

DOUGLAS LAU

**CARACTERÍSTICAS CULTURAIS E PATOGENICIDADE DE DIFERENTES
ISOLADOS DE *Cylindrocladium spathulatum*, OBTIDOS A PARTIR DE FOLHAS
DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* (St.Hil.) NO ESTADO DO PARANÁ**

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas como
parte das exigências para conclusão do
Bacharelado em Ciências Biológicas na
Área de Microbiologia - Estágio em
Patologia Básica .

Orientadores: Ida Chapaval Pimentel

Albino Grigoletti Jr.

Co-orientador: Celso Garcia Auer

CURITIBA

1997

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	02
3. MATERIAIS E MÉTODOS	05
3.1 Hospedeiro.....	05
3.2 Obtenção de diferentes isolados.....	05
3.3 Colônias monospóricas e conservação dos isolados.....	05
3.4 Influência do meio de cultura no crescimento e esporulação dos isolados.....	06
3.5 Análise de características morfológicas dos cinco isolados.....	07
3.6 Padronização de métodos de inoculação.....	07
3.7 Testes de patogenicidade e virulência dos cinco isolados em <i>Ilex paraguariensis</i> cultivada	08
3.8 Avaliação da patogenicidade de <i>Cylindrocladium spathulatum</i> a outras espécies florestais.....	09
4. RESULTADOS	
4.1 Colônias monospóricas	10
4.2 Influência do meio de cultura no crescimento e esporulação dos isolados.....	10
4.3 Análise de características morfológicas dos cinco isolados.....	15
4.4 Padronização dos métodos de inoculação.....	19
4.5 Testes de patogenicidade e virulência dos cinco isolados em <i>Ilex paraguariensis</i> cultivada	22
4.6 Avaliação da patogenicidade de <i>Cylindrocladium spathulatum</i> a outras espécies florestais.....	25
5. DISCUSSÃO.....	27

6. CONCLUSÕES.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 4.2.1** – Efeito do meio de cultura e regime de luminosidade no crescimento da colônia de *Cylindrocladium spathulatum*, isolado Colombo, após 7 dias de incubação.....11
- Fig.4.2.2** –Médias de crescimento da colônia de isolados de *C. spathulatum* em diferentes meios de cultura, após 7 dias de incubação.....12
- Fig.4.2.3** – Efeito do meio de cultura na morfologia da colônia de isolados de *C. spathulatum*:A) chimarrão dextrose-ágar (CHDA); B) batata-dextrose-ágar (BDA); C) folha de erva-mate-dextrose-ágar (EMDA); aveia-dextrose-ágar (AVDA); malte-ágar (MALTE).....14
- Fig.4.2.4** – Efeito do meio de cultura na esporulação de isolados de *C. spathulatum*, após 20 dias de incubação.....13
- Fig.4.3.1** – Comportamento do coeficiente de variação do comprimento de conídios em função do número amostrado. Conídios de *C. spathulatum*, isolado Colombo, retirados de folha destacada após 12 dias da inoculação.....15
- Fig.4.3.2** – Comparação do comprimento de conídios dos cinco isolados de *C. spathulatum*. Conídios retirados de folha destacada, após 12 dias da inoculação.....16
- Fig. 4.3.3** – Comparação da largura de conídios dos cinco isolados de *C. spathulatum*. Conídios retirados de folha destacada, após 12 dias da inoculação.....17
- Fig. 4.3.4** – Vesículas (A-E): A) Colombo, B) SMP, C) GPP, D) Ivaí, E) Nobre; Conídios (F-G) seta indicando tubo germinativo; Microcultura (H) com 8 dias, seta indicando conidióforo. Barra=10 µm (A-G).....18
- Fig. 4.4.1** – Efeito da concentração do inóculo no diâmetro da lesão de folhas destacadas inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo, após 5 dias de incubação.....19
- Fig.4.4.2** – Efeito da concentração do inóculo na frequência de sintomas em mudas de erva-mate inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo, após 5 dias de incubação.....20
- Fig. 4.4.3** – Frequência de sintomas em folhas de mudas de erva-mate em diferentes estádios de desenvolvimento inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo, após 5 dias de incubação.....20
- Fig. 4.4.4** – A) Classificação dos sintomas em folhas de erva-mate inoculadas com *C. spathulatum*, B) Aspecto de mudas inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo em teste de concentração de inóculo.....21
- Fig.4.5.1** - A) Ensaio em folhas destacadas de *Ilex paraguariensis* inoculadas com cinco isolados de *C. spathulatum*. B) Mudas de *Ilex paraguariensis* em três diferentes estádios de desenvolvimento, inoculadas com cinco isolados de *C. spathulatum*.....24

- Fig. 4.5.2** – Variação no tamanho da lesão formada em folhas de erva-mate destacadas, inoculadas com diferentes isolados de *C. spathulatum*, após 5 dias de incubação.....22
- Fig. 4.5.3** – Frequência do aparecimento de sintomas de mancha foliar em mudas de erva-mate em três estádios de desenvolvimento inoculadas com cinco isolados de *C. spathulatum*.....23
- Fig. 4.5.4** – Frequência das classes de sintomas em mudas de erva-mate em três diferentes estádios de desenvolvimento, inoculadas com cinco isolados de *C. spathulatum*, após 5 dias de incubação.....25
- Fig 4.6.1** – Frequência de sintomas de mancha foliar em folha destacada de espécies de *Ilex* e *Eucalyptus*, inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo, após 12 dias de incubação.....26
- Fig.5.** – A)face adaxial de folha de *Ilex paraguariensis*; B) face abaxial de folha de *Ilex paraguariensis*, seta indicando estômato; C) inoculação de *C. spathulatum* com disco de papel filtro em folhas de *Ilex paraguariensis* destacadas. Seta indica ponto de inoculação. D) microesclerócio de *C. spathulatum*. Barra=10 μ m.....32

RESUMO

Neste trabalho foram levantadas informações a respeito do patógeno *Cylindrocladium spathulatum*, causador da pinta-preta em folhas de erva-mate. Os estudos foram realizados a partir de isolados monospóricos coletados em cinco regiões do estado do Paraná: Colombo, São Mateus, Guarapuava, Ivaí e Cascavel. Procurou-se estabelecer condições adequadas para a manutenção dos isolados em meio de cultura, de forma a permitir o desenvolvimento de estruturas reprodutivas necessárias às análises morfológicas. Ensaio para avaliação da patogenicidade foram realizados em mudas de diferentes idades, bem como em folhas destacadas. Outras espécies florestais também foram inoculadas. Entre os meios de cultura analisados, os meios constituídos de aveia e folha de erva-mate permitiram melhor desenvolvimento micelial e esporulação dos isolados. Diferenças na morfologia das colônias dos isolados também foram verificadas. Todos os isolados envolvidos em estudo foram patogênicos, nos diferentes testes realizados. O agente causal de mancha foliar em erva-mate também foi patogênico a outras essências florestais.

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) tem ocupado um importante espaço na agricultura da região Sul do Brasil e de países vizinhos como Argentina e Paraguai (AUER & GRIGOLETTI, 1995). Esta cultura portanto, ocupa papel estratégico na economia dessas regiões, sendo de importância o conhecimento dos fatores que podem afetá-la. Entre estes fatores estão as doenças causadas por fungos. Dentre as principais doenças fúngicas desta cultura estão as manchas foliares (GRIGOLETTI & AUER, 1996). Dada sua importância, a mancha da folha, causada por *Cylindrocladium spathulatum*, foi escolhida como objeto de estudo deste trabalho.

O desenvolvimento de uma cultura e sua conseqüente domesticação pode levar a alteração do equilíbrio natural que havia entre a cultura e microrganismos associados, entre os quais se encontram os patógenos. Desta forma o conhecimento da população de patógenos e a existência de raças fisiológicas destes, são essenciais para programas de melhoramento de cultivares (ROWE & BEUTE, 1975). O estudo da variabilidade da população patogênica é um importante indicativo de como estes organismos podem se comportar quando da alteração da pressão de seleção pelo uso de variedades resistentes (ROWE & BEUTE, 1975).

No que se refere ao melhoramento da cultura, BLUM *et al.* (1994). ressaltam a importância de estudos de padronização de métodos de inoculação e avaliação da resistência de espécies de diferentes procedências, bem como virulência de diferentes isolados do patógeno, como necessários para rápida seleção de plantas resistentes.

Assim, dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivos obter dados referentes às condições necessárias para a produção de inóculo de *C. spathulatum*, bem como desenvolver de uma metodologia de inoculação e incubação que permitissem avaliar o desenvolvimento da doença na planta. Estabelecidas estas condições procurou-se verificar a patogenicidade e características morfo-fisiológicas de isolados de cinco regiões ervateiras do Estado do Paraná.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Espécies de *Cylindrocladium* são responsáveis por doenças em diversas espécies florestais. *Cylindrocladium clavatum* é responsável pela podridão de raízes em árvores de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* e *P. oocarpa*. (HOMECHIN & KRÜGNER, 1980), e várias outras espécies do gênero (HODGES & MAY, 1972). Na cultura do eucalipto, FERREIRA (1989) descreve-os como responsáveis, juntamente com outros fitopatógenos, pelo tombamento de mudas, podridão das estacas e manchas foliares. *C. scoparium* e *C. clavatum* foram associados ao tombamento de mudas (FERREIRA, 1989). *Cylindrocladium scoparium* é um parasita facultativo que tem vida saprofítica no solo e eventualmente pode atacar plantas vivas. No solo e em material vegetal colonizado, o fungo apresenta hifas septadas com clamidósporos e microescleródios. Se uma muda de eucalipto desenvolve-se em contato com essas hifas no solo, sua haste, na região do coleto, poderá ser infectada (FERREIRA, 1989).

Três espécies de *Cylindrocladium* têm causado podridão de estacas de eucalipto para enraizamento: *C. crotalariae* e *C. scoparium*, no Estado do Espírito Santo e *C. clavatum* e *C. scoparium* no Vale do Rio Doce (FERREIRA, 1989). O inóculo de *Cylindrocladium* sp. pode ser introduzido nas casas de vegetação junto com o solo ou substrato dos recipientes, ou na forma de conídios e/ou fragmento de hifas em salpiques de solos aderidos às folhas ou às hastes das estacas trazidas do campo.

No que se refere às manchas foliares, na cultura de eucalipto, várias espécies de *Cylindrocladium* são citadas como agentes causais: *C. crotalariae*, *C. ilicola*, *C. scoparium*, *C. quinquaesepatum* e *C. theae*. As três primeiras como patógenos no Brasil, e as três últimas como patógenos na Índia e Havaí, respectivamente (FERREIRA, 1989). Recentemente, *Cylindrocladium pteridis* foi descrito como agente causal de mancha foliar de eucalipto, nos estados da Bahia e Pará. (FERREIRA *et al.*, 1995). Este mesmo patógeno foi encontrado causando queima de acículas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (HODGES *et al.*, 1975).

Quanto às espécies nativas do Brasil, há descrições de *C. clavatum* associado à doenças da raiz de *Araucaria angustifolia* (HODGES & MAY, 1972) e *Cylindrocladium*

spathulatum reconhecido identificado como o causador da mancha da folha em erva-mate (*Ilex paraguariensis*), também conhecida como pinta-preta. Esta última sendo uma das principais doenças da cultura (AUER & GRIGOLETTI, 1995).

Espécies de *Cylindrocladium* produzem conídios com 1 a 7 septos, cilíndricos, situados em fiáides de conidióforos, e freqüentemente possuem uma hifa especializada com um ápice alargado (vesícula). O estágio vegetativo deste fungo produz micélio branco a marrom, clamidosporos, e microesclerócios (HUNTER & BARNETT, 1978).

Espécies de *Cylindrocladium* spp. são facilmente isoladas das folhas doentes para meio de cultura BDA por vias diretas e indiretas (FERREIRA, 1989). Na primeira via conídios e micélio de *Cylindrocladium* spp. são retirados das superfícies das manchas com auxílio de estilete de ponta bem fina, após sua visualização sob lupa estereoscópica, e transferidos para meio BDA. A esporulação de *Cylindrocladium* spp. pode ser estimulada colocando-se folhas com manchas em câmaras úmidas por 36 a 72 horas. No método indireto, retira-se fragmentos foliares das bordas das manchas, sendo estes passados, de maneira rápida e consecutiva, em álcool, água oxigenada, ou hipoclorito de sódio em concentrações e tempos determinados, sendo em seguida transferidos para meio BDA.

As colônias de *Cylindrocladium* spp. crescem bem em meio BDA (FERREIRA, 1989), com ponto ótimo de crescimento micelial entre 24-28°C (HUNTER & BARNETT, 1978). As colônias nesse meio apresentam coloração marrom característica. *C. ilicola* e *C. scoparium*, nestas condições, esporulam abundantemente e permanecem viáveis por mais de um ano (ALFENAS *et al.*, 1979). Pode-se favorecer a esporulação por inoculação de fragmento de cultura em folhas de mamoneira e de eucalipto (FERREIRA, 1989). Para estudos de caracterização dos isolados utilizam-se características morfológicas microscópicas tais como: dimensões e formato das vesículas, quantidade de septos por conídios, sendo estas características razoavelmente consistentes (ALFENAS *et al.*, 1979).

Para teste de patogenicidade com espécies de *Cylindrocladium* (*C. crotalariae*, *C. ilicola* e *C. scoparium*), em folhas, utiliza-se fragmento de cultura depositados sobre a superfície foliar, mantendo-se o sistema em câmara úmida por 48 a 72 horas, após o que os sintomas podem ser detectados independentemente de ferimentos prévios nas folhas. Outro método de inoculação é por atomização. Através deste método, com uso de suspensões de ascósporos de *C. crotalariae*, *C. ilicola* e *C. scoparium* em folhas de eucalipto, ALFENAS

et al. (1979) observaram o aparecimento de sintomas quarenta e oito horas após inoculação, sendo que estes se caracterizavam por diminutos pontos escuros, que se tornavam irregularmente circulares, mais tarde coalesciam e formavam lesões irregulares, sendo estes sintomas considerados como prova da patogenicidade. Utilizando-se de isolados de *C. clavatum* e *C. scoparium* BLUM *et al.* (1994), obtiveram em folhas de eucalipto infecção eficiente do fitopatógeno numa concentração de 10^5 conídios/mL.

Várias doenças afetam a cultura da erva-mate. Devido às suas características, viveiros reúnem condições de umidade, sombreamento e proximidades das mudas que favorecem a instalação de diversas doenças, entre estas as manchas foliares (GRIGOLETTI & AUER, 1996). Dada sua importância, a mancha da folha, causada por *Cylindrocladium spathulatum*, foi escolhida como objeto de estudo deste trabalho.

Conforme descrito por PASCHOLATI *et al.* (1983) em trabalho com o patógeno de melão *Mycosphaerella melonis*, para que uma dada interação patogênica possa ser adequadamente estudada, faz-se necessário estudos que determinem um melhor conhecimento da fisiologia e da biologia do patógeno, para o estabelecimento de uma metodologia adequada e padronizada a ser empregada em ensaios de inoculação e laboratório. Estudos de padronização de métodos de inoculação e avaliação da resistência de espécies de diferentes procedências, bem como virulência de diferentes isolados são necessários para rápida seleção de plantas resistentes (BLUM *et al.*, 1994).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Hospedeiro

Para os ensaios de inoculação e patogenicidade, foram utilizadas mudas em três estádios de desenvolvimento (com 2, 4 e 8 pares de folhas verdadeiras) de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.), mantidas em condição de viveiro e casa de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (CNPQ, Colombo -PR), bem como folhas destacadas de plantas adultas. Além dos testes realizados com erva-mate cultivada foram efetuados ensaios em folha destacada de erva-mate selvagem e outras espécies florestais: *Ilex dumosa*, *Ilex microdonta*, *Ilex theezans*, *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus viminalis*.

3.2. Obtenção de diferentes isolados.

Os isolados de *Cylindrocladium spathulatum* foram coletados de mudas em viveiros públicos e particulares nos municípios de Colombo, São Mateus do Sul, Ivaí, Guarapuava e Cascavel. As folhas coletadas com sintomas de pinta-preta foram colocadas em gerbox até que se tornassem evidentes os conidióforos de *Cylindrocladium*. Estes foram, sob microscópio estereoscópico, retirados com estiletos e repicados em tubos contendo BDA (batata-dextrose-ágar) ou EMDA (folha de erva-mate-dextrose-ágar). O método indireto de isolamento, através do tratamento de lesões em álcool e hipoclorito seguido de transferência para meio de cultura também foi utilizado.

3.3. Colônias monospóricas e conservação dos isolados

Após o isolamento de culturas puras foram obtidas colônias monospóricas. Conidióforos retirados de colônias puras ou de folhas inoculadas foram depositados sobre lâminas contendo ágar-água (2%). Após um período de cerca de 24 horas de incubação, os esporos, que apresentavam tubo germinativo em desenvolvimento, foram pescados com alça bacteriológica isoladamente, sob microscópio óptico, e transferidos para BDA ou

EMDA. Os isolados monospóricos obtidos foram mantidos em BDA, EMDA e Meio de solo (Areia, esterco de cavalo e terra na proporção 1:1:1:).

3.4. Influência do meio de cultura no crescimento e esporulação dos isolados.

Para se comparar o crescimento micelial e esporulação dos isolados os seguintes meios de cultura foram utilizados: BDA (Batata-dextrose-ágar: 200g de infuso de batata, 20g de dextrose, 15g de ágar), EMDA (Folha de erva-mate-dextrose-ágar: 200 g de infuso de folha de erva-mate, 20g de dextrose, 15g de ágar), CHDA (Chimarrão-dextrose-ágar: 200g de infuso de chimarrão, 20g de dextrose, 15g de ágar), AVDA (aveia-dextrose-ágar: 20g de aveia, 20g de dextrose, 15g de ágar), Malte (Extrato de malte-ágar: 20g de extrato de malte, 15g de ágar) e Czapek (3g NaNO₃, 1g K₂HPO₄, 0,5g MgSO₄- 7H₂O, 0,5g KCl, 0,01g FeSO₄ 7H₂O, 30 g Sacarose, 15g de ágar). Formulações para 1000 mL. O pH dos meios utilizados esteve em torno 5,0 a 5,5, exceto o meio Czapek (6,5-7,0). Em ensaio preliminar avaliou-se o crescimento e esporulação de três isolados nos meios BDA, EMDA e CHDA, sob os regimes de luminosidade: escuro contínuo, iluminação contínua e iluminação alternada (fotoperíodo da região de Colombo nos meses fevereiro e março).

Para condução do ensaio, foram repicados blocos de colônia dos isolados monospóricos dos tubos para placas contendo os meios a serem testados. Este procedimento teve como objetivo adaptar o microrganismo aos diferentes meios. Após o crescimento da colônia nestas placas, por 7 dias, blocos de meio de cerca de 5 mm de diâmetro foram retirados da região de crescimento ativo e transferidos para o centros de placas com os respectivos meios de cultura. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento (meio e isolado). O meio Czapek não foi repicado devido ao crescimento insignificante da colônia. As avaliações de crescimento foram efetuadas aos 7 e 14 dias após a inoculação, através de medidas do diâmetro obtidas em dois pontos da colônia. A taxa de esporulação foi avaliada aos 20 dias de incubação, lavando-se a superfície da colônia com 20 ml de água destilada e filtrando-se em seguida a suspensão em tecido de malha fina (uma camada). O número de esporos encontrado no filtrado foi quantificado em câmara de Neubauer.

Os ensaios foram conduzidos em condição ambiente do laboratório de Fitopatologia da Embrapa – Florestas. A temperatura no período variou entre 18°C a 30°C.

3.5. Análise de características morfológicas dos cinco isolados.

Para análise das características morfológicas importantes à taxonomia (largura, comprimento e septação de conídios e formato da vesícula) foram utilizados conídios e vesículas produzidos em lesões sobre folha destacada, 12 dias após a inoculação. Com objetivo de determinar o número de conídios a serem amostrado foi executado um ensaio verificando-se os valores do coeficiente de variação para medidas de 1 a 100 conídios. Com base neste ensaio, bem como precedentes da literatura (ORREGO FUENTE *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1991), decidiu-se utilizar as medidas de 50 conídios. As medidas foram tomadas com auxílio de escala microscópica .

3.6. Padronização de métodos de inoculação.

Para os ensaios de inoculação deste trabalho foi utilizado o isolado obtido em Colombo. As concentrações testadas foram da ordem de: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 conídios/mL, aferidas em câmara de Neubauer. Foram avaliados os seguintes métodos de inoculação:

a) Em folha destacada com uso de disco de papel filtro.

Folhas destacadas de plantas adultas foram lavadas em água destilada e colocadas em gerbox contendo no seu interior papel filtro umedecido. As folhas foram inoculadas com disco de papel filtro (6 mm de diâmetro) embebido em suspensão de conídios de *Cylindrocladium spathulatum*. Foram utilizados dois pontos de inoculação por folha, um de cada lado da nervura principal, sendo também efetuadas inoculações nas faces superior e inferior das folhas. As avaliações foram feitas pela medição do diâmetro da lesão, aos 5 dias após a inoculação.

b) Em mudas por aspersão de suspensão de conídios.

Mudas de erva-mate em três estádios de desenvolvimento: 2, 4 e 8 pares de folhas verdadeiras. A suspensão foi aplicada, até o ponto de escorrimento, com auxílio de atomizador DeVilbiss. Após a aplicação, as mudas foram mantidas em sacos plástico que serviram para formar uma câmara úmida. Avaliações nos diferentes ensaios foram realizadas aos 6 e 12 dias após inoculação, sendo utilizados como critérios: incidência e severidade da doença. Os sintomas apresentados nas folhas foram classificados em: pontuações, manchas coalescidas, e folhas totalmente negras.

3.7. Testes de patogenicidade e virulência dos cinco isolados em *Ilex paraguariensis* cultivada .

Os testes de patogenicidade dos cinco isolados foram desenvolvidos em três métodos:

- a) Deposição de meio solo sobre folhas destacadas: meio de solo, o qual foi utilizado como modo de conservação dos isolados, foi depositado sobre folhas destacadas mantidas em gerbox, sendo aplicado uma gota de água esteril sobre o solo. A patogenicidade foi avaliada 7 dias após a inoculação, em função da capacidade ou não do desenvolvimento da lesão e da produção de conídios.
- b) Disco de papel filtro em folha destacada: o ensaio foi conduzido como descrito no item 3.6, sendo utilizada uma concentração de 1×10^5 a 2×10^5 conídios/mL. A avaliação foi efetuada 5 dias após a inoculação, pela medida do diâmetro da lesão formada.
- c) Aspersão de suspensão em mudas: plantas foram inoculadas por atomização, como descrito no item 3.6, utilizando-se suspensão da ordem de 6×10^4 a 1×10^5 conídios/mL. A avaliação foi efetuada aos 5 dias após a inoculação.

Estes ensaios foram conduzidos em condições ambiente do laboratório de Fitopatologia da Embrapa-Florestas, com temperatura variando no período (junho) entre 20-30°C.

3.8 Avaliação da patogenicidade de *Cylindrocladium spathulatum* a outras espécies florestais.

Utilizando-se o método de inoculação em folha destacada com disco de papel filtro diferentes espécies de *Ilex* e *Eucalyptus* foram inoculadas com o isolado Colombo: *I. paraguariensis* (nativa e cultivada), *I. dumosa*, *I. microdonta*, *I. theezans*, *E. dunnii* e *E. viminalis*. Foram avaliados o aparecimento da lesão e a capacidade de esporulação de *Cylindrocladium spathulatum* nos tecidos. As condições ambientais deste ensaio são as mesmas descritas no item 3.7.

4. RESULTADOS

4.1. Colônias monospóricas

As culturas monospóricas obtidas neste trabalho estão listadas na Tabela 4.1. Apenas 5 isolados e para cada um destes apenas uma monospórica foi utilizada para os ensaios. O único critério de escolha foi utilizar um isolado e cultura monospórica por região.

Tabela 4.1. – Colônias monospóricas obtidas por município

Isolado (SIGLA)	Localidade - Viveiro	Monospóricas
Colombo*	Colombo -PR	10
SMP*	São Mateus-PR - Prefeitura	7
GPI	Guarapuava-PR - IAP	7
GPP*	Guarapuava-PR - Prefeitura	12
IVAÍ*	Ivaí-PR - Bitumirim	15
Nobre*	Cascavel-PR – Mate-Nobre	10
IAP	Cascavel-PR - IAP	11
Ferroeste	Cascavel-PR - Ferroeste	1
Total		73

* Isolados escolhidos para o desenvolvimento do trabalho.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

4.2. Influência do meio de cultura no crescimento e esporulação dos isolados.

Em ensaio preliminar, o isolado Colombo, foi avaliado em três diferentes meios de cultura, analisando-se concomitantemente o efeito da luminosidade sobre: o crescimento micelial (pela medida do diâmetro da colônia), a esporulação (por observação visual), e as características das colônias. Os resultados referentes ao crescimento micelial, avaliado após 7 dias de incubação, são visualizados na Figura 4.2.1.

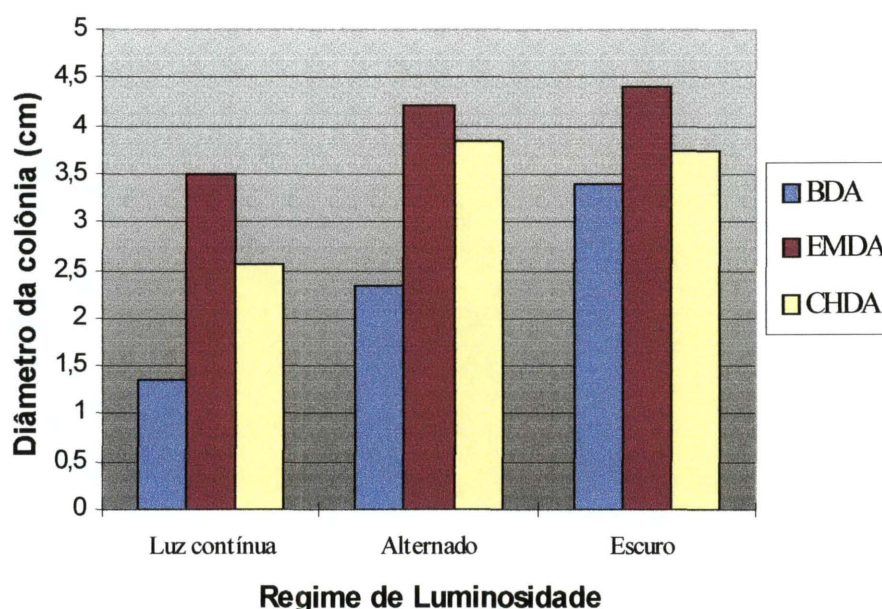


Figura 4.2.1. – Efeito do meio de cultura e regime de luminosidade no crescimento da colônia de *Cylindrocladium spathulatum*, isolado Colombo, após 7 dias de incubação

As taxas de esporulação obtidas e classificadas visualmente estão listadas na Tabela 4.2.1.

Tabela 4.2.1. Esporulação de *C. spathulatum*, isolado Colombo em diferentes regimes de luminosidade e meios de cultura, após 7 dias de incubação.

Meio de cultura	Luz contínua	Alternado	Escuro
BDA	0	0	0
EMDA	++	+	0
CHDA	+	0	0

0 – esporulação ausente
 + - esporulação média
 ++ - esporulação abundante

Os resultados apresentados revelaram que a taxa de crescimento do micélio foi inversamente proporcional à taxa de luz fornecida. Assim em regime de escuro contínuo foram observados os maiores valores para crescimento, independentemente do meio de cultura utilizado. O contrário foi observado para a esporulação. A presença de luz

apresenta-se como um dos fatores necessários à esporulação e na sua ausência a esporulação não foi observada. O efeito do regime de luz também foi observado no aspecto da colônia. Em regime de luz alternada foi possível a observação de zonas de crescimento. O meio de cultura utilizado também influenciou estes dois fatores, sendo que o meio obtido a partir de infuso de folha de erva (EMDA) permitiu uma melhor esporulação e crescimento da colônia. A morfologia da colônia também foi alterada em função do meio de cultura. As colônias produzidas em BDA apresentaram micélio mais ralo e de cor marrom. Em EMDA, as colônias apresentam micélio mais cotonoso em tons róseos. No meio CHDA, as colônias apresentaram-se irregulares, com a formação de setores cotonosos de coloração branca.

Após os ensaios preliminares, foram efetuadas as comparações entre as culturas monospóricas eleitas em regime de luz alternada. Os resultados visualizados na figura 4.2.2, demonstraram que entre os isolados avaliados, aquele obtido em São Mateus (SMP) apresentou maior taxa de crescimento, em relação aos demais, nos diferentes meios de cultivo. No que se refere a avaliação entre meios de cultivo, os meios de aveia (AVDA) e de folha de erva (EMDA), promoveram, em média, um melhor desenvolvimento dos isolados. O meio obtido a partir de infuso de chimarrão resultou em culturas com as menores taxas de crescimento. O isolado de Guarapuava (GPP) foi um dos mais afetados quando cultivado neste meio.

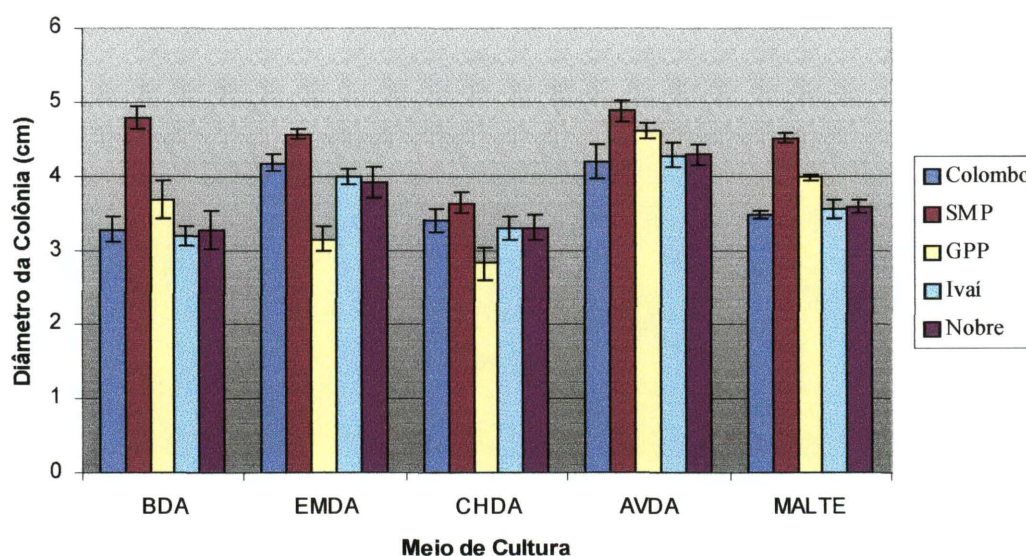


Figura 4.2.2 – Médias de crescimento da colônia de isolados de *C. spathulatum* em diferentes meios de cultura, após 7 dias de incubação.

Em cada meio de cultivo foi possível se observar variações na morfologia da colônia, esta, porém se manteve semelhante entre os diferentes isolados (Figura 4.2.3). Assim é que no meio BDA ocorreu a produção de um micélio marrom opaco rarefeito. Este micélio foi ainda mais ralo no meio de malte. Bom desenvolvimento de micélio foi observado nos meios de folha de erva e aveia, sendo neste último, formadas colônias de aspecto bastante vigoroso de coloração marrom e bordos esbranquiçados. As colônias produzidas em meio de infuso de chimarrão apresentaram-se muito irregulares como descrito para o isolado Colombo no ensaio preliminar.

No que se refere a esporulação, dois meios de cultura se destacaram: aveia (AVDA) e folha de erva (EMDA). Os resultados referentes a esporulação são apresentados na figura 4.2.4.

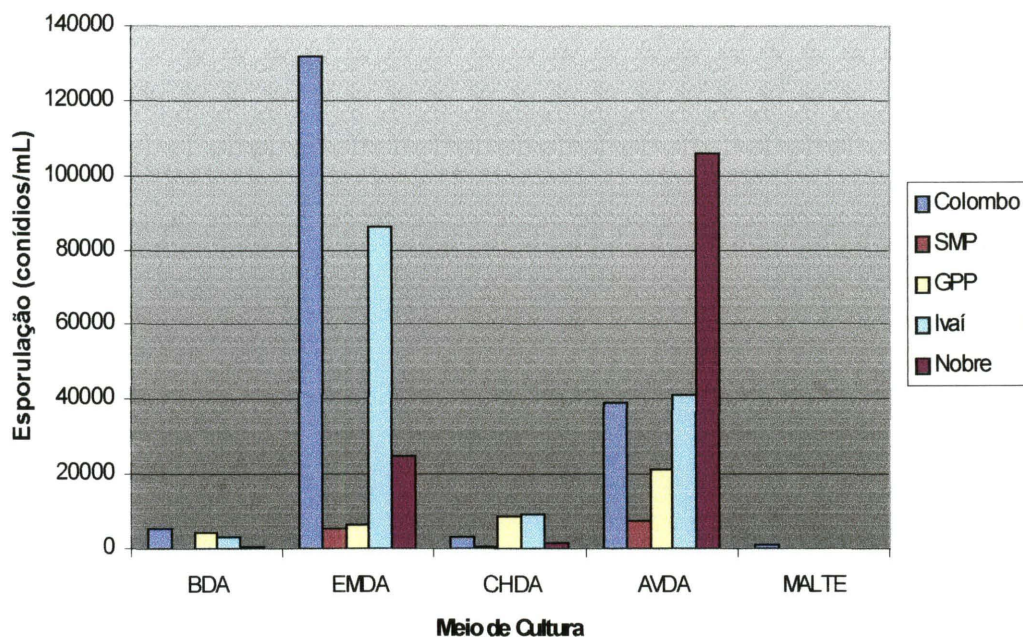


Figura 4.2.4.- Efeito do meio de cultura na esporulação de isolados de *C. spathulatum*, após 20 dias de incubação.

Outro aspecto observado foi que, as colônias após serem lavadas apresentavam num período de 48 horas uma alta taxa de esporulação nos meios: AVDA, EMDA e CHDA. Os meios BDA e MALTE não propiciaram tal esporulação.

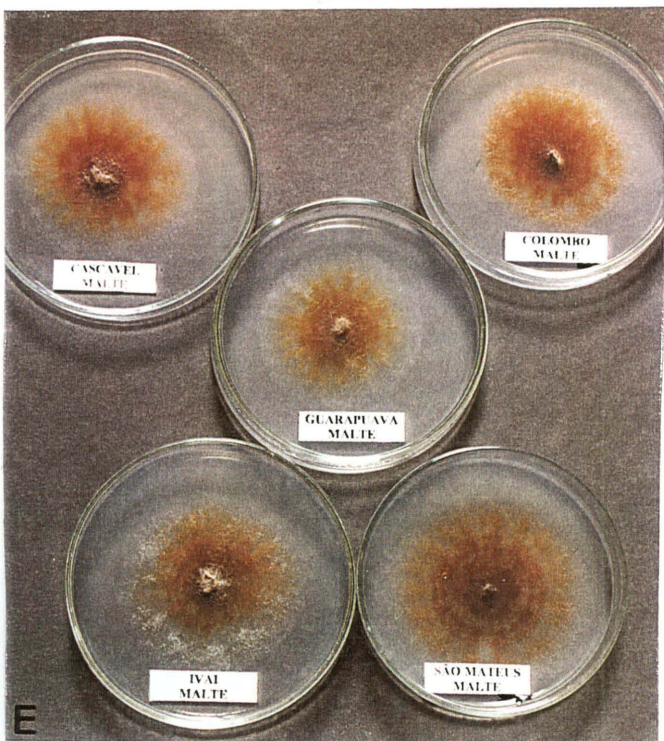
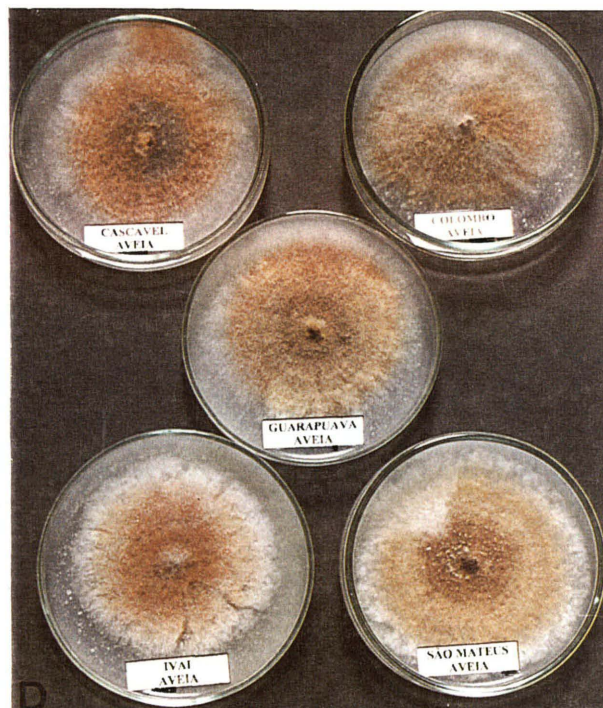
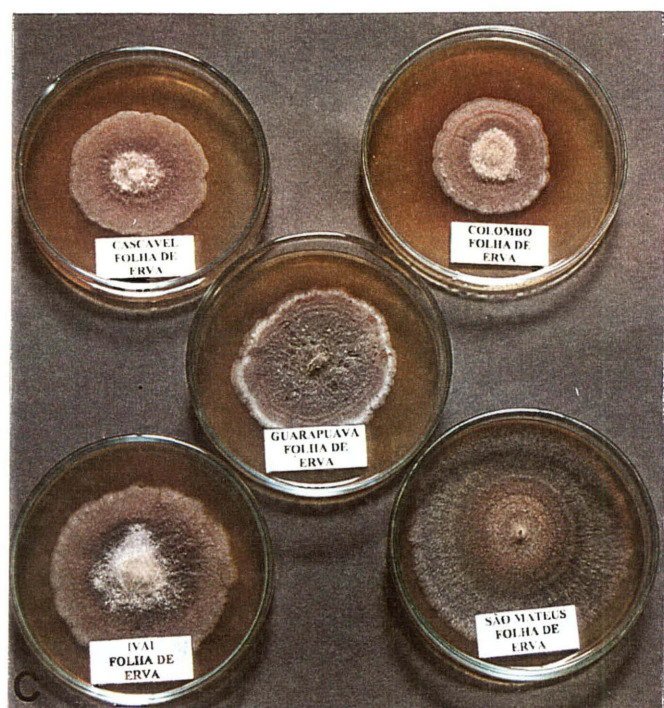
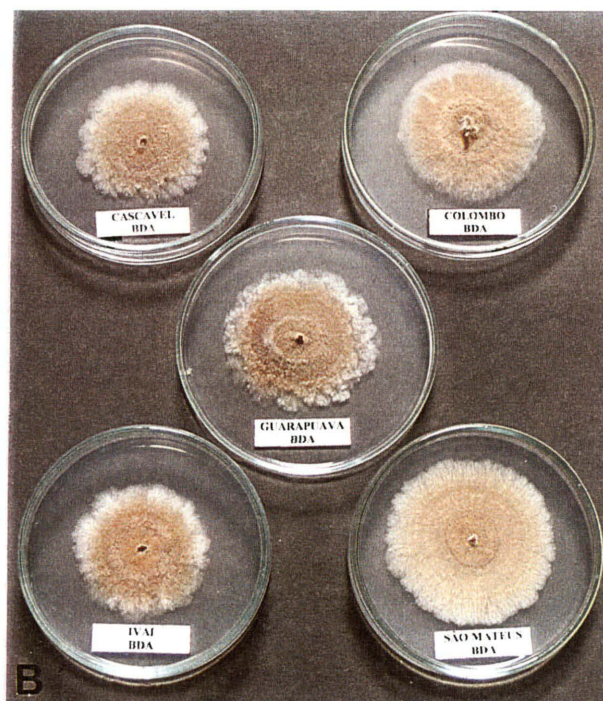
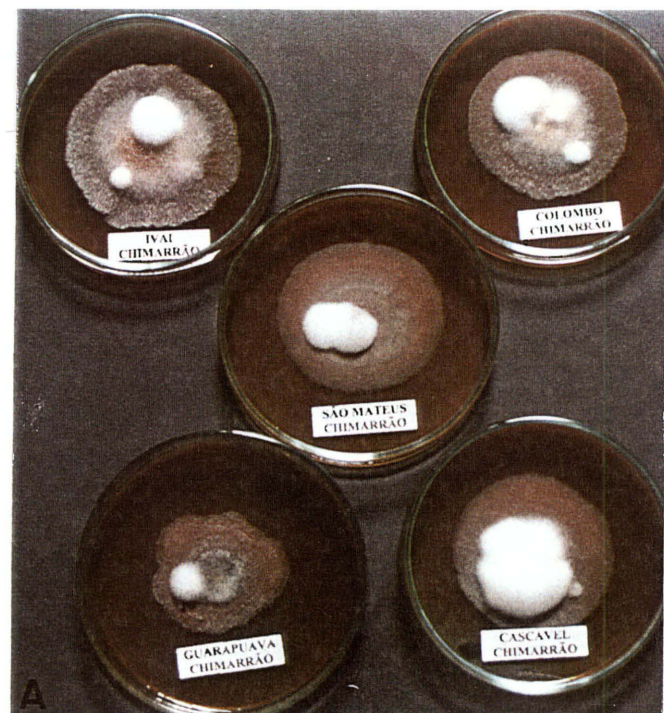


Figura 4.2.3. Efeito do meio de cultura na morfologia da colônia dos isolados de *C. spathulatum*: A) chimarrão-dextrose-ágar (CHDA); B) batata-dextrose-ágar (BDA); C) folha de erva-mate-dextrose-ágar (EMDA); aveia-dextrose-ágar (AVDA); malte-ágar (MALTE). Placas com 12 dias de incubação.

4.3. Análise de características morfológicas dos cinco isolados.

A primeira observação realizada foi a verificação do comportamento do coeficiente de variação do comprimento de conídios em função do número de conídios amostrados. Os resultados podem ser visualizados na figura 4.3.1.

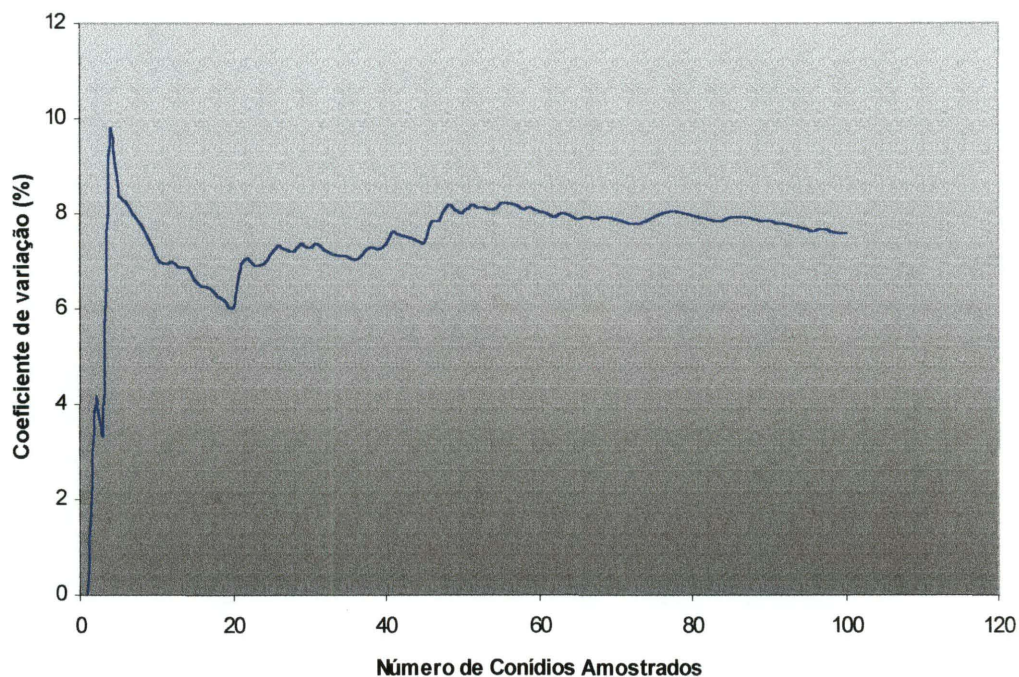


Figura 4.3.1.- Comportamento do coeficiente de variação do comprimento de conídios em função do número amostrado. Conídios de *C. spathulatum*, isolado Colombo, retirados de folha destacada após 12 dias da inoculação.

A partir da análise do coeficiente de variação decidiu-se utilizar 50 conídios como base para as análises de comprimento e largura. Os resultados referentes ao comprimento de conídios são apresentados na figura 4.3.2.

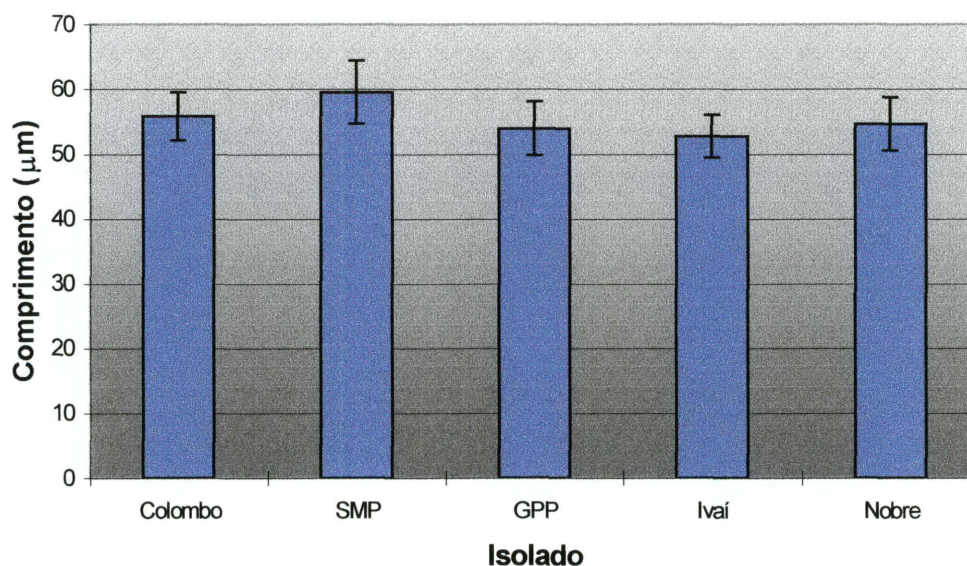


Figura 4.3.2. Comparação do comprimento de conídios dos cinco isolados de *C. spathulatum*. Conídios retirados de folha destacada, após 12 dias da inoculação.

Na tabela 4.3.1 são apresentadas as estatísticas para análise do comprimento de conídios

Tabela 4.3.1- Estatísticas para comprimento de conídios dos isolados

Isolado	Colombo	SMP	GPP	Ivaí	Nobre
Média	55,822	59,592	54,028	52,78	54,6
Desvio padrão	3,708803096	4,823997834	4,137387522	3,280368322	4,102562664
Máximo	63,7	68,9	65	58,5	65
Mínimo	48,1	49,4	45,5	45,5	42,9
Coefficiente de Variação (%)	6,643981041	8,09504268	7,657858004	6,215173023	7,513851032

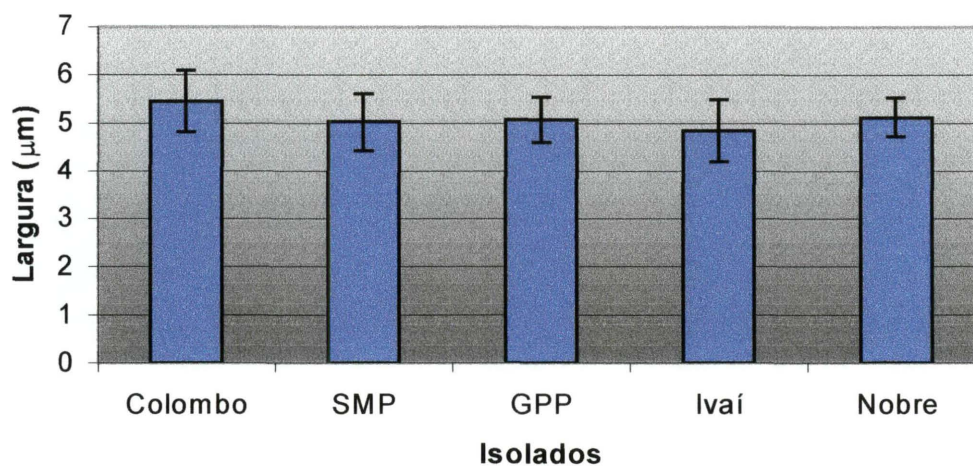


Figura 4.3.3. Comparação da largura de conídios dos cinco isolados de *C. spathulatum*. Conídios retirados de folha destacada, após 12 dias da inoculação.

Na tabela 4.3.2. estão estatísticas para análise da largura de conídios .

Tabela 4.3.2 – Estatísticas da largura de conídios

Isolado	Colombo	SMP	GPP	Ivaí	Nobre
Média	5,46	5,018	5,07	4,836	5,122
Desvio padrão	0,643333157	0,587867124	0,473480383	0,645474039	0,407726399
Máximo	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Mínimo	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
Coefficiente de Variação (%)	11,78265855	11,71516787	9,338863578	13,34727127	7,960296737

Todos os conídios analisados nos diferentes isolados apresentaram, apenas 1 septo. O formato característico das vesículas, espatuladas, pode ser observado na figura 4.3.4.

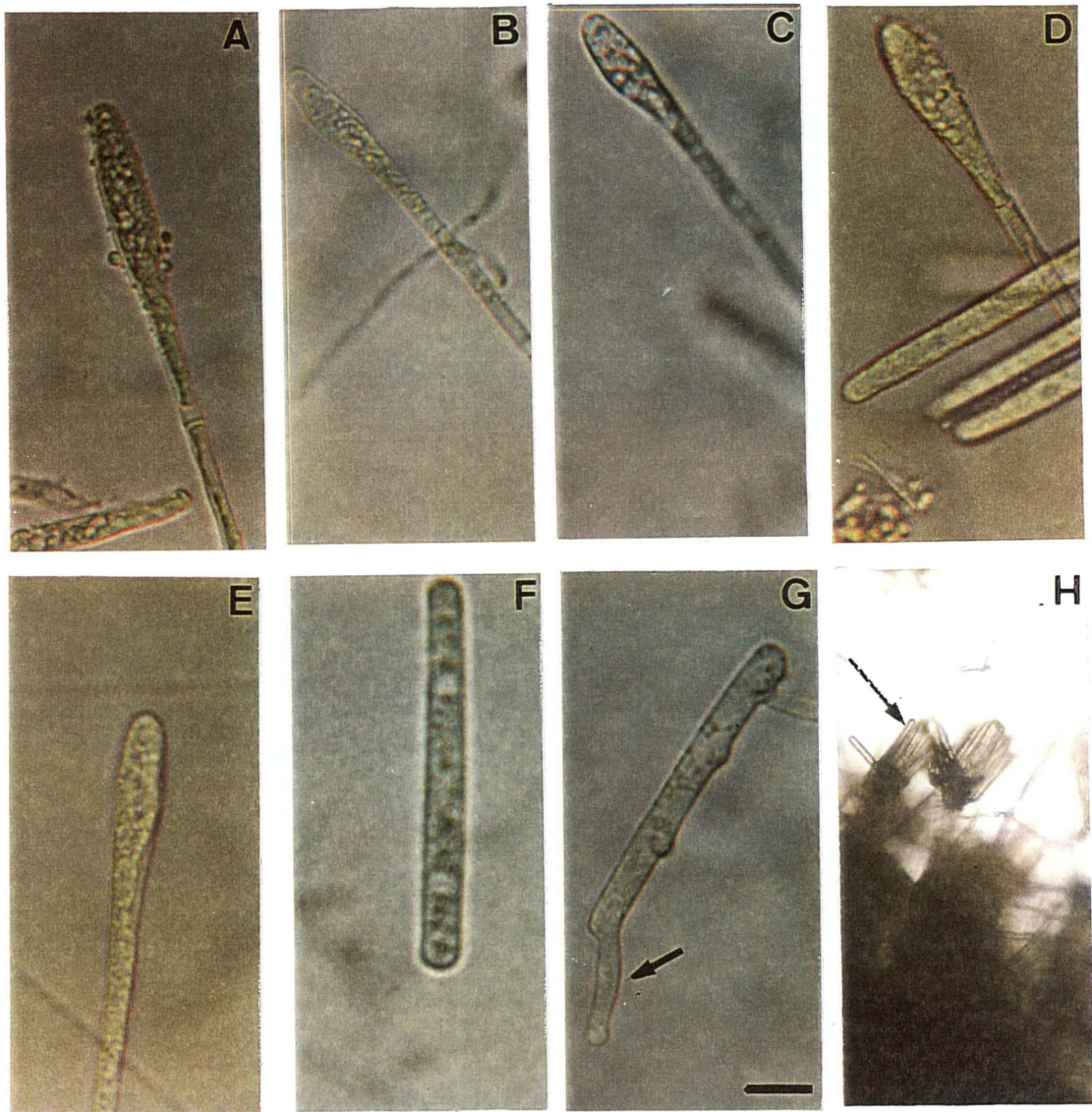


Figura 4.3.4. Vesículas de isolados de *C. spathulatum*(A-E): A) Colombo, B) SMP, C) GPP, D) Ivaí, E) Nobre; Conídios (F-G) seta indicando tubo germinativo; Microcultura (H) com 8 dias, seta indicando conidióforo. Barra= 10 μ m (A-G).

4.4. Padronização dos métodos de inoculação.

Os resultados referentes à padronização da concentração do inóculo em folha destacada podem ser verificados na figura 4.4.1.

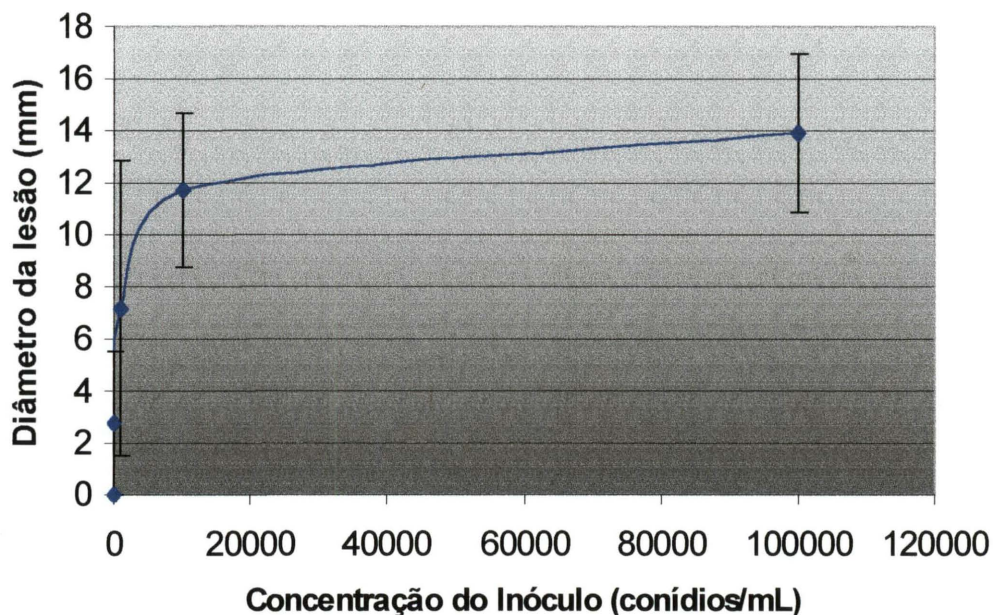


Figura 4.4.1. Efeito da concentração do inóculo no diâmetro da lesão de folhas destacadas inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo, após 5 dias de incubação.

Os resultados obtidos em mudas são apresentados na figura 4.4.2, sendo utilizado como parâmetro a frequência (incidência) de folhas com sintomas. São comparados no gráfico os resultados para os três tamanhos de muda utilizados, nas 5 concentrações. Na figura 4.4.3 são visualizadas as respostas por categoria de sintomas (pontuações, manchas coalescidas e folhas totalmente negras) nas diferentes mudas utilizadas, na concentração mais elevada utilizada (10^5 conídios/mL). Além da formação de manchas na lâmina foliar, outra resposta vegetal observada foi intensa queda de folhas. A queda ocorre mesmo em folhas que apresentam uma pequena pontuação (lesão). Os sintomas em detalhes podem ser vistos na figura 4.4.4 (A), bem como o desenvolvimento da doença nas mudas na figura 4.4.4(B).

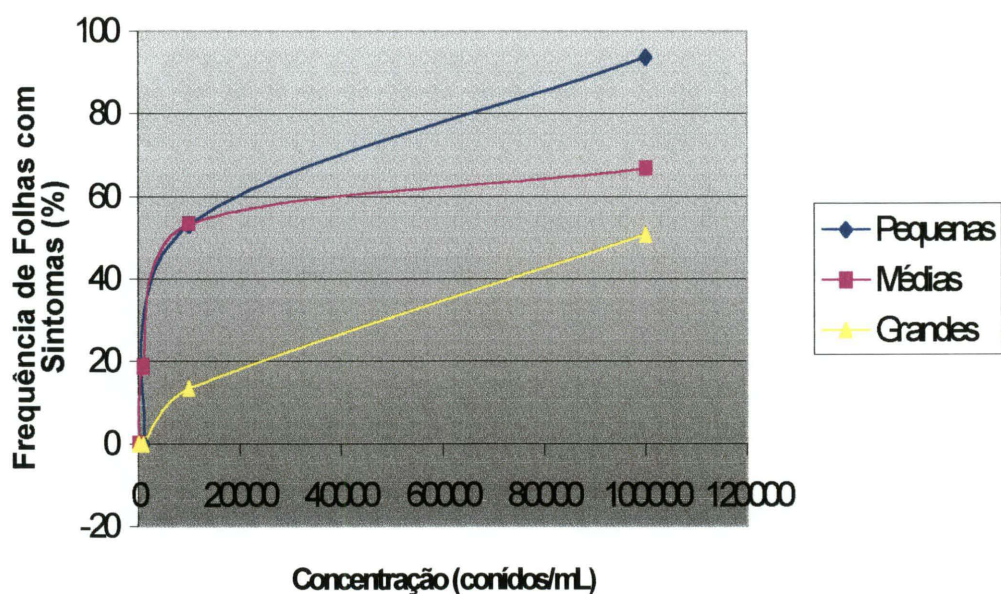


Figura 4.4.2 – Efeito da concentração do inóculo na frequência de sintomas em mudas de erva-mate inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo, após 5 dias de incubação.

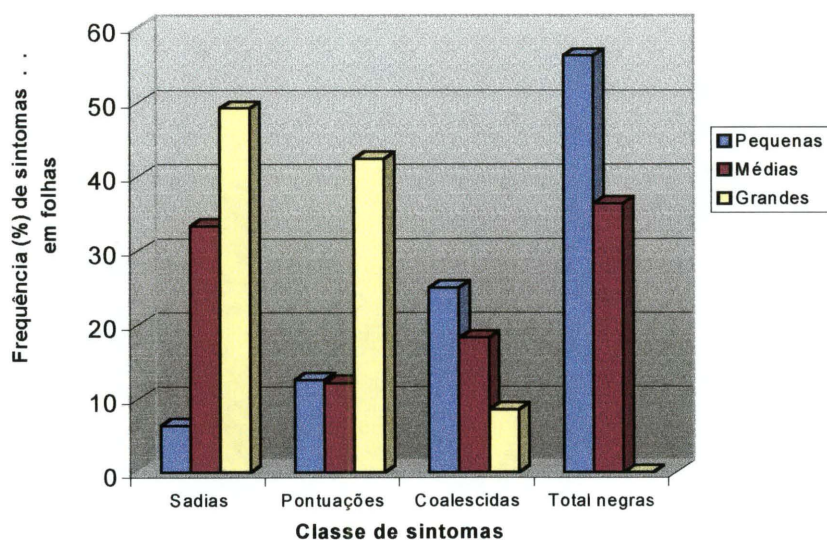


Figura 4.4.3 – Frequência de sintomas em folhas de mudas de erva-mate em diferentes estádios de desenvolvimento inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo, após 5 dias de incubação.



Figura 4.4.4. A) Classificação dos sintomas em folhas de *Ilex paraguariensis* inoculadas com *C. spathulatum*; B) Aspectos de plantas inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo, em teste de concentração de inóculo.

4.5. Testes de patogenicidade e virulência dos cinco isolados em *Ilex paraguariensis* cultivada .

O ensaio realizados por deposição de meio de solo sobre folhas destacadas resultou em desenvolvimento de mancha foliar para todos os isolados. Após 7 dias de incubação, em gerbox, todas as inoculações realizadas na face inferior da folhas haviam desenvolvido lesões típicas, sendo que na maioria delas já havia ocorrido esporulação. É importante ressaltar que o meio de solo também foi transferido para meio de cultura (BDA e EMDA) formando culturas limpas de *Cylindrocladium spathulatum*.

Os ensaios em folha destacada com inoculações com disco de papel filtro também resultaram em 100% de desenvolvimento de sintomas, quando das inoculações da face inferior. Na face superior em nenhum momento foi possível se observar o desenvolvimento dos sintomas. Todos os isolados se mostraram patogênicos (Figura 4.5.1). A severidade dos sintomas foi avaliada através do diâmetro da lesão formada. Resultados podem ser visualizados na figura 4.5.2.

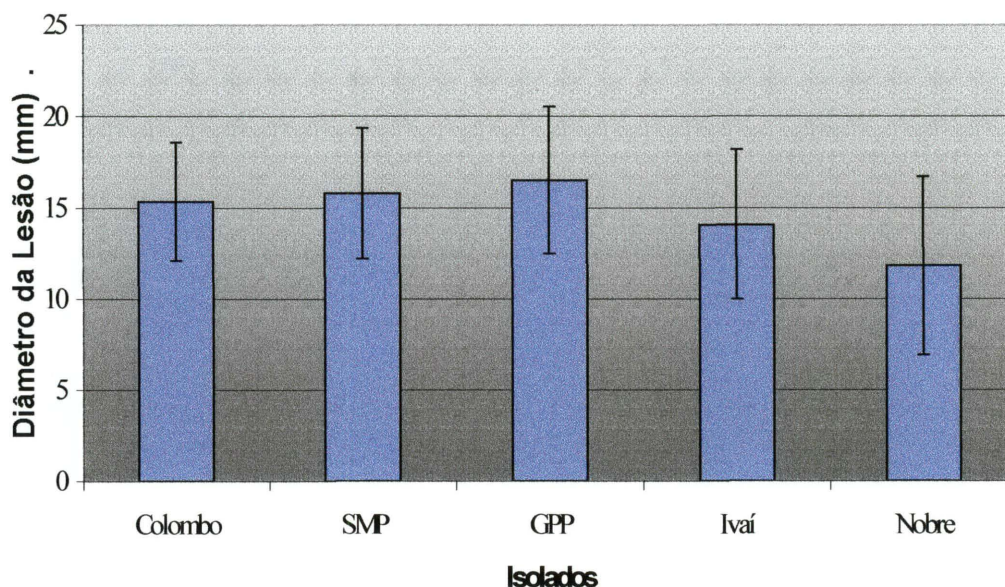


Figura 4.5.2. – Variação no tamanho da lesão formada em folhas de erva-mate destacadas, inoculadas com diferentes isolados de *C. spathulatum*, após 5 dias de incubação.

Nos ensaios conduzidos em mudas, todos os isolados mostraram-se patogênicos, sendo observada intensa desfolha das plantas inoculadas. As mudas pequenas e muitas das mudas médias tornam-se totalmente necrosadas, inclusive o caule (figura 4.5.1). É importante ressaltar que quanto mais jovem a muda, maior foi a frequência de sintomas. Este padrão de resposta pode ser observado para todos os isolados (figura 4.5.3.).

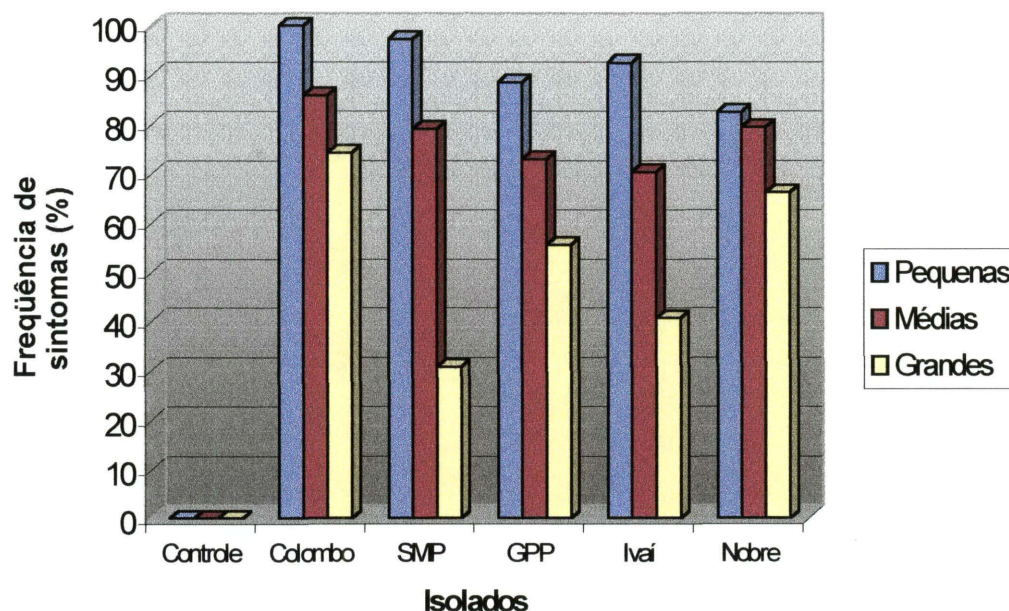


Figura 4.5.3 – Frequência do aparecimento de sintomas de mancha foliar em mudas de erva-mate em três estágios de desenvolvimento, inoculadas com cinco isolados de *C. spathulatum*.

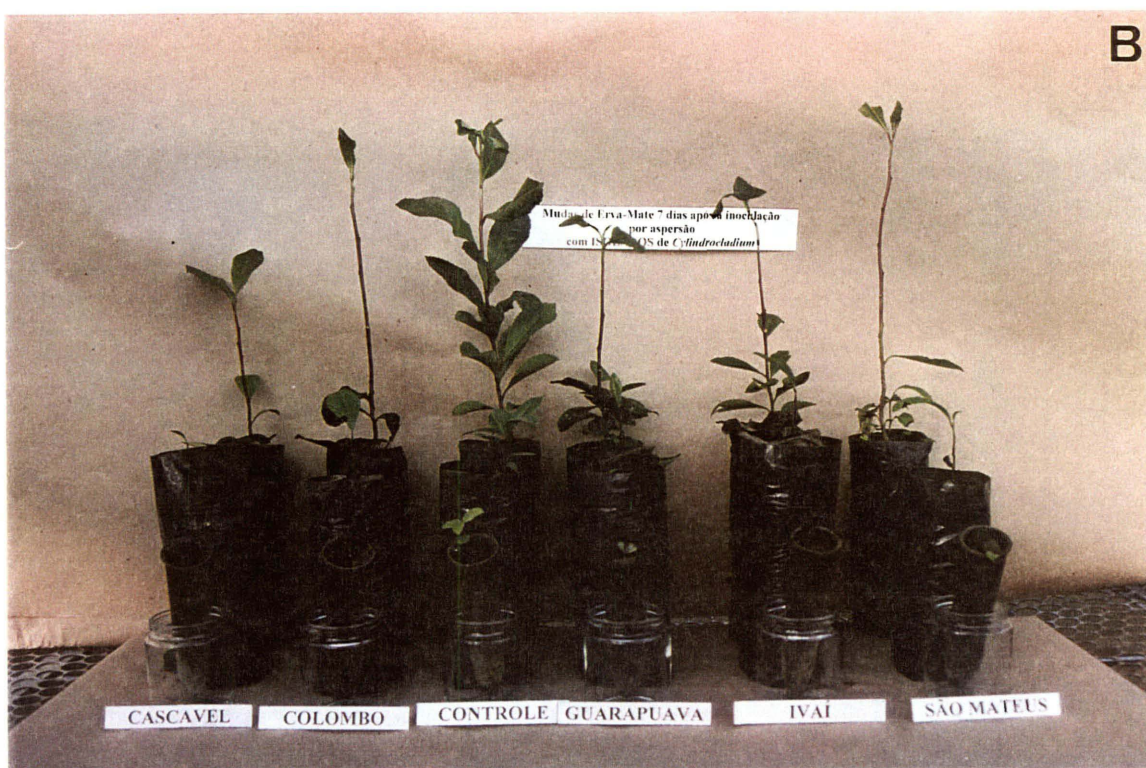


Figura 4.5.1. A) Ensaio em folhas destacadas de *Ilex paraguariensis* inoculadas com cinco isolados de *C. spathulatum*. B) Mudas de *Ilex paraguariensis* em três diferentes estádios de desenvolvimento, inoculadas com cinco isolados de *C. spathulatum*.

A frequência das diversas classes de sintomas nos três tamanhos de muda é visualizado na figura 4.5.3, sendo totalizados os valores para toda a população de plantas utilizada. Pode ser observado que os sintomas mais severos são mais frequentes nas mudas menores.

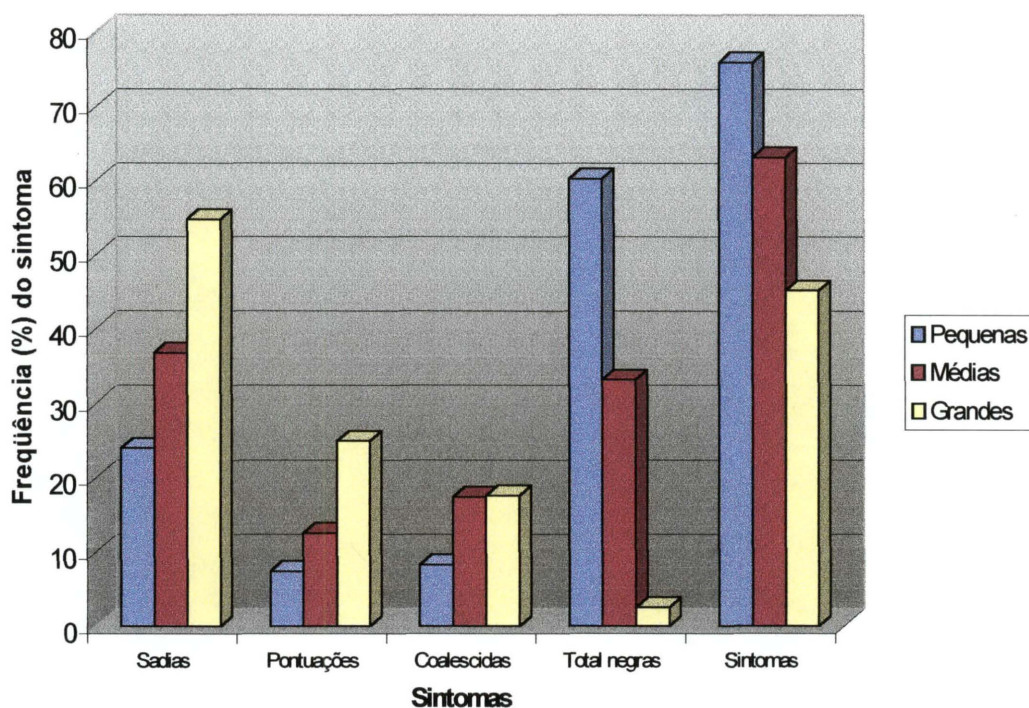


Figura 4.5.4. – Frequência das classes de sintomas em mudas de erva-mate em três diferentes estádios de desenvolvimento, inoculadas com cinco isolados de *C. spathulatum*, após 5 dias de incubação.

4.6 Avaliação da patogenicidade de *Cylindrocladium spathulatum* a outras espécies florestais.

Os ensaios de patogenicidade conduzidos em folhas destacadas de outras espécies florestais demonstraram, também nestas, que conídios de *Cylindrocladium* não são capazes de penetração pela epiderme superior. A frequência do aparecimento de sintomas é

demonstrada na figura 4.6.1. Embora manchas tenham aparecido, esporulação apenas foi observável em: *Ilex paraguariensis* nativa e cultivada e *Ilex dumosa*.

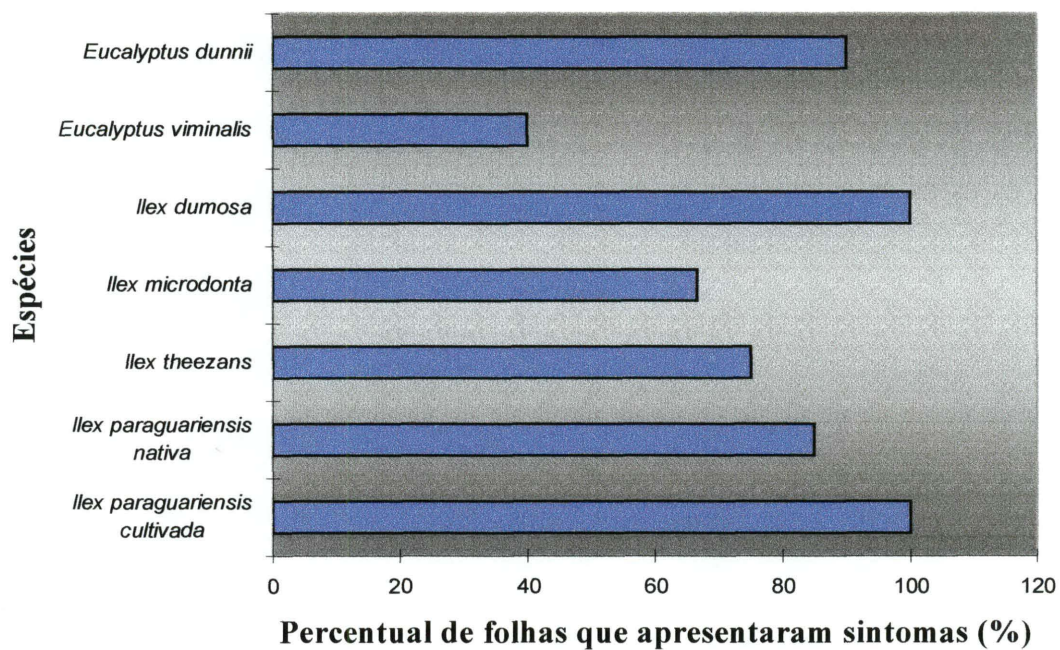


Figura 4.6.1-Frequência de sintomas de mancha foliar em folha destacada de espécies de *Ilex* e *Eucalyptus*, inoculadas com *C. spathulatum*, isolado Colombo, após 12 dias de incubação.

5. DISCUSSÃO

Um dos primeiros aspectos abordados neste trabalho, foi a relação entre luminosidade e crescimento e esporulação das culturas de *Cylindrocladium spathulatum*. Conforme observado, o regime de luz contínua, bem como luz alternada, permitiram a formação de estruturas reprodutoras assexuadas. O efeito positivo da luz na esporulação é citado na literatura: para *C. pteridis* (HODGES *et al*, 1975; FERREIRA *et al*, 1995), *Cylindrocladium* sp. (ORREGO FUENTE *et al*, 1996). HUNTER & BARNETT (1978) admitem a possível existência de diferentes fotorreceptores entre as espécies de *Cylindrocladium*. Outro aspecto importante, a intensa esporulação após lavagem das culturas, com auxílio de alça de Drigalsky, pode ser resultado da correlação positiva entre esporulação e alguma forma de estresse físico. Um procedimento utilizado em trabalhos com *Cylindrocladium* é a indução de esporulação através de ranhuras na cultura (FERREIRA *et al*, 1995; MOREIRA *et al*, 1991). Quanto ao crescimento micelial, o ensaio preliminar desenvolvido apresentou melhores taxas de crescimento em regime de escuro, resultado que difere do observado por ORREGO FUENTE *et al*. (1996). Estes autores observaram variação entre os isolados utilizados e a resposta ao regime de luz.

No que se refere a comparação entre os meios de cultura vários aspectos devem ser ressaltados. O primeiro foi a ausência ou pouco crescimento dos isolados em meio Czapek, motivo pelo qual não foi avaliado na segunda etapa do trabalho. Este meio foi eficientemente utilizado para crescimento de *Cylindrocladium* por ORREGO FUENTE *et al*. (1996). As prováveis causas sugeridas para explicar a ausência de crescimento em comparação aos demais meios utilizados seriam: o pH, fonte de carbono, fonte de nitrogênio ou ausência de algum micronutriente ou vitaminas. Enquanto o pH dos demais meios utilizados esteve em torno de 5 - 5,5, o meio Czapek apresentou pH 6,5. No entanto este pH foi utilizado para ensaios de fisiologia e morfologia com espécies de *Cylindrocladium* (REIS, 1966; HUNTER & BARNETT, 1978). Quanto à fonte de carbono, o meio Czapek utiliza sacarose, enquanto nos demais meios foi utilizado glucose. Sabe-se porém que espécies de *Cylindrocladium* utilizam diferentes fontes de carbono (REIS, 1966; HUNTER & BARNETT, 1978; ALFENAS *et al*, 1979). Quanto à fonte de nitrogênio,

HUNTER & BARNETT (1978), observaram pequenas diferenças entre fontes orgânicas (demais meios) e inorgânicas (Czapek) com ligeira superioridade das primeiras. Estes autores, ainda, observaram apenas 4, entre 58 isolados de *Cylindrocladium*, deficientes na produção de vitaminas. Deste modo é difícil explicar o motivo que resultou no quase ausente crescimento neste meio.

A comparação dos demais meios apresentou os meios de aveia (AVDA) e folha de erva (EMDA) como sendo os melhores para crescimento e esporulação dos isolados. A eficácia para o meio de aveia como alternativa para cultura de *Cylindrocladium* foi apontada por ORREGO FUENTE *et al.* (1996), muito embora este autor cite a formação de micélio ralo ao contrário do observado no presente trabalho. O meio preparado a partir de folha de erva-mate representa uma boa alternativa para estudos de isolados de *Cylindrocladium*. Meios feitos a partir da planta hospedeira podem dar bons resultados. ALFENAS *et al.* (1979), obtiveram boa produção de peritécios em meio com pedaços de ramo de *E. urophylla*. O meio (CHDA) preparado a partir de erva-mate processada para chimarrão (produto comercial), embora tenha resultado em baixas taxas de crescimento de colônia, permitiu após lavagem, assim como os meios AVDA e EMDA, alta taxa de esporulação.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPA

O meio BDA embora muito utilizado para manutenção e esporulação de *Cylindrocladium* apenas permitiu crescimento micelial medio, com baixa esporulação. A variação de resposta de esporulação pode ser dependente da espécie. ALFENAS *et al.* (1979) verificaram boa esporulação em BDA para *C. crotalariae* e *C. scoparium*, enquanto *C. ilicola* teve esporulação escassa.

O meio de extrato de malte muito embora seja utilizado como padrão para estudos de crescimento de colônias de *Cylindrocladium* (CROUS & WINGFIELD, 1994), propiciou a formação de micélio ralo e ausência de esporulação.

No que se refere as características morfológicas, dimensões, número de septos de conídios e formato de vesículas, as leituras foram efetuadas a partir de conídios produzidos sobre folhas destacada inoculadas artificialmente, isto por que o meio de cultura afeta tais características. Segundo HUNTER & BARNETT (1978), os efeitos de fatores tróficos e comprimento de onda parecem ter pouca importância para a determinação de espécies de *Cylindrocladium*. Descartam, também, o critério forma da vesícula, como

taxonomicamente importante, atribuindo maior valor para características do conídio. Estas colocações estão longe de um consenso. Para MOREIRA *et al.* (1991) estudos com colônias de diferentes idades e diferentes meios de cultura demonstraram a estabilidade do formato da vesícula e número de septos de conídios. É importante ressaltar que muito embora variações nas dimensões de conídios possam ser significativas do ponto de vista estatístico, em termos taxonômicos podem ser irrelevantes por estarem dentro da faixa aceita para a espécie (MOREIRA *et al.*, 1991; ORREGO FUENTE *et al.*, 1996).

Para erva-mate a espécie aceita como causadora de mancha foliar é *Cylindrocladium spathulatum* (AUER & GRIGOLETTI, 1995). Segundo CROUS & WINGFIELD (1994) esta espécie apresenta, em meio de folha de cravo (CLA), conídios cilíndricos, hialinos com 1 a 3 septos (principalmente 1), com comprimento variando de 48 a 75 μm com média de 58 μm . A largura variando de 4 a 6 μm , com média de 5 μm . Apresenta estipe septada, terminando em uma vesícula de forma clavada a espatulada, que apresenta um diâmetro da ordem de 3 a 9 μm , com média de 6 μm . MOREIRA *et al.* (1991) descreveram variação do comprimento de conídios de 26,4 μm (em folha de eucalipto) até 65,8 μm (em BSA – batata-sacarose-ágar) e largura variando de 2,1 μm (em folha de eucalipto) até 6,3 μm (em BSA). Assim, os dados deste trabalho estão dentro da faixa aceita para a espécie *Cylindrocladium spathulatum* (El-Gholl, Kimbrough, Barnard, Alfieri & Schoulties). Esta espécie é formadora de estruturas de resistência do tipo microesclerócios formadas pelo encadeiamento de clamidosporos (figura 5D). A forma teleomórfica descrita é denominada *Calonectria spathulata* (El-Gholl, Kimbrough, Barnard, Alfieri & Schoulties). No presente trabalho foi verificado, tanto em meio de cultura quanto em folhas inoculadas, a formação de estruturas globosas de coloração alaranjada-avermelhada muito parecidas com as descrições de peritécio, contudo não foi possível a observação de ascósporos. Talvez a ausência de ascósporos seja devido à falta de algum estímulo ambiental para a formação destes, como, por exemplo a queda de temperatura.

No que se refere ao desenvolvimento da doença, muitos dos aspectos e sintomas no patossistema erva-mate–*Cylindrocladium spathulatum* são semelhantes aos descritos para outras interações do gênero *Cylindrocladium* com essências florestais. CRUZ & FIGUEIREDO (1961) descreveram em inoculações em *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus*

alba com *C. scoparium* o aparecimento, em folhas, de pequenas manchas difusas que coalesciam tomando grande área das folhas, estas posteriormente se destacavam da planta. ALFENAS *et al.* (1979), também em *Eucalyptus*, inoculados com *Cylindrocladium*, observaram o desenvolvimento na superfície foliar, de pontos escuros, que se tornavam irregularmente circulares e que coalesceram formando lesões. ALFENAS (1986) descreve os sintomas de manchas foliares como sendo semelhantes, independente da espécie de *Cylindrocladium* (*C. crotalariae*, *C. ilicola*, *C. scoparium*, *C. quinqueseptatum* e *C. theae*). Este autor relata que durante períodos chuvosos prolongados, o patógeno é capaz de colonizar grande parte do limbo foliar provocando intensa desfolha, resultando em redução da área fotossintética, e provavelmente, afetando o crescimento da planta. FERREIRA *et al.* (1995) descrevem para *E. grandis* severa desfolha e mancha foliar causada por *C. pteridis*. Queda anormal de folhas em erva-mate causada provavelmente por *Cylindrocladium* foi discutida por CARPANEZZI *et al.* (1983).

Quanto aos sinais da doença é possível se observar na região da mancha, na face abaxial, a presença de conidióforos de coloração esbranquiçada similar ao descrito por ALFENAS (1986); FERREIRA *et al.* (1995).

Quanto às respostas observadas em mudas de diferentes idades, tanto a incidência quanto a severidade sendo mais elevadas em mudas mais jovens, BLUM *et al.*, (1994) em trabalho sobre tombamento em mudas de *Eucalyptus*, discutem o tamanho de muda ideal para a avaliação de resistência, demonstrando o efeito da concentração do inóculo como da idade da planta na expressão da resistência. No caso de tombamento quanto maior a muda também maior é a resistência a doença.

Os dados aqui obtidos quanto a capacidade de *Cylindrocladium spathulatum* causar mancha foliar em diferentes espécies de *Ilex* e *Eucalyptus* pode ser consequência de mecanismo não muito específicos de patogênese. O fato da doença apenas ocorrer em inoculações na face abaxial (figura 5C), e estômatos apenas serem observados nesta mesma face (fig 5A, 5B), sugerem um mecanismo de penetração estomática. Assim as evidências de penetração estomática em *Ilex paraguariensis* devem ser validas para as outras espécies, pois em nenhuma espécie o patógeno foi capaz de penetrar pela epiderme superior da folha. As espécies de *Cylindrocladium* além de causarem manchas foliares em várias espécies de *Eucalyptus* também causam manchas em *Swietenia macrophylla* (ALFENAS, 1986),

queima de acículas com desfolha em *Pinus* sp. (HODGES *et al*, 1975) e outras espécies de *Ilex*: *I.cornuta*, *I. crenata*, *I.opaca*, *I.vomitória* (GILL *et al.*, 1971).

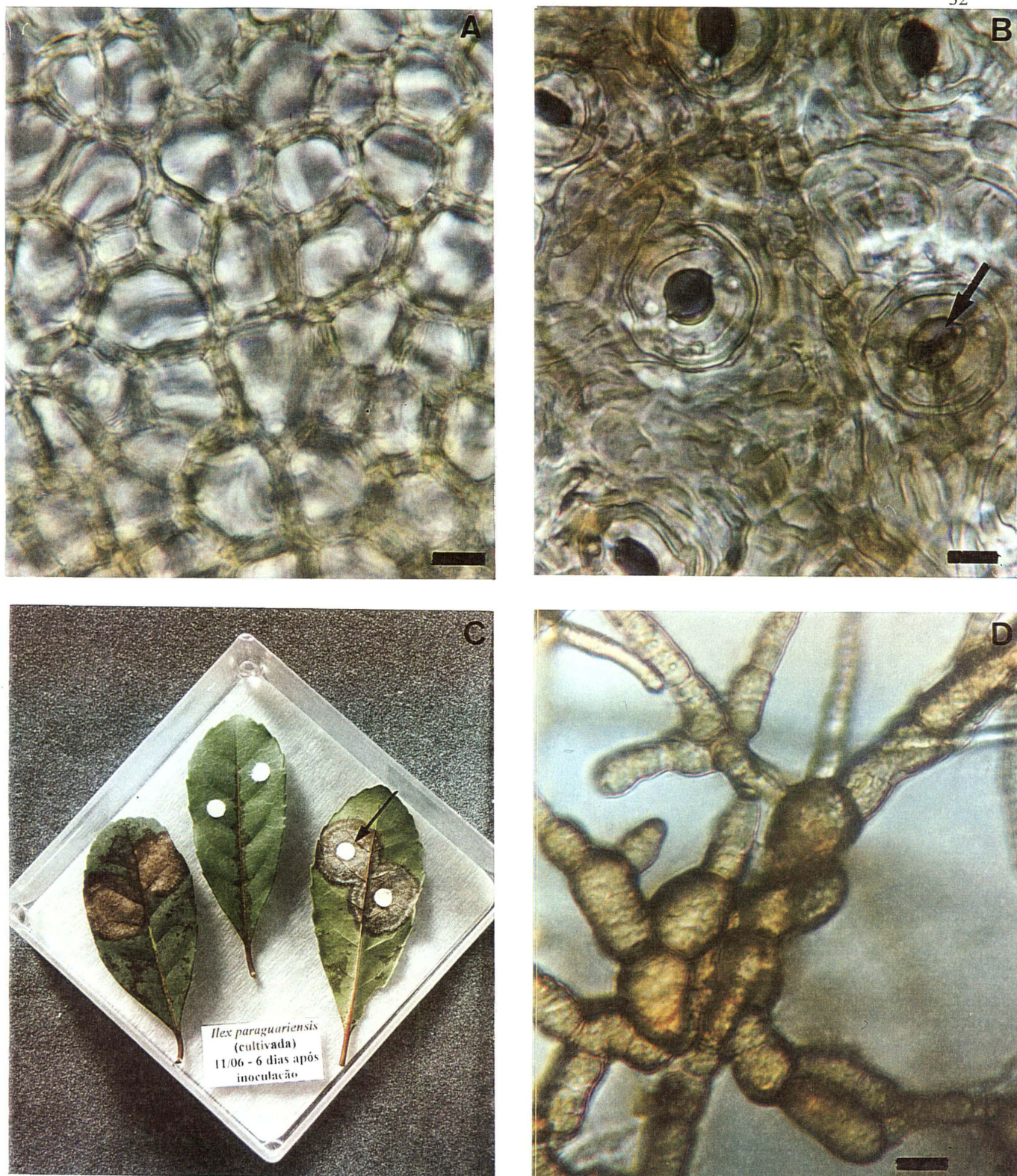


Figura 5. A) Face adaxial de folha de *Ilex paraguariensis*; B) face abaxial de folha de *I. paraguariensis*, seta indicando estômato; C) inoculação de *C. spathulatum* com disco de papel filtro em folhas de *I. paraguariensis* destacadas. Seta indica ponto de inoculação. D) microesclerócio de *C. spathulatum*. Barra = 10 μ m.

6. CONCLUSÕES

Os isolados *Cylindrocladium spathulatum* das regiões de Colombo, São Mateus, Guarapuava, Ivaí e Cascavel foram patogênicos a *Ilex paraguariensis*, sendo capazes de causar sintomas de mancha foliar em mudas e folhas destacadas de plantas adultas.

C. spathulatum foi capaz de causar mancha foliar em outras espécies florestais de *Ilex* e *Eucalyptus*, além de *Ilex paraguariensis*

Os meios de cultura a base de aveia e folha de erva-mate revelaram-se adequados para manutenção de culturas de *C. spathulatum*, propiciando boa produção de inóculo.

O mecanismo de penetração de *C. spathulatum* deve ser via estômato, sendo incapaz de penetrar pela epiderme da face adaxial do limbo foliar.

Foram observadas diferenças quanto à esporulação e crescimento de colônia entre os isolados, estas diferenças devem ser melhor comparadas, pois podem ser resultado da variabilidade encontrada dentro de cada isolado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, A.K.; FERREIRA, F.A.; HODGES, C.S. Identificação, características culturais e patogenicidade de três espécies de *Cylindrocladium*, isoladas de manchas de folha de *Eucalyptus* spp. **Fitopatologia Brasileira**. v.4. p.445-459. 1979.
- ALFENAS, A.C. Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos florestais, no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. v.11. p.275-277. 1986.
- AUER, C.G.; GRIGOLETTI, A.Jr. Doenças da erva-mate. **Summa Phytopathologica**. v.21. p.195-198. 1995.
- BLUM, L.E.B.; DIANESE, J.C.; FERREIRA, S.B.R.S. Padronização da metodologia para a avaliação da resistência de eucalipto ao tombamento e à mancha foliar causados por *Cylindrocladium*. **Fitopatologia Brasileira**. v.19. p.11-16. 1994.
- CARPANEZZI, A.A.; CARDOSO, A.; VALIO, I.F.M.; GRAÇA, M.E.C.; IEDE, E.T.; HIGA, R.C.V. Queda anormal de folhas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). In SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, Silvicultura da erva-mate. **Anais**. Curitiba: URPFC, 1983. p.141-145.
- CROUS, P.; WINGFIELD, M.J.A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. **Mycotaxon**. v.51. p.341-435. 1994.
- CRUZ, B.P.B., FIGUEIREDO, M.B. Importância do fungo *Cylindrocladium* na cultura do Eucalipto. **O Biológico**. v. 27. p.106-108. 1961.
- FERREIRA, F.A. Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, Sociedade Brasileira de Investigações Florestais. 1989. 570p.
- FERREIRA, F.A.; ALFENAS; A.C.; MOREIRA; A.M.; DEMUNER. N.L. Mancha-de-pteridis - doença foliar de eucalipto em áreas tropicais brasileiras. **Fitopatologia Brasileira**. v.20. p.107-110. 1995.
- GILL, D.L.; ALFIERI, S.A.Jr.; SOBERS, E.K. A new leaf disease of *Ilex* spp. caused by *Cylindrocladium avesciculatum*. sp. nov. **Phytopathology**. v.61. p.58-60. 1971.
- GRIGOLETTI, A. Jr.; AUER, C.G.; Doenças da erva-mate: identificação e controle. Circular Técnica. n. 25. Colombo: EMBRAPA/CNPF. 1996. 18p.
- HODGES, C.S.; MAY, L.C. A root disease of pine, *Araucaria* and *Eucalyptus* in Brazil caused by a new species of *Cylindrocladium*. **Phytopathology**. v.62. p. 898-901. 1972.

- HODGES, C.S.; REIS, M.S.; FERREIRA, F.A. Uma nova enfermidade de acículas de *Pinus* sp. no Brasil, causada por *Cylindrocladium pteridis*. **Brasil Florestal**. v.6. p.8-11. 1975.
- HOMECHIN, M.; KRÜGNER, T.L. Avaliação da patogenicidade de três isolados de *Cylindrocladium clavatum* Hodges & May em árvores de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barret & Golfari e *P. oocarpa*. **Summa Phytopathologica**.v.6. p.107-115. 1980.
- HUNTER, B.B.; BARNETT; H.L. Growth and sporulation of species and isolates of *Cylindrocladium* in culture. **Mycologia**. v.70. p. 614-635. 1978.
- MOREIRA, A.M.; ALFENAS, A.C.; REGAZZI, A.J. Efeito do substrato e da idade da cultura sobre o formato da vesícula, número de septos e dimensões de conídios de *Cylindrocladium* ssp. **Fitopatologia brasileira**. V.16. p. 54-59. 1991.
- ORREGO FUENTE, A.L.; MENEZES, M.; OLIVEIRA, S.M.A.; COELHO, R.S.B. Análise comparativa de caracteres patogênicos e fisio-morfológicos para identificação de espécies de *Cylindrocladium*. **Summa Phytopathologica**. v.22. n.2. p. 127-133. 1996.
- PASCHOLATI, S.F.; MORAES, W.B.C.; FIGUEIREDO, M.B.; OLIVEIRA, A. R. Efeito da temperatura e idade da cultura na germinação, crescimento micelial e esporulação de *Mycosphaerella melonis* (Pass) Chiu & Walker. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.8. p.109-11. 1983.
- REIS, M.S. Crescimento do micélio de *Cylindrocladium scoparium*, Morgan, em meio líquido de cultura contendo sete diferentes fontes de carbono. **Brasil Biológico**. v. 26. p..329-334. 1966.
- ROWE, R.C., BEUTE, M.K. Variability in virulence of *Cylindrocladium crotalariae* isolates on peanut. **Phytopathology**, v.65. p.422-425. 1975.