolados de M. melonis

Isolados	Meios	Tempo de irradiação, em segundos				
		30	60	90	120	180
		Pd - Pr	Pd - Pr	Pd - Pr	Pd - Pr	Pd - Pr
409	B	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	V	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	C	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
192	B	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	V	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	C	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
1	B	16,5-2,3	12,3-0,0	11,1-1,0	12,1-1,0	6,5-0,0
	V	14,6-4,0	18,5-2,0	12,0-3,0	16,2-3,5	13,1-0,0
	C	10,3-1,5	12,2-0,0	10,1-0,0	10,5-0,0	8,5-0,0
431	B	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	V	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	C	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
630	B	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	V	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	C	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
140	B	0 - 0	3,4-0,0	4,2-0,0	5,1-0,0	0 - 0
	V	0 - 0	5,2-0,0	6,2-0,0	6,5-0,0	0 - 0
	C	0 - 0	4,2-0,0	3,1-0,0	3,2-0,0	0 - 0
136	B	12,1-0,0	10,3-0,0	15,3-0,0	8,4-0,0	0 - 0
	V	10,8-0,0	15,3-0,0	13,6-0,0	12,1-0,0	0 - 0
	C	16,5-0,0	10,1-0,0	9,6-0,0	10,3-0,0	0 - 0
2	B	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	V	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	C	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
557	B	14,3-0,0	13,6-0,0	10,4-0,0	11,1-0,0	0 - 0
	V	15,2-0,0	12,1-0,0	15,3-0,0	12,6-0,0	0 - 0
	C	10,1-0,0	15,6-0,0	8,2-0,0	9,1-0,0	0 - 0
582	B	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	V	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
	C	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0

Estes resultados são médias de picnídios por campo (3,14 mm² ou aumento microscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por tratamento, cada um com 3 repetições.

Pd = Picnídios; Pr = Peritécios; B = BDA; V = V-8 juice; C = Czapek.

Os resultados deste ensaio com luz ultravioleta-curta no desenvolvimento das fases imperfeita e perfeita do fungo M. melonis, indicam que os isolados 136, 1 e 557, esporularam bem nos diferentes tratamentos de irradiação; o isolado 140 apresentou menor número de picnídios que os isolados anteriores e, o tratamento com 30 segundos não foi efetivo. O tratamento com 180 segundos foi inibitório à formação de picnídios e peritécios em todos os isolados, com exceção do isolado 1 de melancia, onde observou-se só picnídios.

Peritécios se formaram em todos os tratamentos, quando se usou o isolado 1; observações ao microscópio, mostraram que estes são viáveis, geralmente apresentando ascos com 8 ascósporos do mesmo tamanho. Irradiação a 180 segundos foi inibitória na formação dos peritécios.

Os isolados 409, 630, 431, 582, 192, 2 não formaram estruturas de reprodução nos diferentes tratamentos de luz ultravioleta-curta, observou-se abundante micélio aéreo branco-cinza.

A maior amplitude de variação deste ensaio foi de 6,20 picnídios por campo microscópico, observada com o isolado 1 no meio de BDA; para peritécios foi de 1,50 por campo microscópico, no meio de V-8 juice, com o mesmo isolado.

Observou-se que os meios BDA e V-8 juice, comportaram-se melhor que o meio sintético Czapek, na formação de picnídios e peritécios do fungo.

4.3. Influência das fontes de nitrogênio na esporulação de M. melonis

Os resultados do ensaio, iniciado em 8/7 e colhidos entre 14 a 16/7/71, quando foi montado na luz branca, e entre 26 a 28/7/71, quando foi colocado na escuridão, são apresentados no Quadro 4 e 5, respectivamente.

Quadro 4. Influência das fontes de nitrogênio na esporulação de M. melonis, na luz branca

Fontes de Nitrogênio	Níveis de Nitrogênio g/l											
	0,05		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5	
	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr
NaNO_3	5,75	- 0	1,50	- 0	16,20	- 0	31,65	- 0	29,10	- 0	22,40	- 0
KNO_3	5,80	- 0	7,85	- 0	13,75	- 0	29,50	- 0	23,60	- 0	21,10	- 0
NH_4NO_3	0	- 0	0	- 0	0	- 0	0	- 0	0	- 0	0	- 0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,70	- 0	1,65	- 0	14,25	- 0	19,65	- 0	20,20	- 0	17,90	- 0
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	1,10	- 0	1,60	- 0	13,95	- 0	21,15	- 0	19,20	- 0	16,40	- 0
Peptona	1,15	- 0	1,75	- 0	15,60	- 0	29,05	- 0	31,95	- 0	33,45	- 0
Caseína	2,40	- 0	7,05	- 0	19,30	- 0	33,50	- 0	35,65	- 0	32,50	- 0

Estes resultados são médias de picnífios por campo ($3,14 \text{ mm}^2$ ou aumento microscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por tratamento, cada um com 3 repetições.

Pd = Picnífios; Pr = Peritécios.

Quadro 5. Influência das fontes de nitrogênio na esporulação de M. melonis, na escuridão

	Níveis de nitrogênio g/l											
	0,05		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5	
	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr
NaNO ₃	7,40	- 0	20,65	- 0	26,00	- 0	35,00	- 0	32,10	- 0	25,80	- 0
KNO ₃	6,50	- 0	19,40	- 0	25,00	- 0	36,80	- 0	31,40	- 0	28,30	- 0
NH ₄ NO ₃	0 - 0		0 - 0		0 - 0		0 - 0		0 - 0		0 - 0	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	10,20	- 0	11,03	- 0	16,01	- 0	20,00	- 0	19,20	- 0	15,30	- 0
Mg(NO ₃) ₂	5,60	- 0	10,20	- 0	14,15	- 0	22,15	- 0	15,18	- 0	14,60	- 0
Peptona	11,20	- 0	18,30	- 0	18,60	- 1,70	42,10	- 4,50	30,00	- 3,50	26,10	- 2,50
Caseína	13,50	- 0	28,50	- 0	21,10	- 4,50	35,20	- 8,00	38,00	- 6,30	30,50	- 5,20

Estes resultados são médias de picnídios por campo (3,14 mm² ou aumento microscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por tratamento, cada um com 3 repetições.

Pd = Picnídios; Pr = Peritécios.

Os resultados deste ensaio mostram diferenças entre as fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico na formação de peritécios e não mostram diferenças na formação de picnídios. As fontes de nitrogênio inorgânico não mostraram muita diferença na formação de picnídios, se bem que NaNO_3 e KNO_3 se comportaram um pouco melhor que $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

O NH_4NO_3 mostrou-se inibitório na formação das fases imperfeitas e perfeitas do fungo M. melonis, só observou-se desenvolvimento micelial, com cor cinza ao verde-oliva.

A formação de peritécios foi observada sobre peptona e caseína, quando as caixas de petri foram colocadas na escuridão; as fontes de nitrogênio inorgânico não foram efetivas na formação de peritécios na luz e na escuridão.

Quanto aos níveis de nitrogênio observou-se, que um aumento na concentração, trouxe um aumento na esporulação do fungo; assim, entre 0,2 e 0,5 verificou-se o maior número de corpos de frutificação.

Além do relatado acima, observaram-se diferenças na cor do micélio e estruturas de reprodução, nas fontes de NaNO_3 e KNO_3 o micélio foi hialino com picnídios marron-claro; entretanto, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ apresentaram micélio do cinza-claro a cinza-escuro e picnídios escuros; as fontes de nitrogênio orgânico apresentaram micélio escuro e picnídios e peritécios escuros. As colônias desenvolvidas em completa escuridão apresentaram micélio e estruturas assexuais e sexuais de cor escuro ou preto. Por outro lado, observou-se também que os tratamentos colocados na Biotronette Mark III, após 7 dias de exposição na luz, tendem a secar-se.

4.4. Influência da relação C/N, na reprodução de M. melonis

4.4.1. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/NaNO₃, na reprodução de M. melonis, a luz branca .

Os resultados deste ensaio, montado em 30/8 e colhido entre 6 a 8 de setembro de 1971, com dados transformados em \sqrt{X} são apresentados no Quadro 6.

A análise da variância dos dados do Quadro 6, apresentada no Quadro 7, mostrou uma diferença altamente significativa (1%), para as doses de nitrogênio e significativa (5%) para as doses de carbono, não mostrando diferença significativa para a interação doses de nitrogênio - doses de carbono (DN x DC).

As médias para as doses de nitrogênio, tódas com erro padrão igual a 0,19, foram: $\hat{M}_{0,1} = 4,70$, $\hat{M}_{0,2} = 5,04$, $\hat{M}_{0,3} = 6,02$, $\hat{M}_{0,4} = 5,28$

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,69
2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,87

A comparação das médias para as doses de nitrogênio através do teste de Tukey mostram que a diferença foi devida ao nível 0,3 de nitrogênio, sendo estatisticamente significativo, ao nível de 1% de probabilidade. Os níveis 0,1; 0,2 e 0,4, não apresentaram diferença significativa entre si.

As médias para as doses de carbono, todas com erro padrão igual a 0,15 foram: $\hat{M}_5 = 4,98$, $\hat{M}_{10} = 5,55$, $\hat{M}_{15} = 5,25$.

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,54

2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,70

Este teste mostrou que o nível 10 de dextrose difere do nível 5, ao nível de 5% de probabilidade. Entre os níveis 5-15, e os níveis 10-15 não se observou diferença significativa.

Quadro 6. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de M. melonis, na luz branca.

Relações Dext./N(NaNO_3) em g/l	Médias de 10 contagens por placa			TOTAIS
	R E P E T I Ç Õ E S			
	I	II	III	
5 - 0,1	4,21	5,25	3,92	13,38
10 - 0,1	4,80	4,99	5,08	14,87
15 - 0,1	4,43	5,08	4,52	14,03
5 - 0,2	4,44	4,42	4,35	13,21
10 - 0,2	5,76	6,05	5,50	17,31
15 - 0,2	4,68	4,71	5,42	14,81
5 - 0,3	6,04	5,83	6,48	18,36
10 - 0,3	5,94	5,55	6,02	17,51
15 - 0,3	7,35	4,73	6,26	18,34
5 - 0,4	4,91	5,34	4,55	14,80
10 - 0,4	5,45	5,87	5,57	16,89
15 - 0,4	4,92	6,03	4,92	15,87

Estes resultados são médias de picnídios por campo ($3,14 \text{ mm}^2$ ou aumento mi croscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por tratamento transformados em \sqrt{X} , cada um com 3 repetições.

Quadro 7. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de M. melonis, na luz

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Doses de N (DN)	3	8,50	2,83	10,11**
Doses de C (DC)	2	2,25	1,13	4,03*
Interação (DN x DC)	6	2,18	0,36	1,29
Tratamentos	11	12,93		
Resíduo	24	6,72	0,28	
Total	35	19,65		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

C.V. = 10,01%

Além do relatado acima, observaram-se diferenças na cor do micélio e estruturas de reprodução; assim, os tratamentos com 5 g/l de dextrose apresentaram pouco micélio e de cor branca, com picnídios marrom, em todos os níveis de nitrogênio, com exceção do nível 0,1, que apresentou micélio cinza-escuro e picnídios pretos. Os tratamentos com 10 g/l de dextrose, apresentaram pouco micélio, de cor cinza-escuro e picnídios escuros, em todos os níveis de nitrogênio. Com 15 g/l de dextrose apresentaram-se os mesmos resultados que para 10 g/l, só que o micélio foi muito abundante, dificultando a contagem e, por sua vez, apresentando grande número de picnídios imaturos.

4.4.2. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de M. melonis, na escuridão

Os resultados deste ensaio, montado em 30/8/ colhido entre 12 a 15/9/71, com dados transformados em \sqrt{X} , são apresentados no Quadro 8.

A análise da variância dos dados do Quadro 8, apresentada no Quadro 9, mostrou diferença altamente significativa (1%) para as doses de nitrogênio, carbono e da interação (DN x DC).

As médias para as doses de nitrogênio, todas com erro padrão igual a 0,06 foram:

$$\hat{M}_{0,1} = 4,99, \quad \hat{M}_{0,2} = 5,24, \quad \hat{M}_{0,3} = 5,69, \quad \hat{M}_{0,4} = 5,25$$

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,26
2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,33

A comparação das médias para as doses de nitrogênio através do teste de Tukey mostrou que a diferença foi devida ao nível 0,3 de nitrogênio, sendo estatisticamente significativo ao nível de 1% de probabilidade, e 0,4 significativo ao nível de 5%. As comparações 0,1 com 0,2 e 0,2 com 0,4 não apresentaram diferenças significativas.

As médias para as doses de carbono, todas com erro padrão igual a 0,05 foram: $\hat{M}_5 = 5,23$, $\hat{M}_{10} = 5,42$, $\hat{M}_{15} = 5,16$.

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,20
2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,26

Este teste mostrou que o nível 10 de dextrose difere do nível 15 ao nível de 1% de probabilidade. Entre os níveis 5-10 e 5-15 não se observou diferença significativa.

Quadro 8. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaNO_3 , na reprodução de M. melonis, na escuridão

Relação Dext./N(NaNO_3) em g/l	Médias de 10 contagens por placa			TOTALS
	R E P E T I Ç Õ E S			
	I	II	III	
5 - 0,1	4,67	5,16	5,12	14,95
10 - 0,1	5,51	4,91	5,12	15,54
15 - 0,1	4,88	4,83	4,70	14,41
5 - 0,2	5,46	5,38	5,41	16,25
10 - 0,2	5,37	5,32	4,75	15,44
15 - 0,2	5,21	4,99	5,26	15,46
5 - 0,3	5,44	5,60	5,50	16,54
10 - 0,3	5,51	5,94	5,71	17,16
15 - 0,3	5,75	5,95	5,81	17,51
5 - 0,4	5,45	5,30	5,09	15,84
10 - 0,4	5,39	5,73	5,76	16,88
15 - 0,4	4,68	4,97	4,91	14,56

Estes resultados são médias de picnídios por campo ($3,14 \text{ mm}^2$ ou aumento mi croscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por tratamento transformados em \sqrt{X} , cada um com 3 repetições.

Quadro 9. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/ NaN_3 , na reprodução de M. melonis, na escuridão.

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Doses de N (DN)	3	2,30	0,77	19,25**
Doses de C (DC)	2	0,39	0,20	5,00*
Interação (DN x DC)	6	1,01	0,17	4,25**
Tratamentos	11	3,70		
Resíduo	24	0,96	0,04	
Total	35	4,66		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

C.V. = 3,78%

Como a interação foi significativa, desdobraram-se os graus de liberdade. Para os estudos dos efeitos das doses de nitrogênio (DN) dentro do carbono, obteve-se a análise apresentada no Quadro 10. Para os efeitos das doses de carbono dentro de nitrogênio, a análise encontra-se no Quadro 12.

Quadro 10. Análise da variância para os efeitos das doses de nitrogênio dentro das doses de carbono

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Doses de N dentro de C-5	3	0,49	0,16	4,00*
Doses de N dentro de C-10	3	0,79	0,26	6,50**
Doses de N dentro de C-15	3	2,04	0,68	17,00**
Doses de Carbono	2	0,39	0,20	5,00**
Tratamento	11	3,70		
Resíduo	24	0,96	0,04	
Total	35	4,66		

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

As médias das doses de nitrogênio dentro das doses de carbono com erro padrão igual a 0,11, encontram-se relacionadas no Quadro 11.

Quadro 11. Médias das doses de nitrogênio dentro das doses de carbono.

Níveis de Carbono	Níveis de Nitrogênio			
	0,1	0,2	0,3	0,4
5	4,98	5,42	5,52	5,28
10	5,18	5,15	5,72	5,62
15	4,80	5,15	5,84	4,85

As diferenças mínimas significativas no teste de Tukey foram:

5% = 0,45 e 1% = 0,57

Comparando-se as médias de cada dose de nitrogênio dentro de cada dose de carbono, nota-se que as médias para os níveis 0,1 e 0,3 de nitrogênio dentro da dose 5 de carbono, diferiram significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, os demais níveis, não diferiram entre si. As médias para os níveis 0,2 e 0,3 dentro da dose a 10 carbono, diferiram significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, a dose 0,1 diferiu de 0,3, ao nível de 5% de probabilidade, o mesmo acontecendo entre 0,2 e 0,4; as demais não diferiram entre si. As doses de nitrogênio 0,1; 0,2 e 0,4 dentro da dose de 15 de carbono, diferiram significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, da dose 0,3; os níveis de 0,1; 0,2 e 0,4 não diferiram entre si.

Quadro 12. Análise da variância para os efeitos das doses de carbono dentro das doses de nitrogênio

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Doses de C dentro de N _{0,1}	2	0,20	0,10	2,50
Doses de C dentro de N _{0,2}	2	0,15	0,08	2,00
Doses de C dentro de N _{0,3}	2	0,16	0,08	2,00
Doses de C dentro de N _{0,4}	2	0,89	0,45	11,25**
Doses de nitrogênio	3	2,30	0,77	19,25**
Tratamento	11	3,70		
Resíduo	24	0,96	0,04	

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

As médias das doses de carbono dentro das doses de 0,4 nitrogênio, todas com erro padrão de 0,11, encontram-se relacionadas abaixo.

$$\hat{M}_5 = 5,28, \quad \hat{M}_{10} = 5,26, \quad \hat{M}_{15} = 4,85$$

As diferenças mínimas significativas no teste de Tukey foram:
5% = 0,41 e 1% = 0,51.

Comparando-se as médias de cada dose de carbono dentro do nível 0,4 de nitrogênio, nota-se que o nível 5 de carbono, diferiu, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, do nível 15. O nível 10 diferiu, significativamente, a 5% de probabilidade, do nível 15. Entre os níveis 5 e 10 não houve diferença significativa.

Além do relatado acima, observou-se as mesmas diferenças para micélio e picnídios, nos diferentes tratamentos, como é indicado no item 4.4.1., com a exceção de que os tratamentos com 10 g/l e 15 g/l de carbono, apresentaram micélio submerso de cor preto.

4.4.3. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de M. melonis, na luz branca.

Os resultados deste ensaio, montado a 10/9 colhido entre 17 e 18/9/71, com dados transformados em \sqrt{X} , são apresentados no Quadro 13.

A análise da variância dos dados do Quadro 13, apresentada no Quadro 14, mostrou uma diferença altamente significativa (1%) para as doses de nitrogênio e carbono, não mostrando diferença significativa para a interação DN x DC.

As médias para as doses de nitrogênio, todas com erro padrão igual a 0,07 foram: $\hat{M}_{0,1} = 3,95$, $\hat{M}_{0,2} = 4,90$, $\hat{M}_{0,3} = 5,69$, $\hat{M}_{0,4} = 5,46$

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,29
2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,36

A comparação das médias para doses de nitrogênio através do teste de Tukey mostrou que todos os níveis apresentaram diferença significativa ao nível de 1%, com exceção dos níveis 0,3 - 0,4, não apresentaram diferença significativa entre si.

As médias para as doses de carbono, todas com erro padrão igual a 0,06 foram: $\hat{M}_5 = 5,26$, $\hat{M}_{10} = 5,05$, $\hat{M}_{15} = 4,69$.

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,22
2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,29

Este teste mostrou que os níveis 5-15 e 10-15 de dextrose diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade. Entre os níveis 5 e 10 não se observou diferença significativa.

Quadro 13. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na re-
produção de M. melonis, na luz branca

Relação Dext./N(Caseína) g/l	Médias de 10 contagens por placa			TOTAIS
	R E P E T I Ç Õ E S			
	I	II	III	
5 - 0,1	3,76	4,06	4,36	12,18
10 - 0,1	3,77	4,25	3,55	11,57
15 - 0,1	3,95	3,95	3,86	11,76
5 - 0,2	5,01	5,40	5,23	15,65
10 - 0,2	4,93	5,39	4,76	15,08
15 - 0,2	4,38	4,58	4,40	13,36
5 - 0,3	6,12	6,17	6,06	18,35
10 - 0,3	5,62	5,79	5,78	17,19
15 - 0,3	5,28	5,03	5,35	15,66
5 - 0,4	5,88	5,81	5,25	16,94
10 - 0,4	5,68	5,64	5,41	16,73
15 - 0,4	4,83	5,29	5,35	15,47

Estes resultados são médias de picnídios por campo ($3,14 \text{ mm}^2$ ou aumento mi-
croscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por trata-
mento transformados em \sqrt{X} , cada um com 3 repetições. Não houve forma-
ção de peritécios.

Quadro 14. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de M. melonis, na luz branca

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Doses de N (DN)	3	16,27	5,42	108,40**
Doses de C (DC)	2	2,01	1,01	20,20**
Interação (DN x DC)	6	0,64	0,11	2,20
Tratamento	11	18,92		
Resíduo	24	1,08	0,05	
Total	35	20,00		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

C.V. = 4,47%

Além dos resultados já mencionados, observou-se diferenças na cor do micélio e estruturas reprodutivas, igual aquelas apresentadas no ítem 4.4.1.

4.4.4. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de M. melonis, na escuridão

Os resultados deste ensaio, montado em 10/9 colhido entre 25 a 26/9/71, com dados transformados em \sqrt{X} , são apresentados no Quadro 15.

Quadro 15. Combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de M. melonis, na escuridão

Relação Dext./N(caseína) g/l	Médias de 10 contagens por placa						T O T A I S
	R E P E T I Ç Õ E S						
	I		II		III		
	Pd* - Pr*	Pd - Pr	Pd - Pr	Pd - Pr	Pd - Pr	Pd - Pr	
5 - 0,1	4,16 - 1,30	3,95 - 1,58	3,91 - 1,30	12,02 - 4,18			
10 - 0,1	4,26 - 1,30	4,06 - 1,14	4,02 - 1,34	12,33 - 3,78			
15 - 0,1	3,89 - 1,26	3,96 - 1,30	3,76 - 1,10	11,60 - 3,66			
5 - 0,2	4,77 - 1,22	5,13 - 1,30	4,77 - 1,52	14,68 - 4,04			
10 - 0,2	4,62 - 1,45	4,53 - 2,05	4,42 - 2,00	13,57 - 5,50			
15 - 0,2	4,29 - 1,87	4,14 - 2,40	4,36 - 1,97	12,79 - 6,24			
5 - 0,3	5,52 - 1,58	6,43 - 0,70	5,82 - 1,58	17,77 - 3,86			
10 - 0,3	5,49 - 2,37	5,29 - 2,63	5,18 - 2,55	15,96 - 7,55			
15 - 0,3	4,90 - 1,79	5,05 - 2,65	5,33 - 1,67	15,28 - 6,11			
5 - 0,4	5,49 - 1,34	5,49 - 1,52	5,41 - 1,41	16,39 - 4,27			
10 - 0,4	4,82 - 1,82	6,26 - 1,41	5,26 - 1,30	15,34 - 4,53			
15 - 0,4	4,74 - 2,49	4,96 - 2,00	4,42 - 2,92	14,12 - 7,41			

Estes resultados são médias de picnífios e peritécios por campo (3,14 mm² ou aumento microscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por tratamento transformados em \sqrt{X} , cada um com 3 repetições. Pd = Picnífios; Pr = Peritécios.

Os resultados das análises de variância dos dados do Quadro 15, tanto para picnídios como peritécios, são apresentados em quadros separados.

A análise da variância para picnídios, apresentada no Quadro 16, mostrou uma diferença altamente significativa (1%) para as doses de nitrogênio e carbono, não mostrando diferença significativa para a interação DN x DC.

As médias para as doses de nitrogênio, todas com erro padrão igual a 0,08 foram: $\hat{M}_{0,1} = 3,99$, $\hat{M}_{0,2} = 4,56$, $\hat{M}_{0,3} = 5,44$, $\hat{M}_{0,4} = 5,10$.

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,28
2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,36

A comparação das médias para as doses de nitrogênio através do teste de Tukey mostraram diferença significativa em todas as combinações, ao nível de 1% de probabilidade. Os níveis 0,3 - 0,4 não apresentaram diferença significativa entre si.

As médias para as doses de carbono, todas com erro padrão igual a 0,09 foram: $\hat{M}_5 = 5,07$, $\hat{M}_{10} = 4,77$, $\hat{M}_{15} = 4,48$.

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,28
2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,36

Este teste mostrou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, entre as doses 5 e 15 de carbono e, diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, entre as doses 5 e 10, e as doses 10 e 15 de carbono.

Quadro 16. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de M. melonis, na escuridão.

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Doses de N (DN)	3	10,77	3,59	44,88**
Doses de C (DC)	2	2,03	1,02	12,75**
Interação (DN x DC)	6	0,55	0,09	1,12
Tratamentos	11	13,35		
Resíduo	24	1,97	0,08	
Total	35	15,32		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

C.V. = 5,92%

A análise da variância com peritécios, apresentada no Quadro 17, mostrou diferença altamente significativa (1%) para as doses de nitrogênio, carbono e da interação (DN x DC).

As médias para as doses de nitrogênio, todas com erro padrão igual a 0,10 foram: $\hat{M}_{0,1} = 1,29$, $\hat{M}_{0,2} = 1,76$, $\hat{M}_{0,3} = 0,95$, $\hat{M}_{0,4} = 1,80$.

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey, foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,39
2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,49

A comparação das médias para as doses de nitrogênio através do teste de Tukey, mostrou diferença entre o nível 0,1 e os níveis 0,2; 0,3 e 0,4, ao nível de 1% de probabilidade. Entre os níveis 0,2; 0,3 e 0,4 não se observou diferença.

As médias para as doses de carbono, todas com erro padrão igual a 0,08 foram: $\hat{M}_5 = 1,37$, $\hat{M}_{10} = 1,78$, $\hat{M}_{15} = 1,95$.

As diferenças mínimas significativas para o teste de Tukey foram:

1. Ao nível de 5% de probabilidade: = 0,31
2. Ao nível de 1% de probabilidade: = 0,39

Este teste mostrou que os níveis 10 e 15 diferem do nível 5 de carbono, significativamente ao nível de 1% de probabilidade; entre os níveis 10 e 15 de carbono, não se apresentou diferença significativa.

Quadro 17. Análise da variância das combinações entre diferentes níveis de dextrose/caseína, na reprodução de M. melonis, na escuridão.

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Doses de N (DN)	3	2,15	0,72	8,00**
Doses de C (DC)	2	2,19	1,10	12,22**
Interação (DN x DC)	6	3,00	0,50	5,55**
Tratamento	11	7,34		
Resíduo	24	2,15	0,09	
Total	35			

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

C.V. = 17,64%

Como a interação foi significativa, desdobraram-se os graus de liberdade. Para os estudos dos efeitos das doses de nitrogênio (DN) dentro do carbono, obteve-se a análise apresentada no Quadro 18. Para os efeitos das doses de carbono dentro de nitrogênio, a análise encontra-se no Quadro 20.

Quadro 18. Análise da variância para os efeitos das doses de nitrogênio dentro das doses de carbono

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Doses de N dentro de C-5	3	0,03	0,01	0,11
Doses de N dentro de C-10	3	2,64	0,88	9,78**
Doses de N dentro de C-15	3	2,48	0,83	9,22**
Doses de Carbono	2	2,19	1,10	12,22**
Tratamento	11	7,34		
Resíduo	24	2,15	0,09	
Total	35			

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade

As médias das doses de nitrogênio dentro do carbono com erro padrão igual a 0,17, encontram-se relacionadas no Quadro 19.

Quadro 19. Médias das doses de nitrogênio dentro de carbono

Níveis de Carbono	Níveis de Nitrogênio			
	0,1	0,2	0,3	0,4
10	1,26	1,83	2,51	1,51
15	1,22	2,08	2,03	2,47

As diferenças mínimas significativas no teste de Tukey foram: 5% = 0,68 e 1% = 0,85.

Comparando-se as médias de cada dose de nitrogênio dentro de cada dose de carbono, notou-se que a média para o nível de 0,3 de nitrogênio apresentou diferença significativa com os níveis 0,1; 0,2 e 0,4 dentro da dose 10 de carbono, ao nível de 1% de probabilidade. As doses 0,1; 0,2 e 0,4 de nitrogênio, não apresentando diferença significativa entre si. As

doses 0,2 e 0,4 de nitrogênio dentro do C-15, apresentaram diferença significativa com o nível 0,1, ao nível de 1% de probabilidade; a dose de 0,1 diferiu de 0,3, ao nível de 5% de probabilidade; entre os níveis 0,2; 0,3 e 0,4 não houve diferença significativa.

Quadro 20. Análise da variância para os efeitos das doses de carbono dentro das doses de nitrogênio

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Doses de C dentro de N _{0,1}	2	0,06	0,03	0,33
Doses de C dentro de N _{0,2}	2	0,83	0,42	4,66**
Doses de C dentro de N _{0,3}	2	2,28	1,14	12,67**
Doses de C dentro de N _{0,4}	2	2,02	1,01	11,22**
Doses de nitrogênio	3	2,15	0,72	8,00**
Tratamentos	11	7,34		
Resíduo	24	2,15	0,09	
Total	35	9,49		

** = significativa ao nível de 1% de probabilidade

As médias das doses de carbono dentro das doses de nitrogênio, todas com erro padrão de 0,17, encontram-se relacionadas no Quadro 21.

Quadro 21. Médias das doses de carbono dentro das doses de nitrogênio

Níveis de Nitrogênio	Níveis de Carbono		
	5	10	15
0,2	1,35	1,83	2,08
0,3	1,29	2,51	2,04
0,4	1,42	1,51	2,47

As diferenças mínimas significativas no teste de Tukey foram:

5% = 0,61 e 1% = 0,79.

Comparando-se as médias de cada dose de nitrogênio dentro de cada dose de carbono, notou-se que o nível 5 de carbono dentro da dose 0,2 de nitrogênio, diferiu significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, do nível 15. Entre os níveis 5 e 10; 10 e 15 não houve diferença significativa. A dose 5 de carbono dentro da dose 0,3 de nitrogênio, diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, do nível 10, e ao nível de 5% de probabilidade, da dose 15. Entre as doses 10 e 15 não houve diferença. A dose 5 de carbono dentro do nível 0,4 de nitrogênio, diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, do nível 15. A dose 10 de carbono, diferiu significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, do nível 15, dentro da mesma dose de nitrogênio. Entre 5 e 10 não houve diferença.

Além do relatado acima, observou-se micélio de cor cinza-escuro em todos os tratamentos, picnídios e peritécios pretos. Todos os tratamentos apresentaram maior número de peritécios nas periferias das caixas de Petri. Os peritécios examinados ao microscópio, foram em sua totalidade férteis, apresentando 8 ascosporos em cada asca.

4.5. Comportamento dos isolados, 1, 136 e 557 em diferentes meios de cultura.

Os resultados deste ensaio, instalado em 22/9 e colhido entre 29/9 e 1/10/71, quando foi instalado na luz e entre 7 a 9/10/71, quando foi instalado na escuridão, são apresentados nos Quadros 22 e 23.

Quadro 22. Comportamento dos isolados 1, 136, 557 em diferentes meios de cultura e na luz

Isolados	M E I O S											
	Dext./NaNO ₃		Dext./Caseína		V-8 juice		BDA		Czapek			
	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr		
136	43,73	- 0,00	23,86	- 0,00	21,46	- 0,00	20,93	- 0,00	19,50	- 0,00		
1	37,50	- 0,00	21,93	- 0,00	17,53	- 0,00	28,36	- 0,00	18,60	- 0,00		
557	32,13	- 0,00	20,90	- 0,00	22,30	- 0,00	0,00	- 0,00	19,16	- 0,00		

Estes resultados são médias de picnídios por campo (3,14 mm² ou aumento microscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por tratamento, cada um com 3 repetições.

Quadro 23. Comportamento dos isolados 1, 136 e 557 em diferentes meios de cultura e na escuridão

Isolados	M E I O S											
	Dext./NaNO ₃		Dext./Caseína		V-8 juice		BDA		Czapek			
	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr	Pd	Pr		
136	8,50	- 0,00	10,20	- 0,00	7,60	- 0,00	0,0	- 0,00	6,30	- 0,00		
1	14,50	- 0,00	18,90	- 3,50	12,30	- 1,50	13,60	- 2,00	12,00	- 0,00		
557	10,20	- 0,00	9,50	- 0,00	8,60	- 0,00	0,0	- 0,00	0,0	- 0,00		

Estes resultados são médias de picnídios e de peritécios por campo (3,14 mm² ou aumento microscópico de 75), a qual é resultante da contagem de 10 campos por tratamento, cada um com 3 repetições.

Pd = Picnídios; Pr = Peritécios.

Os resultados deste ensaio mostram que os isolados de pepino (136) e abóbora (557), se comportaram tão bem como o isolado de melancia(1), quando o ensaio foi colocado na luz. Diferenças foram observadas, quando foi realizado na escuridão, os isolados 136 e 557 apresentaram menor número de picnídios que o isolado 1, não formaram peritécios.

Observou-se também que os meios que contêm dextrose e nitrogênio inorgânico e orgânico, com uma relação C/N de 40:1 para nitrogênio inorgânico (10 grs. de dextrose: 0,3 g de NaNO_3) e 80:1 para nitrogênio orgânico (10 g de dextrose: 0,3 de caseína), apresentaram-se melhor para a formação de estruturas reprodutivas que os meios V-8, juice BDA e Czapek.

4.6. Teste de patogenicidade

Os resultados deste ensaio, montado em 4/8 e colhido entre 10/8 e 1/9/71, são apresentados no Quadro 24.

Quadro 24. Teste de patogenicidade dos isolados 136, 1, 557, 582 e 140, de M. melonis

Variedades de Cucurbitáceas	Isolados de M. melonis				
	1	557	140	582	136
Flórida Gigante	S	S	S	S	S
Fairfax	S	S	S	S	S
Melão Casca de Carvalho	S	S	S	S	S
Abóbora de Moita Var. Caserta	S	S	S	S	S
Abóbora Menina	R	R	R	R	R
Pepino Aodai	S	S	S	S	S
Pepino Marketer I-2205	S	S	S	S	S
Pepino Verde Paulistano	S	S	S	S	S
Maxixe liso	R	R	R	R	R
Maxixe espinhudo	R	R	R	R	R

S = Suscetível; R = Resistente.

Todos os tratamentos foram repetidos três vezes, cada um com 5 plantas para cada isolado testado.

Os resultados mostram que todas as espécies de cucurbitáceas, com exceção da abóbora menina (Cucurbita, sp) e maxixe liso e espinhudo - (Cucumis anguria L.), foram suscetíveis aos isolados de M. melonis.

Além dos resultados descritos, observou-se que melão (Cucumis melo L.) e melancia (Citrullus vulgaris L.), aos tres primeiros dias apresentavam sintomas de murcha, morrendo aos 5 ou 6 dias; pepino (Cucumis sativus L.) e abóbora (Cucurbita, sp) apresentavam sintomas só no caule; na região do hipocótilo, onde visualisava-se estruturas de reprodução de cor preta, as plantas morriam aos 15 ou 20 dias de inoculados. Notou-se por outro lado, que o isolado 1 de melancia, apresentou-se mais virulento. As plantas inoculadas com este isolado apresentaram sintomas mais cedo e morreram mais rapidamente do que aquelas inoculadas com outros isolados.

5. DISCUSSÃO

O resultado do 1º experimento, mostrando a capacidade indutora de esporulação da luz branca ao isolado 1 de M. melonis em meio de BDA, vai frontalmente contra o resultado obtido por ZAMBRANO et al (45) no mesmo meio de cultura e com o mesmo isolado. Apesar dessas experiências terem sido feitas em épocas diferentes e de as condições não terem sido exatamente as mesmas, é possível que tenha havido erro de observação no trabalho acima citado. Respondendo ao efeito indutor de esporulação da luz fluorescente, os isolados 1, 2, 136, 140, 192, 557 e 582 se comportaram como os isolados de SOWELL e POINTER (40) e CURREN (9, 10), apesar das condições não serem completamente iguais. Os isolados 409, 431 e 630, não respondendo ao mesmo estímulo luminoso, demonstram variação qualitativa dentro da mesma espécie. Tal variação, na realidade, pode ser meramente quantitativa e influenciada pelo meio de cultura, como patentemente se vê para os isolados 2, 192 e 582 que não esporularam em meio de Czapek mas o fizeram em BDA e V-8 juice. O isolado 1, o único que apresentou peritécios concomitantemente com picnídios, no meio de V-8 juice, se comportou semelhantemente aos isolados de CURREN (1969) com a diferença que este encontrou peritécios em meio de V-8 juice também no escuro.

O efeito indutor de esporulação da luz fluorescente em muitos fungos foto-sensíveis, inclusive Ascochyta pisi, é, segundo LEACH (25), devido ao espectro de ultravioleta de 300 a 400nm, presente em pequena mas significativa quantidade. É bem possível que o mesmo fenômeno se repita para os isolados foto-sensíveis do presente experimento

Os resultados do 2º experimento demonstram, de um modo geral, que a radiação ultravioleta de 254 nm tem efeito semelhante ao da luz

fluorescente em induzir a esporulação dos isolados 1, 136, 140 e 557. Novamente, uma comparação com o trabalho de ZAMBRANO et al. (45) mostra que o resultado, para o isolado 1, é contraditório.

O fato de luz ultravioleta curta (254 nm), que não está presente na luz fluorescente, ter efeito indutor de esporulação já está provado para Ascochyta pisi (25) e Pleospora herbarum (26), além de possivelmente, para a própria Mycosphaerella melonis (5). Entretanto, novamente se observa o fato de haver isolados, como 409, 431, 630, 2, 192 e 582, que não responderam ao estímulo indutor. Coincidentemente os 3 primeiros não tinham respondido à luz fluorescente e os 3 últimos, quando no meio de Czapek, também não o fizeram.

O fato de, nos dois primeiros experimentos, só o isolado 1 apresentar peritécios, deve ser totalmente genético. Isto implica em contradizer o fato aceito de que M. melonis é homotálico (5): provavelmente ao lado de linhagens homotálicas existem outras que não o são.

Os resultados do experimento 3, na luz, comprovam o que já se conhece para muitos fungos (20): a influência da fonte de N e da relação C/N. Das fontes nitrogenadas usadas, excetuando NH_4NO_3 que não permitiu esporulação, todas tiveram um efeito mais ou menos semelhante de aumentar a formação de picnídios com um aumento na dose de nitrogênio. Segundo HAWKER (20), a quantidade mínima de nitrogênio permitindo esporulação está acima daquela na qual ocorre crescimento vegetativo esparso e se a quantidade é aumentada muito acima deste valor mínimo o crescimento vegetativo se torna muito vigoroso e inibe a esporulação. Aparentemente, portanto, a quantidade de nitrogênio não foi aumentada muito acima do valor mínimo, nas dosagens utilizadas no presente experimento. O fato de NH_4NO_3 não ter sido boa fonte de esporulação já é citado também para outros fungos, como Alternaria citri e A. tenuis (19). O fato de os cátions Na, K, Ca ou Mg do nitrato

terem pouca influência na **formação** de corpos frutíferos também é citado na literatura para Venturia inaequalis (33). O resultado de CURREN (10) de que dos diferentes compostos nitrogenados testados para M. melonis, peptona foi a melhor para produção de picnídios, coincide com os do presente experimento; entretanto não coincide o fato de ter encontrado que em KNO_3 a produção de picnídios foi notavelmente mais pobre do que em peptona. Ressalve-se, no entanto, a circunstância de CURREN ter trabalhado com micélio como inóculo.

Os resultados do ensaio 3, na escuridão, mostram a tendência geral do mesmo ensaio ra luz, podendo-se dizer que, comparativamente, de um modo geral, houve maior formação de picnídios na escuridão. Isto, pelo menos em parte, deve ter ocorrido em função do período de incubação mais longo no escuro. A ausência de peritécios na luz e a presença na escuridão, nos meios em que as fontes de nitrogênio são peptona e caseína, pode também ser devido a falha de observação pois, além de peritécios bem constituídos serem mais fáceis de se observar depois de 10 a 15 dias de incubação, ZAMBRA-NO et al (45) demonstraram anteriormente a sua formação sob luminosidade constante, se bem que em meios de cultura diferentes. De qualquer forma, fica demonstrada a diferença de exigência nutricional na formação de peritécios: só se formaram com caseína e peptona como fonte de nitrogênio. Segundo HAWKER (20), afirmações ocasionais de que formas orgânicas de nitrogênio, tal como peptona, são superiores aos compostos inorgânicos em induzir frutificação e são usualmente devidas a presença de traços de vitaminas nos compostos orgânicos e não há nenhum fundamento em acreditar-se que tais compostos orgânicos são uniformemente superiores aos inorgânicos como fonte de nitrogênio.

Comparando-se os resultados do ensaio 3, no escuro, com os do ensaio 1, nota-se que, apesar de ter que se levar em consideração o efeito

de meios de cultura (diferentes nos dois ensaios), a diferença de formação de picnídios no escuro é devida fundamentalmente ao tipo de inóculo: micélio necessita de indução luminosa e conídios não. Segundo LEACH (27), em fungos foto-sensíveis por ele estudados substâncias esporogênicas são induzidas a se formar pela ação de luz ultravioleta, substâncias essas já presentes nos esporos em quantidade suficiente para propiciar esporulação no escuro. Mas como estudo semelhante não foram feitos em M. melonis é preciso lembrar que existem outras explicações possíveis, como, por exemplo, a rápida depleção de nutrientes (42) e a presença de fatores de crescimento na suspensão de esporos (29).

Os resultados dos ensaios sobre influência da relação C/N são uma confirmação qualitativa do ensaio 3, na luz e na escuridão, e mostram as diferenças quantitativas devidas a doses de nitrogênio, doses de dextrose e interações destas em dois ambientes. Como COCHRANE (8) já chamava a atenção, a maioria de nosso conhecimento sobre reprodução de fungos se origina de dados essencialmente qualitativos e alguns problemas requerem dados quantitativos sobre intensidade de esporulação, particularmente para estudos nutricionais em que resposta é mais do tipo quantitativo do que qualitativo. No espectro das dosagens de N e de C usadas no presente experimento, os dados obtidos foram essencialmente quantitativos, excetuando-se, logicamente, as comparações qualitativas de nitrogênio e de ambiente, com ou sem luz.

Os comportamentos dos isolados 1, 136 e 557, em diferentes meios de cultura e em dois ambientes (luz constante e escuridão constante), confirmam qualitativamente os ensaios anteriores, inclusive o fato de só o isolado 1 formar peritécios. É interessante lembrar que, segundo MATHUR et al (29) e ROSS (33), trabalhando respectivamente com Colletotrichum e Venturia, é bastante difícil reproduzir os mesmos resultados, em meios semi-

naturais ou contendo extratos vegetais, de modo que, pelo menos em parte, os presentes resultados indicam a possibilidade de se usar meios de composição bem definida.

Os resultados do teste de patogenicidade, não mostrando especificidade de isolados dos diferentes hospedeiros, explicam, o fato de não se encontrar referências bibliográficas sobre existência de raças fisiológicas de M. melonis. O fato de o isolado 1 ter-se mostrado mais virulento do que os outros concorda com o trabalho de SOWELL et al. (41) que se refere à mesma variabilidade entre dois isolados de M. melonis, obtidos de melão cantaloupe. O fato de abóbora manina ter-se mostrado resistente vai contra o trabalho de FIGUEIREDO et al. (13), com a ressalva de que este pesquisador inoculou micélio em "seedlings" com hipocótilo artificialmente ferido. Por outro lado SITTERLY (37) cita Cucumis anguria como hospedeiro de M. melonis, fato que não se comprova no presente trabalho pois maxixe foi resistente a todos os isolados.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que:

- 6.1. Dos 10 isolados de M. melonis, submetidos à luz fluorescente e U.V. curta (254 nm), 4 (1, 136, 557 e 140) responderam a ambas, 3 (2, 192 e 582) somente à luz fluorescente e 3 (409, 431 e 360) a nenhuma.
- 6.2. As fontes de nitrogênio NaNO_3 , KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ tiveram um comportamento semelhante na indução da formação de picnídios do isolado 1, tanto na luz como na escuridão. Caseína e peptona tiveram efeito semelhante ao das fontes de nitratos na formação de picnídios, diferindo, entretanto, qualitativamente, na capacidade de induzir formação de peritécios no escuro. NH_4NO_3 não permitiu esporulação.
- 6.3. No ensaio das relações C/N na reprodução de M. melonis mostrou-se que os níveis 0,3 e 0,4 de nitrogênio inorgânico e orgânico foram os mais eficientes na esporulação do fungo. Por outro lado, o nível 10 de carbono foi o mais eficiente, quando se usou o nitrogênio inorgânico. As fontes de carbono quando se usou o nitrogênio orgânico, mostraram reações diferentes; assim, picnídios formaram-se melhor com os níveis 5 de carbono; entretanto, peritécios evidenciaram-se melhor na dose 15 de carbono.
- 6.4. Os melhores meios de culturas desenvolvidos no presente trabalho foram tão bons ou melhores que os de V-8 juice, BDA e Czapek na formação de picnídios dos isolados 1, 136 e 557.

6.5. Sòmente o **isolado 1** formou peritécios e em quantidades apreciáveis quando cultivado, sob ausência de luz em meios contendo caseína e peptona.

6.6. Os isolados inoculados em diferentes hospedeiros não mostraram especificidade, sendo todos patogênicos à melancia, melão, abóbora de moita e pepino. Abóbora menina e maxixe foram resistentes. O isolado 1 mostrou-se mais virulento que os outros.

7. RESUMO

O presente trabalho teve por finalidade, estudar os efeitos da luz e nutrição na esporulação do fungo Mycrosphaerella melonis (PASS) CHIU e WALKER.

Do estudo dos efeitos da luz fluorescente e UV-curta (254 nm) sobre a esporulação de 10 isolados de M. melonis, observou-se que quatro responderam a ambas, 3 somente à luz fluorescente e os 3 restantes a nenhuma.

Das várias fontes de nitrogênio, testadas em um dos isolados, observou-se que nitratos, com exceção de NH_4NO_3 , tiveram efeito semelhante ao da caseína e peptona na indução de formação de picnídios, tanto na luz como no escuro. Entretanto, peritécios só se formaram com as duas fontes orgânicas de nitrogênio e só na escuridão.

Dos 4 níveis de nitrogênio inorgânico (NaNO_3) e orgânico (caseína), combinadas com 3 de dextrose, testadas sobre um dos isolados de M. melonis, observou-se que os níveis 0,3 e 0,4 de N foram os mais eficientes em induzir esporulação, tanto na luz como na escuridão. O melhor nível de dextrose variou com a fonte de nitrogênio e com a estrutura reprodutiva. Assim, para formação de picnídios, foi melhor 10 grs, em presença de NaNO_3 , e 5 gr, em presença de caseína; e para formação de peritécios 15 gr.

Meios contendo NaNO_3 e caseína comportaram-se semelhantemente ou melhor que os de V-8 juice, BDA e Czapek, na esporulação dos isolados 1, de melancia, 136, de pepino, e 557 de abóbora. Dos diferentes isolados testados nos ensaios, observou-se que somente isolado 1 formou peritécios e em

quantidades apreciáveis quando cultivados, sob ausência de luz, em meios contendo caseína e peptona.

Nos testes de patogenicidade, os isolados 1, 136, 140, 557 e 582 foram patogênicos a melancia da variedade Flórida gigante e Fairfax, melão Casca de Carvalho, abóbora Moita var. Caserta, pepino das var. Aodai, Marketer I-2205 e Verde Paulistano. Abóbora Menina foi resistente, o mesmo acontecendo com Maxixe liso e espinhudo. O isolado 1 de melancia mostrou-se mais virulento que os outros.

8. SUMMARY

The objective of this research was to study the effects of light and of nutrition on the sporulation of Mycosphaerella melonis.

The effects of fluorescent and of ultraviolet light on the sporulation of 10 isolates of M. melonis were investigated and it was observed that 4 of them reacted to both, 3 of them to fluorescent light only, and the other 3 to neither form of light.

Various nitrogen sources were used on one isolate, and it was observed that the nitrites, with the exception of NH_4NO_3 , had an effect similar to that of casein and peptone on the induction of pycnidium formation, under light as well as dark conditions. Perithecia, however, formed with these two sources of organic nitrogen under dark condition only.

The 4 levels of inorganic (NaNO_3) and organic nitrogen (casein), combined with 3 levels of dextrose were checked on one isolate of M. melonis. It was observed that the levels of 0,3 and 0,4 of nitrogen were more efficient in inducing sporulation, under light as well as dark conditions than were the other levels. The best dextrose level varied with the nitrogen source and the reproductive structure. Thus, for pycnidium formation, the best level of dextrose was 10 g, in the presence of NaNO_3 ; 5 g in the presence of casein and 15 g for perithecium formation.

The medium containing NaNO_3 and that containing casein behaved similarly or even better than V-8 juice, BDA and Czapek, on sporulation of the isolates 1 of watermelon, 136 of cucumber, and 557 of squash.

Of the different isolates checked in the experiments, it was observed that only isolate 1 formed perithecium in reasonable amounts when cultured in the absence of light in a casein and in a peptone containing medium.

In conducting pathogenicity tests, the isolates 1, 136, 557 and 582 were pathogenic to the following cucurbitaceae plants varieties, Watermelon: Florida Giant and Fairfax; melon: Casca de Carvalho; squash: Caserta; cucumber: Aodai, Marketer I-2205 and Verde Paulistano. Squash variety Menina was resistant, as well as maxixe smooth and thorny. The isolate 1 from watermelon was more virulent than the others.

9. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. BARNES, W.C. and W.M. EPPS. 1955. Progress in breeding cucumber resistant to anthracnose and downy mildew. Proc. Am. Soc. Hort Sci. 65:409-415.
2. BRASIL, 1970. Instituto Brasileiro de Estatística. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro. 771 pp.
3. BROWN, M.E. and T.F. PREECE. 1968. Examination of Cucumber seed for Mycosphaerella melonis. Pl. Path. 17:116-118.
4. CHIU, W.F. 1948. The pathogenicity of Mycosphaerella citrullina. Phytopathology 38:5.
5. CHIU, W.F. and J.C. WALKER. 1949. Morphology and variability of the cucurbit black rot fungus. J. Agr. Res. 78:81-102.
6. CHIU, W.F. and J.C. WALKER. 1949. Physiology and pathogenicity of the Cucurbit black-rot fungus. J. Agr. Res. 78:589-615.
7. CHUPP, C. and A.F. SHERF. 1960. Vegetable diseases and their control. 529 pp. New York. The Ronald Press. Co.
8. COCHRANE, V.W. 1958. Physiology of fungi. XIII + 524 pp. John Wiley and Sons, Inc., New York.
9. CURREN, T. 1969. Pectic and cellulolytic enzymes produced by Mycosphaerella citrullina and their relation to squash black-rot. Can. J. Bot. 47:791-794.
10. CURREN, T. 1969. The sporulation of two isolates of Mycosphaerella citrullina on agar media. Can. J. Bot. 47:2108-2109.

11. DAS GUPIA, A. and P.N. NANDI. 1957. Role of nitrogen concentration on production of perithecia in Penicillium vermiculatum Dawgeard. Natura. 179:429-430.
12. EPPS, W.M. 1956. GRUMMY stem blight and other diseases on cucurbits in South Carolina in the 1955 fall season. Plant Dis. Report 40: 439-440.
13. FIGUEIREDO, M.B. e ROSA M.G. CARDOSO. 1964. Ocorrência de Mycosphaerella melonis (Pass.) Chiu e Walker em culturas de melancia no Estado de São Paulo. O Biológico 30:324-325.
14. FIGUEIREDO, M.B., R.M.G. CARDOSO e J. ABRAHÃO. 1966. Perdas causadas pelo fungo Mycosphaerella melonis (Pass.) Chiu and Walker em abóboreira de moita. O Biológico 32:203-205.
15. FIGUEIREDO, M.B., R.M.G. CARDOSO, H.V. ARRUDA e N.T. MENDONÇA. 1968. Flor persistente de abóbora de moita Cucurbita sp. Fator de suscetibilidade à podridão do fruto causada por M. melonis (Pass.) Chiu and Walker. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 2: 204-205.
16. FLETCHER, J.T. and T.F. PREECE. 1966. Mycosphaerella stem rot of cucumber in the Lea Vallez. Ann. Appl. Biol. 58:423-430.
17. GALLI, F., H.TOKESHI, P.C.T.CARVALHO e col. 1968. Manual de Fitopatologia. IX + 640 pp. Ed. Agronômica CERES, São Paulo. Brasil.
18. GROSSENBACHER, J.G. 1909. A Mycosphaerella wilt of melons. Bull. Tech. Agr. Expt. Sta. N.Y. (Geneva), nº 9:193-229. illus.
19. HASIJA, S.K. 1970. Physiological studies of Alternaria citri and A. tenuis. Mycologia 62:289-295.
20. HAWKER, L.E. 1957. The physiology of reproduction in fungi. 128 pp. Cambridge, Cambridge University Press.

21. HAWKER, L.E. 1966. Physiology of reproduction. (In the fungi, Ainsworth and Sussman). XVI + 805 pp. New York and London. Academic Press.
22. JENKINS, Jr., S.F. 1962. Genetic, taxonomic, and physiologic studies of two *Glomerella* species pathogenic on Cucurbits. V + 45 pp., *tese de Ph.D.*, Raleigh, North Carolina State College.
23. KEILMAN, A., org. 1967. Sourcebook of laboratory exercises in plant pathology. San Francisco. Freeman. 387 p.
24. LEACH, C.M. 1962. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. Can. J. Bot. 40:151-161.
25. LEACH, C.M. 1962. The quantitative and qualitative relationship of ultraviolet and visible radiation to the induction of reproduction in *Ascochyta pisi*. Can. J. Bot. 40:1577-1602.
26. LEACH, C.M. 1963. The qualitative and quantitative relationship of monochromatic radiation to sexual and asexual reproduction of *Pleospora herbarum*. Mycologia 55:151-163.
27. LEACH, C.M. 1965. Detection of ultraviolet absorbing substances in living mycelium of fungi. Mycologia 57:291-300.
28. LILLY, V.G. and H.L. BARNETT. 1951. Physiology of the fungi. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
29. MATHUR, R.S., H.L. BARNETT, and V.G. LILLY. 1950. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in cultura. Phytopathology 40:104-114.
30. PIMENTEL GOMES, F. 1966. Curso de estatística experimental. 3ed. Piracicaba. 404 pp.
31. PRASARD, K. and J.D. NORTON. 1967. Inheritance of resistance to *Mycosphaerella citrullina* in muskmelon. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 91:396-400.

32. RANKIN, H.W. 1954. Effectiveness of seed treatment for controlling anthracnose and gummy-stem blight of watermelon. Phytopathology 44:675-680.
33. ROSS, R.G. 1961. The effect of certain elements, with emphasis on nitrogen, on the production of perithecia of Venturia inaequalis (Cke.) WINT. Can. J. Bot. 39:731-738.
34. SCHENCK, N.S. 1962. Mycosphaerella fruit rot of watermelons. Phytopathology 52:635-638.
35. SCHENCK, N.S. 1968. Incidence of airborne fungus spores over watermelon fields in Florida. Phytopathology 58:91-94.
36. SCHENCK, N.S. 1968. Epidemiology of Gummy Stem Blight Mycosphaerella citrullina on watermelon: Ascospore incidence and disease development. Phytopathology 58:1420-1422.
37. SITTERLY, W.R. 1968. A new symptom of gummy stem blight (Mycosphaerella melonis) on cucumber fruit. Plant Dis. Report. 52:49-51.
38. SITTERLY, W.R. 1969. Effect of crop rotation on cucumber gummy stem blight. Plant Dis. Report. 53:417-419.
39. SNEDECOR, G.W. 1948. Métodos de estadística. Buenos Aires, Acm. 558 p.
40. SOWELL, G. Jr. and G.R. POINTER, 1962. Gummy stem blight resistance of introduced watermelons. Plant Dis. Report. 46:883-885.
41. SOWELL, G. Jr., K. PRASARD, and J.D. NORTON. 1966. Resistance of Cucumis melo L. introductions to Mycosphaerella citrullina. Plant Dis. Report. 50:661-663.
42. TIMNICK, M.B., H.L. BARNETT, and V.G. LILLY. 1952. The effect of method of inoculation of media on sporulation of Melanconium fuligineum. Mycologia 44:141-149.

43. TUITTE, J.P. 1969. Plant pathological methods. Fungi and bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Company. 239 p.
44. WIANI, J.S. 1945. Mycosphaerella black rot of cucurbits. J. Agric. Res. 71:193-213.
45. ZAMBRANO, C.A., C.R. CAFATI e H. KIMATI. 1970. Estudio sobre el efecto de la luz y radiación ultravioleta-corta en el crecimiento y reproducción de Mycosphaerella melonis. Trabajo presentado en la Sociedad Brasileira de Fitopatologia. (no prelo).