

ISOLAMENTO, CULTIVO E ESPORULAÇÃO DE *Microcylus ulei*, AGENTE ETIOLÓGICO DO MAL-DAS-FOLHAS DA SERINGUEIRA^{1/}

Nilton T.V. Junqueira^{2/}
Geraldo Martins Chaves^{3/}
Laércio Zambolim^{3/}
Reginaldo da S. Romeiro^{3/}
Luadir Gasparotto^{2/}

1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores que têm limitado as pesquisas do mal-das-folhas da seringueira tem sido a dificuldade de obtenção, em laboratório, de inóculo do seu agente etiológico (*Microcylus ulei* (P. Henn.) v. Arx). A manutenção do inóculo «in vivo», mesmo em condições controladas, torna-se difícil pela rápida perda de viabilidade dos conídios e pelo aparecimento de microrganismos contaminantes, hiperparasitas e insetos micófagos, bem como pela grande possibilidade de mistura de inóculos, quando se manuseia elevado número de isolados.

Vários meios de cultura têm sido sugeridos para o crescimento desse fungo (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9), porém nenhum deles produz quantidade de conídios suficientes para estudos de resistência em condições controladas, variabilidade fisiológica e biologia do patógeno, em geral.

^{1/} Trabalho parcialmente financiado pela FINEP.

Recebido para publicação em 27-2-1984.

^{2/} EMBRAPA/CNPDS. Caixa Postal 319, 69000 Manaus, AM.

^{3/} Departamento de Fitopatologia da U.F.V. 36570 Viçosa, MG.

O objetivo deste trabalho foi estudar o crescimento e a esporulação da forma imperfeita de *M. ulei* (*Fusicladium macrosporum*) em vários meios de cultura e o efeito da idade da cultura sobre a esporulação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Técnica de Isolamento

Folículos de seringueira que exibem lesões recém-esporuladas com a fase conidial de *M. ulei* foram coletados e examinados com binocular estereoscópica. Depois de verificar que a lesão em estudo estava aparentemente livre de fungos contaminantes, tocava-se levemente a massa de esporos sobre a lesão com estilete, de ponta fina (200-300 μ m de diâmetro), flambado, de modo que alguns conídios e/ou conidióforos ficassem aderidos à sua ponta. Os conídios e/ou conidióforos aderidos à ponta do estilete eram transferidos para tubos de ensaio que continham 5 ml do meio de cultura M.1, M.3 ou M.4 (descritos no item 2.4), acrescidos de 150 mg de cloranfenicol (1 ml de quemicitina, p.a. - 15%, uso veterinário) por litro de meio de cultura.

Entre 10 e 25 dias após o isolamento, surgiram pequenas colônias, inicialmente claras, mais tarde escuras, que eram repicadas no máximo 10-20 dias após seu aparecimento, antes da formação dos estromas, que poderiam retardar o desenvolvimento da cultura repicada.

2.2. Técnicas de Repicagem

Fragmentos de cultura de *M. ulei*, com 12 dias de idade, mantidos no meio de cultura M.4, foram macerados em tubos de ensaio, utilizando-se bastão de vidro flambado, na proporção de 1 grama de cultura com micélio, conídios e/ou conidióforos para 10 ml de água destilada esterilizada, acrescida de cloranfenicol (50 mg do p.a./l ou 50 ppm). Uma alíquota de 1 ml dessa suspensão foi retirada, depositada em frascos (Erlenmeyers) de 500 ml, que continham 100 ml de meio de cultura sólido (item 2.4), e espalhada por toda a superfície do meio. Quando se utilizaram tubos de ensaio, os fragmentos de cultura foram pressionados contra a parede do tubo, até a maceração completa, e espalhados sobre a superfície do meio de cultura contido no mesmo tubo. Os frascos ou tubos de ensaio foram incubados a 24°C, em luz alternada (ciclos de uma hora-luz a 2000 lux lâmpadas fluorescentes 40W, luz do dia), a intervalos de três horas, repetido três vezes, nas primeiras 9 horas, seguidos de 15 horas de escuro, até a avaliação.

2.3. Avaliação

A avaliação foi feita aos 9, 12, 15, 18 e 21 dias após a repicagem, determinando-se o peso do micélio seco, o número de conídios por frasco ou tubo de ensaio e o número de conídios por miligrama de micélio seco. Para determinar o número de conídios, adicionou-se aos frascos ou tubos de ensaio um volume conhecido de água destilada, com tween-80, a 0,05%. A seguir, os conídios foram removidos com pincel n.º 14, filtrados em gaze fina e quantificados, com o uso da câmara de Neubauer.

Para determinar o peso do micélio seco, adicionou-se aos frascos ou tubos de ensaio que continham as culturas certo volume de água, e essa mistura foi submetida a 90-100°C, durante 10 minutos, até a fusão do ágar. O micélio foi recolhido após a filtração do meio em gaze fina e mantido a 70°C durante 24 horas, antes da pesagem.

2.4. Meios de Cultura Utilizados

Os ingredientes dos meios de culturas, apresentados no Quadro 1, foram preparados para um litro de água destilada ou para um litro de água de batata cozida.

A ração Bonzo foi misturada aos fragmentos de batata, cozidos durante 35 minutos. O extrato foi filtrado em gaze fina e o volume foi completado para um litro.

Os produtos (Procavit ou Panvit), na forma de drágeas, foram adicionados em água destilada, esterilizada a 70-80°C, com 24 horas de antecedência, para dissolução das drágeas. A suspensão ou solução-estoque desses produtos ou dos aminoácidos pode ser armazenada em congelador.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento

Os conídios retirados de lesões recém-esporuladas apresentam maior viabilidade e menos contaminantes, aumentando a vantagem dos isolamentos. Quando folíolos com lesões recém-esporuladas foram coletados e o isolamento foi feito no mesmo dia, o índice de recuperação dos tubos de ensaios foi de 70-80%; os mesmos folíolos, herbarizados e mantidos em condições de ambiente durante 15 dias, apresentaram índice de recuperação de 10-15%, apenas. Caso semelhante ocorreu quando folíolos com lesões esporuladas foram mantidos na planta em casa de vegetação, o que possibilitou a recuperação durante 22 dias. O aparecimento de fungos contaminantes depois de 22 dias limitou o isolamento por esse processo.

3.2. Meios de Cultura

No Quadro 2 vêem-se os resultados referentes à produção de micélio seco, produção de conídios por frasco e produção de conídios/mg de micélio seco do isolado de *M. ulei* proveniente de Governador Valadares, MG, em diferentes meios de cultura e diferentes idades das culturas.

Verificou-se aumento do peso do micélio com o aumento da idade das culturas em todos os meios testados, aumento maior para as culturas com 18 ou 21 dias de idade mantidas nos meios M.18, M.17 e M.10 e menor para as mantidas no meio M.3.

A produção de conídios por miligrama de micélio seco foi maior nas culturas com 9 e 12 dias de idade, em todos os meios que apresentavam aminoácidos (treonina, cloridrato de lisina e triptófano), Panvit ou Procavit, em comparação com os meios M.15, M.16, M.17, M.18 e M.19. A produção de conídios foi também influenciada pela idade da cultura, obtendo-se maior produção em culturas com 12 ou 15 dias de idade na maioria dos meios. A menor produção de conídios ocorreu em culturas com 21 dias de idade. Considerando a produção de conídios/mg de micélio seco, verificou-se que a produção máxima foi obtida de culturas com 12 dias de idade mantidas nos meios M.3 e M.7, seguidos pelos meios M.4, M.5, M.9, M.8 e M.1. Para as culturas mantidas nos meios M.11, M.14, M.15, M.16 e M.19, a produção máxima de conídios foi obtida de culturas com 15 dias de idade.

As culturas mantidas nos meios M.15 (BSA — 0,5%) e M.16 (BSA — 0,2%), propostos por HOLLIDAY (4) e CHEE (3), produziram mais conídios aos 15 dias de idade. O meio M.15 produziu mais conídios que os meios M.16, M.17 e M.18, porém foi inferior aos demais. SCHRADER (9), utilizando o meio M.15, verificou maior

QUADRO 1 - Composição dos meios de cultura estudados

Componentes por litro	Ud	Meios de cultura																		
		M.1	M.2	M.3	M.4	M.5	M.6	M.7	M.8	M.9	M.10	M.11	M.12	M.13	M.14	M.15	M.16	M.17	M.18	M.19
Sacarose	g	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	5,0	2,0	10,0		
Agar	g	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	12,0	12,0	15,0	15,0	10,0
NH_4PO_4	g	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0					20,0
Leitão	g	250,0	250,0		250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	100,0	200,0	200,0	250,0
Funvit ¹	ml	1,5***		2,0***	1,5	2,0		1,5			1,5***	1,5	2,0	2,0***						
Cloranfenicol	ppm	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0					
Procavita ²	Drágea	0,5+0,5																		
Neopeptona	g			6,0		6,0							6,0	6,0						
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	g			1,0		1,0							1,0	1,0						
Treonina	mg														2,0					
Triptófano	mg					2,0			0,25	0,25				0,25						
Cloridrato de lisina	mg					0,25			0,25	0,25										
Tiamina	mg					10,0			10,0	10,0					10,0					
Fitona	mg									2,0***										
Ext. folhas novas de seringueira	g										3,0	3,0	3,0	3,0	3,0			5,0	5,0	
Ext. levedura	g																	4,0		
Ext. de malte	g																	0,5	0,5	
Peptona	g																	5,0	5,0	
$\text{Mg(NO}_3)_2$	g																	5,0	5,0	
K_2HPO_4	g																	1,0		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	mg																		0,3	
Reação Irmão	g																		5,0	
Glucose	g																			13,0
																				10,0

¹ Produto dietético produzido pelo laboratório Tecto-Brasileiro Ltda.

² Produto dietético produzido pelo laboratório EMS - Indústria Farmacêutica Ltda. Adicionam-se 0,5 drágeas amarela (vitaminas + aminoácidos) e 0,5 drágeas vermelha (minerais e outras substâncias) por litro do meio de cultura.

³ Adicionado após autoclavagem a 120°C, 1 atm, por 10 minutos.

0 ml dos meios foi ajustado para $5 \pm 0,2$.

QUADRO 2 - Produção de micélio seco e conídios de *Microvelvet ullei** em vários meios de cultura e em diferentes idades das culturas. Viçosa, dezembro de 1983

Meios de cultura	Peso do micélio seco/frasco de 500 ml (mg)					Conídios produzidos/frasco de 500 ml (x 10 ⁶)					Conídios produzidos/mg de micélio seco (x 1000)				
	Idade da cultura (dias)					Idade da cultura (dias)					Idade da cultura (dias)				
	9	12	15	18	21	9	12	15	18	21	9	12	15	18	21
M.1	202*	240	370	365	410	20,50	30,78	16,54	13,60	11,20	101	128	45	37	27
M.2	225	280	415	422	430	16,20	21,78	26,82	21,52	15,00	72	78	65	51	35
M.3	92	105	230	236	244	28,05	42,00	24,15	21,20	19,68	304	400	105	90	81
M.4	128	155	410	408	415	20,70	30,87	24,36	24,30	23,80	161	199	59	59	57
M.5	85	100	215	360	405	8,16	16,56	12,58	17,56	20,04	96	165	58	49	49
M.6	152	235	310	356	390	10,90	23,28	14,87	12,57	11,80	72	99	48	35	30
M.7	125	150	210	368	435	29,03	44,85	33,53	29,01	27,11	232	299	160	79	62
M.8	131	160	400	412	408	11,71	20,43	31,06	33,03	34,30	89	128	78	80	84
M.9	135	182	362	386	394	13,12	25,72	29,19	31,00	30,02	97	189	81	80	79
M.10	223	305	426	462	471	20,78	29,20	37,40	24,60	20,06	93	96	88	53	42
M.11	282	301	376	420	417	29,06	32,40	48,18	38,35	30,10	103	108	128	92	72
M.12	79	115	129	298	309	8,75	11,70	13,80	15,20	13,60	110	102	107	51	44
M.13	92	96	117	138	183	10,03	11,20	12,40	10,97	8,53	109	117	105	79	47
M.14	295	305	399	406	409	18,71	30,72	45,20	36,70	28,12	63	100	113	90	69
M.15	285	292	302	307	321	12,38	15,26	17,00	13,60	11,70	43	52	56	44	36
M.16	182	240	300	416	435	3,20	6,36	10,18	8,53	6,75	17	26	34	20	15
M.17	298	340	392	452	480	0,90	1,85	2,22	3,53	5,81	3	5	6	8	12
M.18	256	333	408	441	492	0,70	1,23	1,93	3,21	4,92	3	4	5	7	10
M.19	119	143	189	292	363	5,70	8,15	12,30	12,30	11,90	48	57	65	42	33

* Os números representam a média de quatro repetições.

** Isolado de *M. ullei* proveniente do município de Governador Valadares, MG.

crescimento micelial de *M. ulei* em culturas com 15 a 20 dias de idade e máxima esporulação em culturas com 16 a 18 dias de idade, sob iluminação.

Para os meios de cultura (M.17 e M.18) propostos por LANGDON (6), a máxima produção de conídios ocorreu em culturas com 21 dias de idade; essa produção foi inferior à dos demais meios testados. Por outro lado, a produção de micélio seco em culturas com 18 e 21 dias de idade, mantidas nesses meios, foi superior à dos demais meios testados. Segundo LANGDON (6), o BDA e a peptona estimulam a produção de estromas, e a fitona e o nitrato de amônio estimulam o crescimento radial. Quando a fitona foi adicionada aos meios M.3 (que possibilitou a produção máxima de conídios) e M.4, verificou-se um decréscimo na produção de conídios/mg de micélio seco (M.12 e M.13) em culturas com 9 e 12 dias de idade mantidas nesses meios. Para os demais meios, a fitona induziu ligeiro aumento do crescimento micelial.

Os componentes de Panvit (sais minerais, vitaminas e aminoácidos), testados isoladamente, mostraram que a treonina, o cloridrato de lisina e o triptófano aumentam a produção de conídios de *M. ulei*. Várias combinações de dosagens desses aminoácidos foram testadas. As combinações compostas de 10 mg de cloridrato de lisina/1, 0,250 mg de triptófano/1 e dosagens crescentes de treonina de 0,125 mg/l até 2 mg/l induziram a formação de conídios, daí terem sido incluídas nos meios M.6, M.8, M.9 (com tiamina) e M.14. Desses meios, o M.8, o M.9 e o M.14 produziram mais conídios/mg de micélio seco em culturas com 9 e 12 dias de idade. A adição de tiamina ocasionou ligeiro acréscimo na produção de conídios.

A máxima produção de conídios foi obtida de culturas com 9 e 12 dias de idade, mantidas nos meios M.3 e M.7, verificando-se baixa produção de micélio seco nesses meios, quando comparada à obtida de culturas mantidas nos meios M. 10, M.14, M.17 ou M.18, com produção de conídios inferior à dos meios M.3 e M.7. Observou-se que, em culturas com mais de 12 dias de idade, a produção de conídios decresce com o aumento do peso do micélio seco. Entretanto, o aumento da produção de micélio seco com a idade das culturas parece não estar biologicamente correlacionado com a queda na produção de conídios nessas culturas, visto ter sido observado que os conídios são liberados dos conidióforos e germinam na própria cultura, às vezes dando origem a frágil crescimento micelial, com conidióforos que produzem pouco e pequenos conídios elipsóides, sem septos, comuns em culturas com mais de 20 dias de idade. A germinação dos conídios na própria cultura concorre para o decréscimo de produção destes em culturas com mais de 15 dias de idade, visto que, para a maioria dos meios de culturas testados, o maior estímulo à produção de conídios parece ocorrer em culturas com 9 a 12 dias de idade. Além disso, tem sido relatado que a viabilidade dos conídios decresce em culturas com mais de 15 dias de idade (3, 5), certamente por auto-inibição (4).

No Quadro 3 vêem-se as médias dos resultados referentes à produção de conídios/mg de micélio seco de seis ensaios realizados em frascos ou tubos de ensaios, envolvendo isolados provenientes de Mazagão-AP, Rio Branco-AC, Humaitá-AM, Eirunepé-AM, Governador Valadares-MG e Jucuruaba-ES.

Os resultados seguiram a mesma tendência do ensaio anterior (Quadro 2), com pouca variação. Observou-se também que a produção máxima de conídios do isolado proveniente de Mazagão-AP, em culturas com 12 dias de idade, mantidas nos meios M.3, M.7 e M.8, foi de 46.000, 44.000 e 50.000 conídios/mg de micélio seco, respectivamente, ao passo que a produção de conídios do isolado proveniente de Jucuruaba-ES, nesses mesmos meios, foi de 504.000, 515.000 e 370.000, respectivamente, 10 vezes maior que no isolado de Mazagão. A produção dos demais isolados testados nesses meios ficou na faixa de 100.000 a 250.000 conídios/mg de micélio seco, não variando muito em relação ao isolado de Governador Valadares-MG (Quadro 2).

QUADRO 3 - Produção de conídios de *Microcyclus ulei* em diferentes meios de cultura. Viçosa, março a dezembro de 1983

Meios de cultura	Conídios produzidos/mg de micélio seco (x 1000)				
	Idade da cultura (dias)				
	9	12	15	18	21
M.1	58*	108	72	51	32
M.2	56	98	63	61	42
M.3	153	308	193	108	79
M.4	155	220	128	96	61
M.5	122	179	101	95	58
M.6	86	126	98	52	46
M.7	150	188	172	111	83
M.8	72	136	104	93	58
M.9	70	134	99	68	62
M.10	63	98	90	62	60
M.11	106	114	112	88	75
M.12	110	116	96	65	53
M.13	106	123	112	86	68
M.14	86	98	104	105	92
M.15	29	42	43	39	22
M.16	9	11	21	20	16
M.17	6	7	7	11	16
M.18	4	6	8	13	15
M.19	38	46	46	51	42

* Os números representam a média dos ensaios com quatro repetições, envolvendo isolados de Mazagão-AP, Rio Branco-AC, Humaitá-AM, Eirunepé-AM, G. Valadares-MG e Jucuruaba-ES.

Um fator importante, no cultivo de qualquer fitopatógeno, é a viabilidade do inóculo produzido. Segundo CHEE (3), os esporos mais velhos de *M. ulei* apresentaram menor capacidade de germinação. Esse autor verificou que conídios com sete dias de idade apresentavam 55-65% de germinação, e apenas 15% em culturas com três semanas. JUNQUEIRA *et alii* (5) verificaram que conídios de *M. ulei* provenientes de culturas com 10, 12, 14, 16 e 18 dias de idade, mantidas no meio M.4, apresentaram 76%, 68,5%, 62,5%, 36,4% e 8,2% de germinação, respectivamente. Dessa forma, os conídios utilizados em inoculações, ou outros trabalhos, em que sua viabilidade seja importante devem ser retirados de culturas com até 12 dias de idade.

Dentre os meios de cultura estudados, os que induziram maior esporulação em culturas com 9 e 12 dias de idade foram o M.3 e o M.7, seguidos de M.4, M.1, M.9, M.5, M.8, M.10, M.11, M.12, M.13 e M.14. Destes, o M.3 foi o melhor, mas a adição de Panvit, após a autoclavagem, dificultou o trabalho em tubos de ensaios ou frascos; o mesmo aconteceu com os meios M.1 e M.13. Nesse caso, os meios M.7, M.4, M.5, M.8, M.9 e M.14 foram mais acessíveis. No caso de indisponibilidade de Panvit ou Procavit, os meios com aminoácidos (M.9, M.8 e M.14) poderão ser utilizados com sucesso. Quando Panvit, na forma de drágea, foi adicionado ao meio (0,5 drágea/l), após a autoclavagem, verificou-se um estímulo à produção de coní-

dios. Entretanto, a autoclavagem desse produto na forma de drágea, juntamente com o meio de cultura, é desaconselhável, por causar fungitoxidez.

As culturas de alguns isolados nesses meios de cultura variaram no aspecto morfológico. Culturas do isolado proveniente de Rio Branco-AC apresentaram coloração marrom-oliva (Figura 1A), tornando-se marrom-oliva com pontos miceliais brancos depois de repicadas 15 vezes (Figura 1D). Os pontos miceliais brancos, provavelmente, seriam um caso de aneuploidia. Uma das culturas de isolados provenientes de Mazagão-AP apresentou coloração palha (Figura 1B), ao passo que as demais apresentaram cor verde-oliva (Figura 1C), cinza ou amarelo-pálida.

O sucesso no cultivo e esporulação de *M. ulei* depende da técnica de repicagem e da idade da cultura. Dessa forma, as repicagens devem ser feitas de culturas com menos de duas semanas de idade, porque as repicagens de culturas velhas ou de estromas sem micélio podem retardar o desenvolvimento da cultura subsequente ou reprimir a produção de micélio ou esporulação (5). JUNQUEIRA *et alii* (5) verificaram que repicagens de culturas de *M. ulei* com 10 e 12 dias de idade induziram rápido crescimento micelial e maior esporulação na cultura subsequente que as resultantes de culturas com mais de 20 dias de idade.

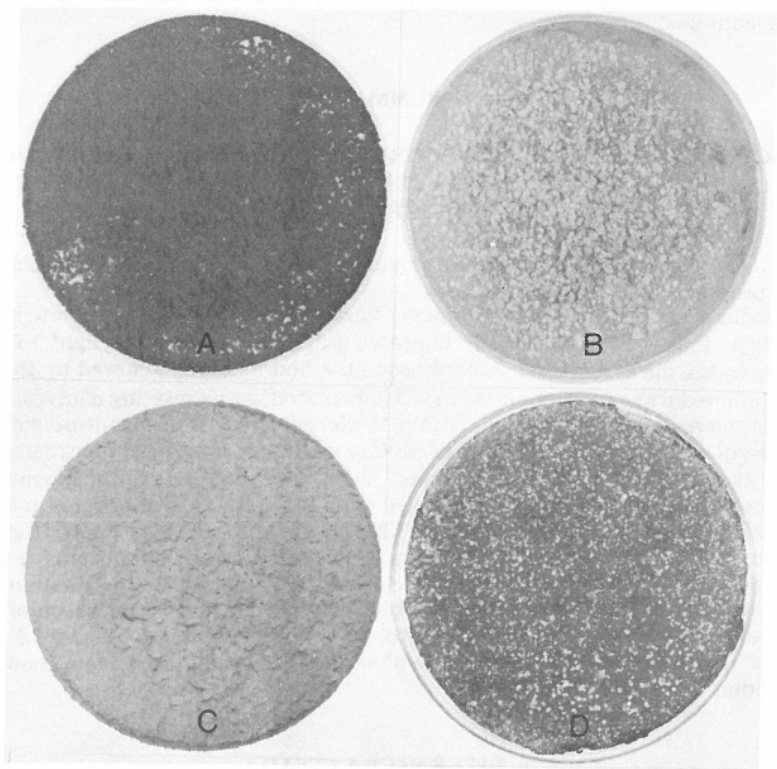


FIGURA 1 - Culturas de *Microcyclus ulei*, com 15 dias de idade, mantidas no meio de cultura M.3. A. Isolado proveniente de Rio Branco-AC, após cinco repicagens; B. Isolado proveniente de Mazagão-AP; C. Isolado proveniente de Humaitá-AM; D. Isolado proveniente de Rio Branco-AC, após 15 repicagens.

4. RESUMO

Estudou-se o desenvolvimento e produção de conídios de *Mycrocyclus ulei* em diferentes meios de cultura. A repicagem foi feita com o emprego de um mercado que consistia em fragmentos de micélio e conídios provenientes de culturas com 12 dias de idade. A temperatura de incubação foi de 24°C, em regime de luz alternada (ciclos de uma hora de luz a 2000 lux - lâmpadas fluorescentes - 40W - luz do dia), a intervalos de três horas, repetido três vezes, nas primeiras 9 horas, seguidos de 15 horas de escuro. A avaliação foi feita aos 9, 12, 15, 18 e 21 dias após a repicagem, determinando-se o peso do micélio seco e a produção de conídios/mg de micélio seco. A produção máxima de conídios foi obtida de culturas com 12 dias de idade, mantidas no meio de cultura que continha 6 g de neopeptona, 10 g de sacarose, 2 g de KH_2PO_4 , 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g de ágar e 2 ml de Panvit (complexo de sais mineirais, vitaminas e aminoácidos). O Panvit foi adicionado depois da autoclavagem do meio. O pH foi ajustado para $5 \pm 0,2$. Os meios que continham 10 g de sacarose, 20 g de ágar, 2 g de KH_2PO_4 e 250 g de batata/1000 ml de água destilada, acrescidos de 13 g de Bonzo (Dog food) e 1,5 ml de Panvit, adicionado antes ou depois da autoclavagem do meio, pH = $5 \pm 0,2$, também induziram boa formação de conídios.

5. SUMMARY

(ISOLATION, CULTURE AND SPORULATION OF *Mycrocyclus ulei*, CAUSATIVE AGENT OF SOUTH AMERICAN LEAF BLIGHT OF HEVEA RUBBER TREES)

This study was undertaken to evaluate several culture media to enhance spore production of *Mycrocyclus ulei*.

Media were incubated in Erlenmeyer flasks at 24°C under an alternate regime of light periods (1 hr under a 40 W, fluorescent light, at 2000 lux, daylight, followed by 3 hr in the dark, repeated three times in the first 9 hours), followed by 15 hours in complete darkness. Each medium was inoculated with a mixture of mycelia and conidia harvested from a twelve-day old *M. ulei* culture. For each culture medium, dry weight of mycelia and number of conidia per mg of dry weight of mycelia were taken at nine, twelve, fifteen, eighteen and twenty-one days after inoculation. Maximum yield of conidia was obtained from a twelve-day old culture medium containing 6 g neopeptone, 10 g sucrose, 2 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g agar, and 2 ml of 'Panvit', a complex of mineral salts, vitamins and aminoacids. 'Panvit' was added to the medium after autoclaving, and the pH of the medium was adjusted to 5 ± 0.2 . Another culture medium with a per liter composition of 10 g sucrose, 2 g K_2HPO_4 , 0.25% w/v potato, 13 g of 'Bonzo' dog food and 1.5 ml of 'Panvit' (the latter added either before or after sterilization) also gave a good yield of conidia.

6. LITERATURA CITADA

1. BLASQUES, C.H. & OWEN, J.H. Physiological studies of *Dothidella ulei*. *Phytopathology*, 47:727-732. 1957.
2. BROOKSON, C.W. Behavior of *Dothidella ulei* in culture. In: *Rubber Res. Inst. Malaya Ann. Rep.*, 1962. p. 64-66.

3. CHEE, K.H. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: culture of *Microcyclus ulei*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 70:341-344. 1978.
4. HOLLIDAY, P. South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. *Phytopathological Papers*, 12:1-31. 1970.
5. JUNQUEIRA, N.T.V., CHAVES, G.M., ZAMBOLIM, L. & GASPAROTTO, L. Fatores que afetam o desenvolvimento, esporulação e patogenicidade de *Microcyclus ulei*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (Em vias de publicação).
6. LANGDON, K.R. Development of a new medium for culturing *Dothidella ulei* in quantity. *Phytopathology*, 56:564-565. 1966.
7. LANGFORD, M.H. *South American leaf blight of Hevea rubber trees*. Washington, U.S.D.A., 1945. 31 p. (Technical Bulletin n.º 882).
8. MILLER, J.W. «In vitro» production of toxin by *Dothidella ulei*. *Phytopathology*, 56:718-719. 1966.
9. SCHRADER, A. *Cyanideinfluss auf Sporenkeimung und Mycelent wicklung bei Microcyclus ulei, dem Erreger der Südamerikanischen Blattkrankheit auf Hevea*. Braunschweig, Botan. Inst. TU, 1980. 54 p. (Diplomarbeit).