

CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA, SEROLÓGICA E
FISIOLÓGICA DE *Colletotrichum gloeosporioides*
Penz. [Sensu Arx, 1957] f. sp. cepae n.c.

HENRY EVEN BAJUNGU
BSc. (Hons). Makerere University, Kampala

Orientador: Dr. 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.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Maio, 1979

Aos meus tios

ROBERT BURIMPIKARE e

EPHRAIM TINDYEBWA,

que sempre me incentivaram,

minha homenagem.

À minha mãe falecida,

ELENA BWERERE,

meu pai,

ERNESTI M. BAJUNGU,

irmãs e irmãos,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O Autor expressa seus agradecimentos às Instituições e pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, em especial as relacionadas a seguir:

Ao Prof. Dr. HIROSHI KIMATI, pela sugestão do assunto e valiosa orientação, e também pela amizade, interesse e incentivo, colaborando de forma decisiva para a minha formação científica.

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" que possibilitou a participação no Curso de Pós-Graduação e a realização do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. FERDINANDO GALLI, Chefe do Departamento de Fitopatologia, não somente pela amizade, interesse e incentivo, mas pela ajuda e conselho paternal durante os tempos difíceis, e também pela revisão dos originais e valiosas sugestões.

Ao Ministério das Relações Exteriores da República do Brasil pela concessão da Bolsa de Estudos fornecida para que fizesse este Curso no Brasil.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (C.N.Pq.), pela concessão da Bolsa de Estudos fornecida durante o Curso de Pós-Graduação.

Ao Pessoal da COSEAS, Universidade de São Paulo, pela ajuda, e pela minha aprendizagem da Língua Portuguesa, especialmente a Professora Dona ALICE, Professor ORLANDO MARQUES DE PAIVA.

Ao Prof. Dr. CYRO PAULINO DA COSTA, pelo fornecimento de sementes, e pela colaboração e estímulo durante o desenvolvimento desse trabalho e acima de tudo - amizade.

Ao Prof. Dr. ARMANDO BERGAMIN FILHO, pela amizade, sugestões valiosas e colaboração durante a realização desse trabalho, bem como na revisão dos originais.

Às famílias dos Senhores OVÍDIO MACHADO MENTEN e RUBENS FREDERICO GARLIP pela amizade a mim concedida durante minha estadia no Brasil.

Ao M.S. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN, Engº Florestal RUBENS CHRISTIANO DAMAS GARLIP, Dr. HONÓRIO ROBERTO DOS SANTOS, não somente como companheiros de moradia, mas por sua compreensão durante os períodos difíceis.

Aos Profs. Drs. JOSÉ ROBERTO FRANCO DA FONSECA (Chefe do Gabinete do Reitor da USP) e FERDINANDO MORÃO DE ALBUQUERQUE (Chefe da CODAC) pela amizade.

Aos professores, funcionários do Departamento de Fitopatologia e colegas do Curso de Pós-Graduação, pela amizade e colaboração.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. Patogenicidade de Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz e <i>Colletotrichum circinans</i> em Cebola	10
4.1.1. Inoculação de <i>Colletotrichum</i> spp em variedade Texas Grano 502 de cebola	12
4.1.2. Reação de 2 variedades da cebola aos isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum circinans</i>	12
4.2. Inoculação dos Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em Manga Variedade Bourbon	13
4.3. Efeitos da Temperatura sobre o Crescimento Linear dos Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> da Cebola e da Manga	13
4.4. Comparação Serológica dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> sp	14
4.5. A Reação dos Diferentes Isolados de <i>Colletotrichum</i> sp às Concentrações Diferentes do Ácido Pirocatecoico	15
5. RESULTADOS	17
5.1. Patogenicidade dos Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz e <i>Colletotrichum circinans</i> em Cebola	17
5.1.1. Inoculação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp em variedade Texa Grano 502.	17
5.1.2. Reação de 2 variedades da cebola aos 2 isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum d. circinans</i>	18

5.2. Inoculação dos Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em Manga Variedade Bourbon	19
5.3. Efeito da Temperatura sobre o Crescimento Linear dos Isolados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> da Cebola e da Manga	20
5.4. Resposta de Diferentes Isolados de <i>Colletotrichum</i> a Concentrações Crescentes do Ácido Pirocatecoico	22
5.5. Comparação Serológica dos Isolados de <i>Colletotrichum</i> spp	23
5.5.1. Testes Serológicos	23
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÕES	28
8. SUMMARY	29
9. LITERATURA CITADA	31

1. RESUMO

No presente trabalho, foi examinada a nomenclatura e posição taxonômica do agente causal do "Mal das Sete Voltas" na cebola. De acordo com os resultados obtidos foi considerado correto estabelecer a *forma especialis* de *Colletotrichum gloeosporioides* (Sensu, ARX 1957) f. sp. *cepae n.c.*

Seis isolados de *Colletotrichum* spp., sendo cinco de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Sensu ARX, 1957) e um de *Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans*, foram obtidos de diversos hospedeiros e localidades. Inoculações experimentais foram realizadas com suspensões de 1×10^5 conídios/ml em plântulas de 15 dias sob condições da casa de vegetação. 20 dias após a inoculação os sintomas foram bem estabelecidos nas plantas suscetíveis.

Inocularam-se 3 variedades de cebola (1 sendo pigmentada e 2 não pigmentadas). Nenhuma foi resistente ao isolado Cebola 1 que é o *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Sensu ARX, 1957) congênial da cebola. Isolado Cebola RS (*Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans*), também congênial da cebola, teve ação menos acentuada não causando a morte imediata das plantas.

O isolado Cebola 1 de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Sensu ARX, 1957) diferiu do isolado Manga 2 quanto ao crescimento in vitro a diferentes temperaturas e do isolado Cebola RS (*Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans*) pela quase total insensibilidade ao ácido pirocatecoico in vitro.

O teste serológico de dupla difusão mostrou diferenças entre os dois isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Sensu ARX, 1957) Penz. da cebola embora patogenicamente indistinguíveis. Os demais isolados mostraram-se patogênica e antigenicamente diferentes do isolado Cebola 1.

2. INTRODUÇÃO

A cebola é a segunda hortaliça de expressão econômica no Brasil. Entre os fatores limitantes da cultura de cebola convém ressaltar as doenças que constituem um problema de difícil controle quando as condições são favoráveis.

As doenças de cebola, Raiz rosada (*Pyrenochaeta terrestris*), *Alternaria porri*, *Botrytis cinerea* e Mildio (*Perenospóra destructor*) têm merecido maior atenção nas pesquisas. Entretanto ocorre no Brasil de maneira endêmica uma doença de cebola nas principais áreas de produção, que é tipicamente brasileira, e recebe a denominação vulgar de "Mal das Sete Voltas".

É uma doença de sintomas múltiplos tais como enrolamento e distorção foliar, lesões foliares, clorose, anomalias e apodrecimento de bulbos e mesmo "damping-off". Essa multiplicidade de sintomas tem trazido controvérsias com relação ao agente causal do "Mal das Sete Voltas".

Na controvérsia etiológica que se estabeleceu em torno dessa doença, um dos patógenos associados foi identificado como sendo *Colletotrichum gleosporioides* Penz. (Sensu Arx, 1957). Entretanto a delimitação dessa espécie nesse sentido amplo não indica se existe especialização fisiológica, que é um fator de grande importância epidemiológica.

O presente trabalho teve por objetivo principal provar a especialização fisiológica desse fungo, comparando com outros da mesma espé-

cie, porém de hospedeiros diferentes (*Colletotrichum* da manga e do morango). Comparações serológicas e fisiológicas foram feitas complementamente, visando mostrar que a especialização em patogenicidade é acompanhada por outras diferenças. Nessas comparações foi incluído *Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans* que é também um patógeno da cebola.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fungos do genero *Colletotrichum* foram relatados em cultura de cebola por vários pesquisadores. Particularmente no Brasil já em 1944, DESLANDES (1944) mencionava a ocorrência de três espécies distintas, provocando, respectivamente, a antracnose da cebola branca (*Colletotrichum circinans*), a mela das sementeiras e a antracnose das folhas. Infelizmente, esse pesquisador não fez a descrição do agente da mela das sementeiras ao nível de espécie e nem apresentou evidências de ter feito testes de patogenicidade; para a antracnose das folhas apenas mencionou o fato de ser o fungo semelhante ao *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides*, agente da Ramulose do algodoeiro, e distinto de *C. chardonianum* Nolla, agente da antracnose de folhas em Porto Rico.

Os livros textos norte-americanos sobre doenças de hortaliças ou só fazem referência à antracnose da cebola de bulbos brancos (WALKER, 1952) ou se referem também a outras espécies de *Colletotrichum* (como *C. chardoneanum* Nolla e *C. allii* Avena), porém sugerindo erradamente que sejam sinônimos de *C. circinans* (CHUPP e SHERF, 1960). Morfologicamente *Colletotrichum circinans* é distinto de *Colletotrichum chardonianum* e *Colletotrichum allii*, por ter conídios curvos (ARX, 1957). Segundo ARX (1957), *Colletotrichum chardonianum* e *Colletotrichum allii* são sinônimos de *Colletotrichum gleosporioides* Penz.

CAMPACCI (1962) foi o primeiro fitopatologista brasileiro a isolar e testar patogenicamente um isolado de *Colletotrichum* da cebola ,

conseguindo reproduzir os sintomas de uma doença, então denominada "Cachorro Quente"; que se manifestava em fase de sementeira, causando morte das mudinhas; e em fase adulta; provocando entre outros sintomas, enrolamento das folhas. Reisolados foram enviados a Charles Walker que os identificou como *Colletotrichum chardonianum* (CAMPACCI, 1962).

Na tentativa de elucidar o problema etiológico do "Mal das Sete Voltas" do Vale do São Francisco, AQUINO e WANDERLEY (1966) conseguiram reproduzir os sintomas de morte em mudinhas e de enrolamento das folhas com isolados de *Colletotrichum* sp. que, juntamente com um isolado de *Colletotrichum chardonianum* de CAMPACCI (1962), foi classificado na Holanda como sendo *Colletotrichum gleosporioides* Penz (AQUINO e WANDERLEY, 1966).

Não obstante ROBBS e RIBEIRO (1966) terem posto em dúvida a etiologia do "Mal das Sete Voltas", conseguindo reproduzir sintomas "típicos" dessa doença com isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, o fato é que o fungo *Colletotrichum gleosporioides* é, independentemente dessa controvérsia, um importante problema fitopatológico da cebolicultura nacional.

ARX (1957), em sua revisão taxonômica sobre fungos do gênero *Colletotrichum*, amalgamou mais de 600 espécies dentro de *Colletotrichum gleosporioides* Penz, admitindo algumas formas especializadas, como *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gossypii*, etc.

Esse conceito muito amplo da espécie, dando ênfase à morfologia, sob o ponto de vista epidemiológico, pode se tornar falho, porque não indica a especificidade de hospedeiros, fato muito comum entre os fungos, particularmente, os mais desenvolvidos. Assim é interessante demonstrar, através de testes de inoculação cruzada, que o *Colletotrichum gleosporioides* da cebola é o único que afeta a cultura da cebola e que não é capaz de afetar outras plantas como, por exemplo, a mangueira. ROBBS e RIBEIRO (1966) concluíram que a raça de *Colletotrichum gleosporioides* isolada da cebola é a mesma comumente encontrada em manga, baseando-se em inoculações de folha de mangueira em placas de Petri. Inoculações desse tipo são muito falhas e sem controle experimental.

A especialização fisiológica pode ser acompanhada por outras características diferenciais, como o demonstraram KIMATI (1975), trabalhando com *Colletotrichum graminicola* (Ces) Wilson (*Sensu*, ARX, 1957) de

cana-de-açúcar, milho e sorgo. Dentro da própria espécie *Colletotrichum gleosporioides* Penz (Sensu ARX, 1957) já havia relatos da utilização da reação à temperatura como critério de separação de espécies ou *formae specialis* (ff. sp.). Assim, EDGERTON (1915), trabalhando com 49 isolados de *Colletotrichum* de 22 hospedeiros do tipo *Colletotrichum gleosporioides* (Sensu ARX, 1957), classificou-os em 6 grupos distintos.

Do mesmo modo, SIMMONDS (1965), usando temperaturas de 15° a 36°C, conseguiu mostrar que há possibilidade de caracterizar os isolados de *Glomerella cingulata* var. *cingulata*, *Colletotrichum gleosporioides* var. *minor*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum orbiculare* e *Colletotrichum dematium*. Nesse contexto, caracterizar o *Colletotrichum* da cebola pelo seu crescimento em meio de cultura a diferentes temperaturas não só atinge essa finalidade taxonômica, mas também contribui para o seu melhor conhecimento, visto ser uma espécie pouco estudada, mais problemática nas condições do Brasil.

Outra possibilidade de caracterizar isolados de *Colletotrichum gleosporioides* da cebola dos da manga decorre do fato de o mecanismo de resistência de cebola à penetração de *Colletotrichum circinans*, baseada na presença de pirocatecol (WALKER, 1952), não operar contra *Colletotrichum gleosporioides* da cebola (MINUSSI, 1974; SILVA, 1976). Nessas circunstâncias, a sensibilidade de isolados da cebola ao pirocatecol, in vitro, pode ser menor do que os da mangueira; ademais, a inclusão de *Colletotrichum circinans* nessa comparação possibilitaria a comparação química in vitro do que se observa na prática.

No âmbito da serologia aplicada à Micologia fitopatológica, uma análise de alguns trabalhos mostra a utilidade da serologia na distinção taxonômica, não só ao nível de espécies (MUDHOSHING, 1964a), como também de *forma specialis* (TEMPEL, 1957, BUXTON, CULBRETH e ESPOTO, 1961, MORTON e DUKES, 1966).

Assim, citando apenas alguns exemplos, tem-se a comparação serológica de isolados de *Fomes roseus* e *Fomes subroseus* (MUDOSINGH, 1964), de 6 espécies heterotáticas de *Phytophthora* (MERZ, BURRELL e GALLECLY, 1969), de 8 espécies de *Ceratocystis* (AMOS e BURRELL, 1967), de 3 espécies de *Cronartium* (GOODING e POWERS, 1965).

KIMATI (1975) distinguiu serologicamente 3 isolados de *Colletotrichum* do sorgo, milho e cana-de-açúcar e afirmou que isolados de *Colletotrichum* do sorgo e do milho não são patogênicos à cana-de-açúcar e isolados de cana e sorgo não são patogênicos ao milho. Assim, esse mesmo autor estabeleceu que os 3 fungos podem ser vistos como formas especializadas da espécie *Colletotrichum graminicola*, conforme definida por ARX (1957) e dando validade à nomenclatura sugerida por MESSIAEN, LAFON e MOLOT (1959): *Colletotrichum graminicola* f. sp. *sacchari*, *C. graminicola* f. sp. *zcae* e *C. graminicola* f. sp. *sorghii*.

Em todos esses casos há uma dificuldade taxonômica do ponto de vista morfológico como acontece com os fungos do gênero *Colletotrichum* que interessam ao contexto da presente pesquisa.

4. MATERIAL 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" em Piracicaba, Estado de São Paulo, durante o ano de 1978/1979.

Isolados Utilizados

Utilizaram-se 5 isolados de *Colletotrichum gloesporioides* e 1 isolado de *Colletotrichum circinans* obtidos de hospedeiros diferentes com sintomas típicos de antracnose estes procedentes de várias regiões, principalmente do Estado de São Paulo (Tabela 1). Os isolados foram identificados e classificados de acordo com a classificação de ARX (1957).

Técnica de Isolamento

Com a finalidade de se obterem culturas puras do patógeno fizeram-se os isolamentos de conídios a partir de esporos que se formam em condições de umidades elevadas; a seguir com o auxílio de uma alça de platina transferiu-se uma parte desses conídios para o centro de uma placa de Petri com BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubou-se a 26°C sob luz contínua.

Eliminaram-se contaminações bacterianas por repicagem dos

bordos da colônia obtida de discos de micélio em meio de Ágar-Água. Micélios livres de contaminações forneceram conídios para nova suspensão, e, em água esterilizada plaquearam-se as suspensões diluídas em meio de farinha de aveia-ágar (60 g. de farinha de aveia, 12 g. de ágar, água q.s.p. 1,000 ml) (KIMATI, 1966; MENTEN, 1976). A partir desses conídios obtiveram-se isolados utilizados durante a pesquisa. Estes foram mantidos em tubos inclinados com BDA (Batata-Dextrose-Ágar) ou meio de farinha a temperatura de 5°+2°C.

TABELA 1. Isolados utilizados durante a execução do presente trabalho

Isolado	Hospedeiro	Procedência
Cebola 1	Cebola (<i>Allium cepa</i> L.), bulbo	Piracicaba - S.P.
Cebola R.S.	Cebola (<i>Allium cepa</i> L.), bulbo	Santa Maria - R.S.
IB248G	Cebola (<i>Allium cepa</i> L.), folha	Inst. Biol. - S.P.
Manga 2	Manga (<i>Mangifera indica</i> caule	Piracicaba - S.P.
Manga 3	Manga (<i>Mangifera indica</i> folha	Piracicaba - S.P.
Morango	Morango (<i>Fragaria vesca</i> L.) folha	Atibaia - S.P.

4.1. Patogenicidade de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz e *Colletotrichum circinans* em cebola

Preparo das Plântulas para Inoculação

As cebolas Texas Grano 502 (suscetível) e branco chata (resistente) (SILVER, 1976) a serem inoculadas, foram plantadas em vasos de alumínio com capacidade de 2,0 litros. O substrato para desenvolvimento das plântulas foi uma mistura bem homogeneizada de solo argiloso (Terra Roxa) peneirado, esterco de curral curtido painelado e areia grossa na proporção de 2:1:1, respectivamente. Esterilizou-se este substrato em autoclave a

127°C por 2 horas, empregando-se o mesmo após um período mínimo de 15 dias depois da esterilização.

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação a temperatura de 22°C a 33°C (média de 26°C) e umidade relativa de 70+10%, com irrigação diária.

Semearam-se densamente as populações a serem inoculadas e, após a emergência (cerca de 15 dias após a semeadura), desbastou-se deixando-se nos vasos de alumínio 20 plântulas mais vigorosas.

Preparo de Inóculo

Obteve-se o inóculo através da transferência asséptica de conídios de cada isolado purificado para placas de Petri com meio de farinha de aveia-ágar.

Esta transferência foi feita através de suspensões conidiais em água destilada estéril, pois existem observações de que este procedimento origina colônias com maior capacidade de esporulação (KIMATI, 1966).

As placas foram mantidas sob a luz contínua no Biotronette Mark III Environmental Chamber (Lab-Line Instrument, Inc.) a temperatura média de 26°C por 6-8 dias.

Os conídios foram suspensos em água destilada pela lavagem das placas com 30 ml de água contendo um espalhante (Tween 80 a 0,02%) (DUTTA et alii, 1960) com o auxílio de um pincel fino. Estas suspensões foram filtradas em gaze e algodão e suas concentrações determinadas através de diluições, ajustaram-se as suspensões para concentração dos 1×10^6 conídios/ml e inoculou-se logo a seguir (JENKINS JR. et alii, 1964; LITTREL e EPPS, 1965).

Método de Inoculação

As inoculações foram feitas no solo adotando-se o critério de aplicar 50 ml da suspensão de esporos por vaso contendo as variedades a serem testadas (SILVA, 1976). Logo após, os vasos foram inundados com água para maior espalhação do inóculo nos vasos.

Critérios de Avaliação da Reação dos Hospedeiros

A reação do hospedeiro foi avaliada pelo que convencionou-se de índice de sobrevivência, baseado no critério modificado de COSTA et alii (1964) para a doença Murcha Bacteriana do tomateiro. O índice de sobrevivência expressa o número sobrevivente das plantas em solo infestado com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum circinans*. Os resultados assim obtidos foram adequadamente analisados estatisticamente segundo metodologias de PIMENTEL GOMES (1966), GRANER (1966).

4.1.1. Inoculação de *Colletotrichum* spp em variedade Texas Grano 502 de cebola.

Os isolados e respectivas origens constam na Tabela 1. Para determinar a patogenicidade deles, utilizaram-se a variedade Texas Grano 502, esta sendo suscetível ao *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (SILVA, 1976).

O delineamento experimental foi de blocos completamente casualizados com cinco repetições além das testemunhas não inoculadas. Um bloco era representado por um vaso contendo 20 plântulas.

A semeadura foi feita em vasos de alumínio com capacidade de 2,0 litros. Para cada vaso utilizou-se 50 ml de suspensão de esporos de concentração 1×10^6 esporos/ml.

Antes da inoculação, quinze dias após a semeadura, procedeu-se a contagem das plantas. A avaliação da reação do hospedeiro e patogenicidade foi baseada no critério do índice de sobrevivência 20 dias após a inoculação adotando-se o critério de contagem de plantas vivas.

4.1.2. Reação de 2 variedades da cebola aos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum circinans*.

Neste ensaio, 2 variedades da cebola Branca Chata (susceptível) e Roxa Chata-Piracicaba, (resistente) foram inoculadas com os isolados de

Cebola 1, Manga 2, Manga 3, Morango. A concentração do inóculo utilizado foi de 1×10^6 conídios/ml (SILVA, 1976) e a inoculação foi realizada como no experimento 4.1.

O delineamento experimental foi um fatorial de 2×5 com 3 repetições, cada repetição representada por um vaso contendo 20 plantas. A avaliação foi feita adotando-se critério de contagem de plantas vivas como no experimento 4.1.

4.2. Inoculação dos Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em Manga Variedade Bourbon.

"Seedlings" a serem inoculados foram obtidos por germinação dos caroços da manga variedade Bourbon em vasos contendo o mesmo solo utilizado em 4.1.

As inoculações foram realizadas ao final da tarde (aproximadamente 17 horas) através da pulverização das suspensões conidiais (de cada isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* - 1 de cebola, 2 da manga, e 1 de morango), por meio de um pulverizador manual sobre os "seedlings" 1 mês após o plantio. Em seguida, os "seedlings" foram mantidos por 24 horas em câmara úmida (cobertas com sacos plásticos - umidade relativa próxima a 100%) e temperatura de 24° a 28°C . Após 24 horas de incubação os "seedlings" foram removidos e deixados em casa de vegetação a temperatura de 22° a 33°C (média 26°C) e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ (GOODE, 1958; LITRELL e EPPS, 1965; MENTEN, 1977), por um período de aproximadamente 30 dias, tempo suficiente para que os sintomas aparecessem e se desenvolvessem caso os isolados apresentassem patogenicidade.

4.3. Efeitos da Temperatura sobre o Crescimento Linear dos Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da Cebola e da Manga.

A inoculação das placas contendo BDA (Batata-Dextrose-Ágar) foi realizada por transferência de discos de micélio (5 mm diâmetro) de cultura do fungo em meio de BDA para o centro de cada placa de Petri. As

placas assim preparadas foram guardadas nas estufas sem iluminação interna reguladas às temperaturas de 12°, 18°, 21°, 25°, 28°, 30° e 35°C, até quando o crescimento do fungo em algumas placas de Petri atingiu o diâmetro das placas. As leituras referentes ao crescimento linear foram efetuadas em intervalos de 24 horas da medida de dois diâmetros das colônias perpendiculares (EDGERTON, 1915, SIMMONDS, 1965).

Assim o crescimento diário da colônia foi obtido tirando a média do aumento em diâmetro pelos 3 últimos dias. O crescimento das primeiras 24 horas não foi considerado (EDGERTON, 1915).

4.4. Comparação Serológica dos Isolados de *Colletotrichum* sp

Para obtenção de antisoro foi inoculado o antígeno de isolado Cebola 1 em coelho de raça Nova Zelândia de aproximadamente 3 kg. O antígeno foi uma suspensão de esporos, (de 2 semanas de idade) produzidos em meio de aveia sob condições de luz contínua, previamente lavados com água destilada e centrifugada (centrífuga Sorvall SS4, 10.000 r.p.m./10 minutos), alternadamente, por 2 vezes consecutivas. A suspensão dos esporos (aproximadamente 10^8 /ml) foi misturada em volume igual com adjuvante incompleto de Freund (DIFCO), seguindo-se as inoculações em número de 2/semana, por via intra-muscular na coxa. Essa mistura foi feita pouco antes da inoculação e, para isso, a suspensão dos esporos foi conservada em congelador. O volume do material inoculado variou de 1 a 2 ml por cada aplicação e, via de regra, foi feito em total de 20 aplicações.

Sangrias, além daquela para obtenção de soro normal feita antes da primeira inoculação, foi feita 2 vezes por semana, a partir da primeira semana após o início da inoculação. Para obtenção do soro, o sangue coagulado em condições de 5°C, por uma noite, foi centrifugado, como no caso de antígeno. Ao soro assim conseguido foi adicionado merthiolate (etilmercuritiosalicilato de sódio a 1% na proporção de 1/100 (V/V) e a sua conservação foi feita em congelador.

Antígenos para reações serológicas foram preparadas através da maceração de esporos produzidos em meio de aveia (cultura de 1 semana

de idade, sob condições da luz contínua). A maceração foi efetuada em almofariz, inicialmente sem e posteriormente com adição de areia (malha 40) lavada com ácido clorídrico. Os esporos foram previamente lavados e centrifugados, por 2 vezes consecutivas, como no caso de preparo de antígeno para inoculação.

Aos esporos macerados foram adicionados 10 a 20 ml de salina tamponada (NaCl , 0,85%; K_2HPO_4 - KH_2PO_4 0,01 M a pH 7,2), a concentração dessa suspensão correspondendo, aproximadamente, a 10 esporos/ml. Ao antígeno assim conseguido foi colocado merthiolate 1% na proporção de 1/100 (v/v) e a conservação foi feita em congelador. Quando se usou areia para maceração foi feita uma centrifugação prévia a 4000 r.p.m./10 minutos para sua separação.

Os antígenos usados nas comparações serológicas foram dos isolados Cebola RS, Manga 2, Manga 3, Morango IB248G, apresentados na Tabela 1.

Os testes serológicos foram feitos usando-se a técnica de dupla-difusão em gel-ágar de Ouchterlony, em lâminas. O meio gel constitui de 1% ágar (Ágar Difco); K_2HPO_4 - KH_2PO_4 0,0M a pH 7.2 e 0.0,1 de merthiolate. Essa metodologia se baseou nos trabalhos de GOODING e POWERS (1965), FIGUEIREDO (1972), KIMATI (1975) e MENTEN (1977). O esquema de distribuição de orifícios sobre o ágar foi o de um hexágono inscrito num círculo de 1,25 cm de diâmetro, tendo os orifícios um diâmetro aproximado de 0,25 cm.

A titulação de antissoro e de antígenos foi feita usando-se também a técnica de dupla difusão em ágar, procedendo-se a diluição em salina tamponada, por fatores de $2(2^{-n})$.

4.5. A Reação dos Diferentes Isolados de *Colletotrichum* sp. às Concentrações Diferentes do Ácido Pirocatecoico

Foi adotada a metodologia de CLARK e LORBEER (1974) para este ensaio. Por diluições seriais foram preparadas soluções estoques do ácido pirocatecoico de concentrações de 10, 100, 200, 400 e 800 p.p.m., respectivamente.

Essas concentrações foram adicionadas ao meio de cultura de BDA (Batata-Dextrose-Ágar) a 52°C depois da autoclavagem, assim obtendo as concentrações finais do ácido incorporadas ao meio de cultura. Aproximadamente 15 ml de cada uma das concentrações do meio de cultura foram adicionados em placas de Petri anteriormente esterilizadas. Houve 5 repetições para cada tratamento.

Discos de micélio (0,5 cm em diâmetro) de cada isolado de *Colletotrichum* com 3 dias de idade foram colocados no centro de cada placa de Petri e depois foram deixados numa sala nas condições ambientais.

As leituras referentes ao crescimento micelial linear em cada concentração foram obtidas utilizando a metodologia em 4.3.

5. RESULTADOS

5.1. Patogenicidade dos Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz e *Colletotrichum circinans* em Cebola5.1.1. Inoculação dos isolados de *Colletotrichum* spp em variedade Texa Grano 502.TABELA 2: Teste de patogenicidade de *Colletotrichum* spp na variedade Texan Grano 502.

	Índice ⁽²⁾ de Doença ⁽¹⁾		
	Sobrevivência	Nº das folhas verdes (1) (3)	
		X	X+0,5
Cebola 1	2,40	9,67	1,93 ^a
Cebola RS	20,00	29,31	5,86 ^b
Morango	20,00	41,55	8,31 ^c
Manga 2	20,00	43,65	8,73 ^c
Manga 3	20,00	41,79	8,35 ^c
Testemunha	20,00	43,09	8,61 ^c

(1) Avaliação aos 20 dias após a inoculação; (2) Média de 5 repetições cada uma representada por um vaso com 20 seedlings originais; (3) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 1% (Tukey) C.V. = 7.8442

Neste experimento nota-se que somente os isolados da cebola atacou as cebolas, porque são parasitas congêniais. Portanto nota-se que isolado Cebola 1 foi mais patogênico seguido por isolado Cebola RS.

5.1.2. Reação de 2 variedades da cebola aos 2 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum d. circinans*.

Os resultados deste experimento são apresentados na Tabela 3

TABELA 3. Teste de patogenicidade de *Colletotrichum* spp em 2 variedades de cebola.

Isolados	Índice da Doença(1) nas Variedades					
	Texas Grano 502 Roxa Chata Piracicaba				Média	
	Sobrevivência(2)	Enfolhamento(3)	Sobrevivência(2)	Enfolhamento(3)	Sobrevivência(2)	Enfolhamento(3)
Cebola 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cebola RS	19,00	14,33	20,00	21,00	20,00	17,66 ^a
Manga 2	20,00	24,33	20,00	34,33	20,00	29,33 ^b
Manga 3	20,00	20,33	20,00	32,00	20,00	26,16 ^b
Morango	20,00	26,66	20,00	37,66	20,00	30,16 ^b
Testemunha	20,00	26,00	20,00	39,00	20,00	32,50 ^b

(1) Baseada na sobrevivência e no enfolhamento (= nº de folhas verdes) das plantas sobreviventes; (2) Média de 3 repetições cada uma representada por 20 plantas por vaso ou enfolhamento (= nº das folhas verdes) das plantas sobreviventes; (3) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 1% (Test Tukey). C.V. = 11,67.

Neste experimento isolados Cebola 1 e Cebola RS causaram índice maior da doença em termos de sobrevivência e enfolhamento. Como em 5.1 isolados Cebola 1 e Cebola RS diferiram-se dos outros estatisticamente

5.2. Inoculação dos Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em Manga Variedade Bourbon

TABELA 4. Reação da variedade Bourbon de manga às inoculações de *Colletotrichum* spp

Isolado	Reação (1)
Cebola 1	-
Cebola RS	-
IB248G	-
Manga 2	+
Manga 3	+
Morango	-
Testemunha	-

(1) Observada em 2 "seedlings" inoculados/isolado

- Sem sintomas

+ Com sintomas

Os resultados da Tabela 4 mostram que dos 9 isolados provenientes de diferentes hospedeiros e localidades, somente os isolados congêneros da manga produziram sintomas nos "seedlings" do hospedeiro com eles inoculadas.

Esses sintomas se manifestaram na forma de necrose dos bordos das folhas em geral, somente 30 dias após a inoculação.

5.3: Efeito da Temperatura sobre o Crescimento Linear dos Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da cebola e da manga

TABELA 5. Efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento dos isolados de *Colletotrichum* spp

Temperaturas °C	Taxa Média(1) (em cm) da Colônia do Isolado							
	Isolado Cebola 1				Isolado Manga 2			
	Período de Incubação (Dias)				Período de Incubação (Dias)			
	2	3	4	Média(2)	2	3	4	Média(2)
12	0,62	0,71	0,41	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00
18	1,19	0,47	0,35	0,67	1,04	2,34	1,11	1,50
21	0,57	0,63	0,21	0,47	1,50	2,94	1,46	1,97
25	1,36	1,94	0,25	1,18	1,41	2,98	3,42	2,60
28	0,92	1,12	0,20	0,75	1,42	3,05	3,70	2,72
30	0,04	1,60	0,48	0,71	0,60	0,40	0,44	0,48
35	0,36	0,72	0,19	0,42	0,36	0,19	0,25	0,27

(1) Taxas de 5 repetições/tratamento, cada uma representada por uma placa. Medidas baseadas em diâmetro da colônia menos o diâmetro do inóculo semeada; (2) Médias de (1) para 3 dias.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que o isolado Cebola 1 teve maior taxa de crescimento a 28°C enquanto que o isolado da manga 2 teve maior taxa de crescimento a 25°C. Isolado Cebola 1 mostrou maior taxa de crescimento às temperaturas baixas e altas enquanto que foi o contrário para isolado manga 2 especialmente às temperaturas baixas. Os mesmos resultados constam no gráfico 1.

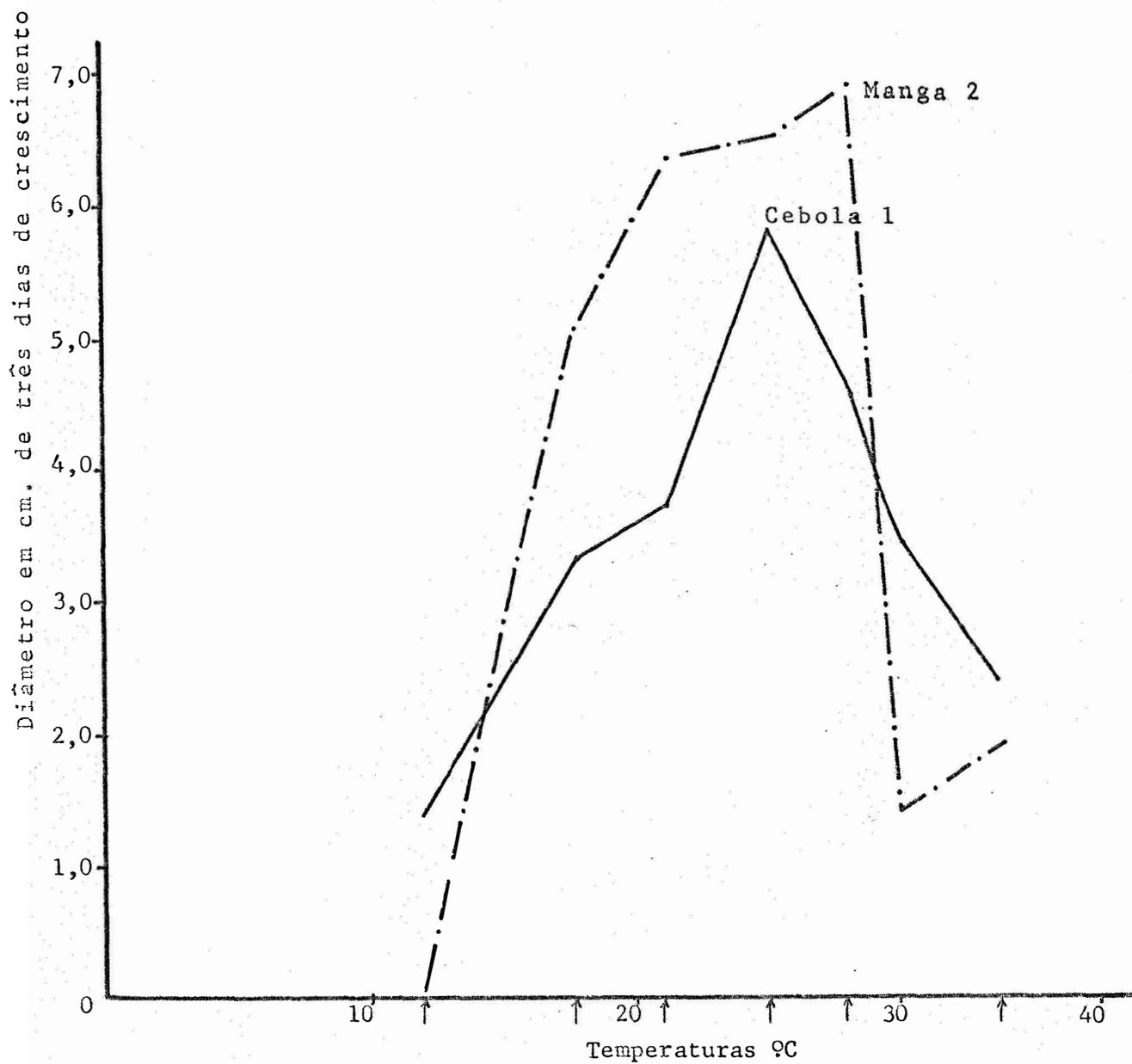


Gráfico 1 - Efeito da temperatura sobre o crescimento linear dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da Cebola e da Manga.

5.4. Comparação Serológica dos Isolados de *Colletotrichum* spp

5.4.1. Testes Serológicos.

Testes de dupla difusão em ágar realizados com soros obtidos na primeira sangria (SN) e nas sete subsequentes (AS-1 a AS-7) contra antígenos homólogos a 25°C, mostraram os resultados expressos na Tabela 7.

TABELA 7. Reações serológicas entre SN, AS-1, AS-2, AS-3, AS-4, AS-5, AS-6 e AS-7 do coelho imunizado com o isolado Cebola 1 e seu antígeno e dos isolados Cebola RS, Manga 2, Manga 3, Morango, e IB248G.

Período de Incubação (dias)	Código de Soro	Reação(a) dos Soros aos Antígenos				
		Cebola 1	Cebola RS	Manga 2	Manga 3	Morango
0	SN	-	-	-	-	-
14	AS-1	+	-	-	-	-
21	AS-2	+	-	-	-	-
28	AS-3	+	-	-	-	-
35	AS-4	+	-	-	-	-
42	AS-5	+	-	-	-	-
49	AS-6	+	-	-	-	-
56	AS-7	+	-	-	-	-

(a) +: Presença de linhas de precipitação

-: Ausência de linhas de precipitação

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que houve reação somente com antissoro homólogo. Verificou-se também que o coelho era imunizado 14 dias após a aplicação da primeira injeção.

5.5. Resposta de Diferentes Isolados de *Colletotrichum* a Concentrações Crescentes do Ácido Pirocatecoico.

TABELA 6. Resposta de Diferentes Isolados de *Colletotrichum* a Concentrações Crescentes do Ácido Pirocatecoico.

Isolado	Diâmetro médio (1) da colônia (em cm) nas concentrações, em ppm do ácido pirocatecoico indicadas				
	0	100	200	400	800
Cebola 1	2,80	3,00	2,64	2,99	2,78
Cebola RS	2,68	3,45	0,00	0,00	0,00
Manga 2	5,13	4,68	3,38	3,01	0,00
Manga 3	6,14	7,20	5,08	4,58	3,48
Morango	4,42	4,18	2,28	3,68	1,98

(1) Média de 4 repetições, cada repetição representada por 1 placa de Petri; crescimento ao fim de 4 dias de incubação em estufa a 28°C.

Os resultados deste experimento mostram que somente isolado Cebola RS foi o único que não conseguiu crescer a concentração acima de 200 ppm. Isolado Manga 3 cresceu melhor em todas as concentrações exceto 800 ppm. (Tabela 6).

6. DISCUSSÃO

Um dos conceitos taxonômicos aplicados na classificação de fungos do gênero *Fusarium* é de que somente caracteres morfológicos devem ser usados para se delimitar espécies e todas categorias superiores (SNYDER e TOUSSON, 1965). Apesar de hoje ainda a taxonomia de *Fusarium* comportar opiniões diferentes (TOUSSON e NELSON, 1975; BOOTH, 1975), está claro que ARX (1957) ao estudar o gênero *Colletotrichum* tentou basear-se naquele conceito, desenvolvido por SNYDER e HANSEN (1940, 1941 e 1945). Assim baseando-se na forma e tamanho dos conídios, ARX (1957) escolheu para a fase imperfeita de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. o nome *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. colocando em sinonímia mais de 600 espécies anteriormente descritas. Dentro dessa espécie morfológica admitia especializações fisiológicas; porém não seguiu a nomenclatura de indicar *formae specialis* como o fizeram SNYDER e HANSEN (1940) com as formas especializadas de *Fusarium oxysporum*. Trabalhos taxonômicos sobre formas especializadas de *Colletotrichum gloeosporioides*, levados a efeito mais recentemente, mostram uma tendência de se adotar o conceito amplo da espécie segundo ARX e a nomenclatura de *formae specialis*. Assim KIMATI (1970), ao descrever a forma peritecial do agente da antracnose do feijoeiro denominou-o *Glomerella cingulata* (Stonem.) v. Spauld f. sp. *phaseoli*. Também, MENTEN (1977), no seu trabalho sobre o agente causal da antracnose das cucurbitáceas, reconhecido como uma forma especializada, mas morfológicamente indistinguível da espécie básica *Colletotrichum gloeosporioides*, sugeriu ter sua nomenclatura alterada para *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae* (Berk et Mont.) n. comb.

Estendendo-se este ponto de vista para as demais formas de *Colletotrichum gloeosporioides* especializadas sobre determinados grupos de hospedeiros, MENTEN (1977) sugeriu que sejam chamados de *Colletotrichum gloeosporioides* ff. spp. *phaseoli*, *malvarum*, *musae*, etc., em substituição as espécies *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum malvarum*, *Colletotrichum musae*, etc., respectivamente; *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. incluiria os patógenos polífagos e os saprófitas com características morfológicas coerentes com as delimitações da espécie proposta por ARX (1957).

SINGH, PRASAD e MATHUR (1966), fazendo um estudo taxonômico do fungo da antracnose de *Dioscorea alata* L., denominaram-no *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *alatae*; e MENTEN (1977), ao estudar a morfologia, patogenicidade e serologia de isolados do *Colletotrichum* de cucurbitáceas, denominou-os *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae*, ao mesmo tempo que sugeriu a conveniência de se estender essa nomenclatura trinomial a outras formas especializadas.

Nesse contexto os resultados dos ensaios de inoculação, mostrando que somente isolado congênial de *Colletotrichum gloeosporioides* afeta as três variedades de cebola, justifica sugerir aqui a nomenclatura de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae*. Inoculações dos mesmos isolados em manga, mostrando também que somente isolados congêniais conseguem provocar sintomas em manga, reforçam a sugestão acima mencionada ao mesmo tempo que refutam a afirmação de ROBBS e RIBEIRO (1966) de que o *Colletotrichum gloeosporioides* da cebola é o mesmo que ocorre na manga. A propósito das inoculações efetuadas por ROBBS e RIBEIRO (1966) em folhas destacadas, in vitro, cumpre lembrar que já há muito tempo SHEAR e WOOD (1907), analisando inoculações cruzadas com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de diferentes hospedeiros, comentavam: inoculações artificiais introduzindo conídios no tecido do hospedeiro ou aplicando-se na superfície de frutos maduros não são conclusivas; o único teste conclusivo é aquele feito por cuidadosos experimentos de infecção usando plantas vivas, em desenvolvimento (como empregadas nos presentes experimentos de inoculação cruzada). Uma folha destacada pode ser vista simplesmente como um meio de cultura e o fato de que esses organismos podem crescer sobre ela não prova que cresceria sobre a planta como um parasita.

A distinção patogênica de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae* com relação ao *Colletotrichum gloeosporioides* da manga é acompanhada pela diferença de crescimento em diferentes temperaturas (Tabela 5). Essa característica, já utilizada anteriormente por EDGERTON (1915) e por SIMMONDS (1965), na distinção taxonômica de espécies de *Colletotrichum*, outros isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a essa temperatura, crescem melhor que o isolado da cebola.

Sob o ponto de vista serológico, os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da manga são distintos de *Colletotrichum gloeosporioides* da cebola. Entretanto, como um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênico à cebola também não reagiu serologicamente com o antissoro, há necessidade de mais estudos para se comprovar em que nível taxonômico é válido o critério serológico. Vale lembrar que DESLANDES (1944) já citava vários tipos de Antracnose em cebola, além da Antracnose de cebola branca.

O *Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans* (Berk) v. Arx, agente da Antracnose da cebola branca ("Onion Smudge"), é um fungo morfológicamente bem distinto de *Colletotrichum gloeosporioides*, apesar da confusão de CHUPP e SHERF (1960) que colocam *Colletotrichum chardoniana* Nolla e *Colletotrichum allii* como seus sinônimos. Esses dois últimos fungos são considerados por ARX (1957) sinônimos de *Colletotrichum gloeosporioides*. A diferença morfológica é acompanhada na capacidade patogênica pois *Colletotrichum dematium circinans*, em inoculações de "seedlings", provoca sintomas muito menos drásticos do que *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae*, não causando morte imediata das plantas inoculadas, nem mesmo de cebola branca, o que pode ser comprovado nas Tabelas 2 e 3. Entretanto, diferindo de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* não congêniais, *Colletotrichum dematium circinans* causa acentuado subdesenvolvimento das plantas, quando inoculadas em fase de "seedlings" mesmo de variedade pigmentadas como Texas Grano 502 e Roxa Chata (Tabela 2 e 3), fato que, aparentemente, não está descrito na literatura consultada.

Com efeito, segundo CHUPP e SHERF (1960), WALKER (1952), os sintomas de *Colletotrichum dermatium circinans* se circunscrevem às escamas, porções inferiores, sem pigmento, das folhas. Sendo o isolado de *Colletotrichum dermatium circinans*, utilizado no presente trabalho, proveniente do Rio Grande do Sul, onde, como em todo Brasil, predomina o cultivo de cebolas coloridas, os resultados experimentais podem ter alguma conexão com a importância real do problema nas condições de campo. Segundo ELOCY MINUSI (comunicação pessoal) *Colletotrichum dermatium circinans* tem sido isolado com frequência de material de cebola colorido, no Estado de Rio Grande do Sul.

O fato já comprovado de que a resistência a *Colletotrichum gloeosporioides* da cebola não está correlacionada com a cor da cebola, contrariamente a que acontece no caso da resistência a *Colletotrichum dermatium circinans* (SILVA, 1976), encontra nos resultados do presente trabalho (Tabela 6) evidências que o apoiam quimicamente. O mecanismo de resistência da cebola a *Colletotrichum gloeosporioides* não pode ser devida à presença de ácido pirocatecoico, como no caso da resistência a *Colletotrichum dermatium circinans* (WALKER, 1952), de vez que o fungo se mostra praticamente insensível mesmo a alta dosagem de 800 ppm (Tabela 6).

7. CONCLUSÕES

Do presente trabalho, pode-se tirar as conclusões seguintes:

1. Apenas isolados congêniais de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (sensu ARX, 1957) da cebola conseguem causar doença em cebola, pelo que se lhes sugere a denominação *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *ce-pae*.
2. Isolados dessa forma especializada podem ser distinguidas de isolados da manga por suas características patogênicas e de crescimento em diferentes temperaturas.
3. A validade da serologia para caracterizar isolados especializados da cebola precisa ser determinada com mais estudos.
4. O ácido pirocatecoico responsável pela resistência das cebolas coloridas a *Colletotrichum dematium circinans* é altamente fungitóxico a esse fungo mas não a nenhum dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* testados.

8. SUMMARY

In this work the nomenclature and taxonomic position of the causal agent of onion disease locally known as "Mal das Sete Voltas" in Brazil was studied. According to the results obtained herein, it was considered proper to establish a *forma specialis* of *Colletotrichum gloeosporioides* (Sensu ARX, 1957) f. sp. *cepae* n.c.

Six isolates of *Colletotrichum* spp. five of which were *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and one *Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans* were obtained from different hosts growing in different regions.

Experimental inoculations were effected using a conidial suspension of 1×10^6 conidia/ml in onion seedlings aged 15 days planted in a greenhouse. 20 days after the inoculation the symptoms were always well established in susceptible plants.

3 onion varieties were used during the inoculation, 2 were pigmented and 1 had no pigment at all. None of the 3 was resistant to isolate Cebola 1 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Sensu ARX, 1957), a congenial isolate of onion. Isolate Cebola R.S. (*Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans*), another congenial isolate of onion, did not show a pronounced effect on onion plants; it did not provoke an immediate death of plants inoculated with it.

Isolate Cebola 1 differed from isolate Manga 2 (also a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz) in its "in vitro" growth at different temperatures and also was different from isolate Cebola R.S. for its almost.

insensitivity to Pyrocatechoic acid "in vitro".

The serological test of double diffusion in agar showed that the 2 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Sensu ARX, 1957) Penz were different antigenically although they could not be distinguished pathogenically. The rest were both pathogenically and antigenically different from isolate Cebola 1.

9. LITERATURA CITADA

AMOS, R.E. e R.G. BURREL, 1967. Serological Differentiation in *Ceratocystis*. *Phytopathology* 57:32-34.

ARQUINO, M. de L.N. e L.G.G. WANDERLEY, 1966. O 'Mal das Sete Voltas' nos cebolais do São Francisco. Boletim Técnico nº 16, Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco.

ARX, J.A. von, 1957. Die Arten der Grattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathology*, 29:413-468.

BOOTH, C., 1975. The present status of *Fusarium* taxonomy. *Ann. Rev. Phytopath.* 13:83-93.

BUXTON, E.W.; W. CULBRETH e R.G. ESPOTO, 1961. Serological separation of forms and physiological races of pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 51:575 (abstr.).

CLARK, C.A. e J.W. LORBEER, 1974. The role of Phenols in *Botrytis* Brown Stain of Onions. *Phytopathology*, 65:338-341.

- CAMPACCI, C.A. 1961. Notas sobre o "Cachorro Quente" da cebola. Oleri - cultura, Viçosa 1:61-64.
- CHUPP, C. e A.F. SHERF, 1960. Vegetable Diseases and Their Control. The Ronald Press Co. New York. 693 p.
- COSTA, C.P. da: F.T. FERNANDES e J.N. SILVA. 1974. Resistência de cebola (*Allium cepae* L.) ao "Mal das Sete Voltas" (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz). IN: Relatório Científico do Departamento e Instituto de Genética. Piracicaba, 8:54-57.
- DESLANDES, J.A., 1944. Doenças da cebola. Serviço de Informação Agrícola. Ministério da Agricultura (Seção de Investigações Fitossanitárias 19). Rio de Janeiro.
- DUTTA, S.K., C.V. HALL e E.G. HEYNE, 1960b. Observation of the Physiological races of *Colletotrichum lagenarium*. Bot. Graz., 121:163-166
- EDGERTON, C.W., 1915. Effect of Temperature on *Glomerella*. Phytopathology, 5:670-674.
- FIGUEIREDO, M.B., 1972. Estudos fisiológicos e serológicos sobre o fungo *Ascochyta phaseolorum* Sacc. e sobre a doença por ele causada em berinjela (*Solanum melongena* L.) e em outras plantas cultivadas, 130 pp. (mimeografado). Tese de Doutorado, Piracicaba, ESALQ-SP.
- GOODING, G.V. e H.R. POWERS, 1965. Serological comparison of *Cronartium fusiforme*, *C. quercum* and *C. ribicola* by Immuno-diffusion tests. Phytopathology, 55:670-674.
- GOODE, M.J., 1958. Physiological specialization in *Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology, 48:79-83.
- GRANER, E.A., 1966. Estatística, Biblioteca Agronômica Melhoramento, 184 p.

- JENKINS JR.; S.F., N.N. WINSTEAD e C.L. Mc COMBS, 1964. Pathogenic comparisons of three new and four previously described races of *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*. Plant Disease Reporter, 48:619-622.
- KIMATI, H., 1966. Algumas raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., 1888 que ocorrem no Estado de São Paulo. Tese apresentada para obtenção de Grau de Magister Scientiae. Piracicaba, ESALQ-USP (Mimeografado).
- KIMATI, H., 1970. *Glomerella cingulata* (STONEM) Spauld et V. Shrenk. f. sp. *phaseoli* n.f.; fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. Tese de Doutorado, Piracicaba.
- KIMATI, H., 1975. Taxonomia, Esporulação e Patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces) Wils. (Sensu) ARX 1957. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP para Concurso de Livre-Docência (Mimeografada).
- LITTREL, R.H. e W.M. EPPS, 1965. Standardization of a procedure for artificial inoculation of Cucumber with *Colletotrichum lagenarium*. Plant Disease Reporter, 49:649-653.
- MENTEN, J.O.M., 1977. Morfologia, Patogenicidade e Serologia de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae* (Berk. et Mont.) N. COMB. e resistência em melancia (*Citrullus vulgaris* SHRAD.) e pepino (*Cucumis sativus* L.). Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" para obtenção de título de Mestre em Fitopatologia (mimeografado).
- MERZ, W.G.; R.G. BURREL e M.E. GALLEGLY, 1969. A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. Phytopathology 59:367 - 370.
- MESSIAEN, C.M.; R. LAFON e P. MOLOT, 1959. Richesse em sucre de tiges de mais et verse parasitaire. Rev. Path et Entom. Agric., 36:209-213.

- MINUSSI, E., 1974. Ocorrência do "Mal das Sete Voltas" (*Colletotrichum circinans* (Berk.) Vogl.) em cultura de cebolas (*Allium cepa* L.) coloridas. Rev. de Olericultura, Santa Maria, 16:124 p.
- MORTON, D.J. e P.D. DUKES, 1966. serological differentiation of race 1 from race 2 of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Plant Disease Reporter 50:444-445.
- PIMENTEL GOMES, F., 1966. Curso de Estatística Experimental. 3a. Edição Piracicaba, 404 p.
- ROBBS, C.F. e R. de L. DUARTE RIBEIRO, 1966. Estudos preliminares sobre o "Mal das Sete Voltas" da cebola (*Allium cepa* L.) no Vale do São Francisco. Rev. Olericultura 6:106-115.
- SHEAR, C.L. e A.K. WOOD, 1907. Ascogenous forms of *Gloeosporium* and *Colletotrichum*. Botan. Graz. 43:259-266.
- SILVA, N. da, 1976. Resistência em cebola (*Allium cepa* L.) a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Sensu ARX, 1957). Piracicaba, ESALQ-USP. 1976. (Tese de Mestrado).
- SIMMONDS, J.H., 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rot in Queensland. Division of Plant Industry Bulletin. n° 329. Queensland Department of Primary Industries.
- SINGH, R.D., N. PRASAD e L. MATHUR, 1966. On the Taxonomy of the Fungus Causing Anthracnose of *Dioscorea alata* L. Indian Phytopathology, Vol. XIX pp. 65-71.

- SNYDER, W.C. e H.N. HANSEN, 1940. The species concept in *Fusarium*. Am. J. Botany, 27:64-67.
- SNYDER, W.C. e H.N. HANSEN, 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. Am. J. Bot. 28:738-742.
- SNYDER, W.C. e H.N. HANSEN, 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. Am. J. Bot. 32:657-666.
- SNYDER, W.C. e T.A. TOUSSON. 1965. Current Status of Taxonomy in *Fusarium* species and their perfect stage. Phytopathology, 55:833-837.
- TOUSSON, T.A. e P.E. NELSON, 1975. Variation and speciation in the *Fusaria*. Ann. Rev. Phytopath. 13:71-82.
- WALKER, J.C., 1952., *Diseases of Vegetable Crops*. McGraw Hill Book Company Inc., New York, pp. 225-262.