

Caracterização isoenzimática e efeitos de fontes de carbono e nitrogênio na morfologia e fisiologia de espécies de *Fusarium oxysporum*

Andréa Maria André GOMES^{1*}; Viviane Jurema L.B. RODRIGUES^{1**}; Elineide Barbosa da SILVEIRA^{1**}; Tereza Cristina de ASSIS^{1**}; Sônia Maria Alves OLIVEIRA¹

RESUMO: Estudou-se o efeito de fontes de carbono (C) (frutose, sacarose, glicerol e dextrose) e nitrogênio (N) (caseína, nitrato de cálcio, sulfato de amônio e peptona) em regime de luz contínuo a 25±2°C, sobre a morfologia e fisiologia de um isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (FOC) e um de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP). Foram analisadas as variáveis dimensão dos conídios, crescimento micelial, esporulação e peso seco. Também se realizou análise eletroforética nos padrões de esterase e proteínas totais. Os resultados mostraram semelhanças no fenótipo das colônias na maioria das interações entre as fontes de C e N utilizadas para ambos isolados. O melhor crescimento micelial ocorreu na interação onde o glicerol estava presente para os dois isolados. Não houve variação entre as fontes de C e N em relação a esporulação de FOP. Já para FOC a interação peptona x frutose destacou-se como a melhor combinação de C para este isolado. Os macroconídios de FOC apresentaram uma variação de 17,00-21,25 µm x 3,19-6,19 µm, e os microconídios de 6,19-8,00 µm x 2,50-4,50 µm e para o FOP, os macroconídios apresentaram dimensões de 14,50-19,34 µm x 3,06-4,12 µm, enquanto os microconídios variaram de 6,75-9,56 µm x 2,31-2,94 µm. A interação dextrose x nitrato de cálcio propiciou o maior peso seco de FOC, enquanto que para FOP não houve diferença significativa entre as fontes de C e N utilizadas. Na correlação dos padrões de esterase e proteínas totais, observou-se que o isolado FOP exibiu alta atividade protéica como esterásica em relação ao isolado FOC. No entanto, FOC apresentou maior número de bandas e mobilidade relativa em relação ao FOP.

Palavras chave: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, podridão basal, murcha de fusário, nutrição, isoenzimas.

INTRODUÇÃO

A podridão basal, causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, é um dos principais problemas da cebola (*Allium cepa* L.), durante o armazenamento e transporte, manifestando-se inicialmente através do amarelecimento das pontas das folhas e progredindo para a base até atingir todo o limbo foliar (Havey, 1995). *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* é o agente causal da murcha do maracujazeiro (*Passiflora* spp.), deteriorando inicialmente a casca, depois penetrando no tecido lenhoso onde se expande pelos vasos, podendo ocasionar morte súbita da planta (Yamashiro, 1987; Pio-Ribeiro & Mariano, 1997).

A nutrição de microrganismos tem recebido considerável atenção como valioso recurso na demonstração dos elementos biologicamente essenciais. Como para todos organismos vivos, algumas substâncias são mais importantes para os fungos do que outras, como carboidratos, proteínas, vitaminas e alguns sais minerais (Assis *et al.*, 1997). O carbono (C) é um elemento requerido em maior quantidade pelos fungos de que qualquer outro elemento. Os fungos podem utilizar uma grande variedade de fontes de carbono, tais como monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos, ácidos orgânicos e lipídios, variando apenas o grau de eficiência no crescimento dos fungos (Robinson, 1978; Griffin, 1981). O nitrogênio (N) é bem utilizado pelos fungos na forma orgânica e de nitratos, sendo a forma nítrica comumente tóxica para a maioria das espécies, embora algumas sejam hábeis na sua utilização. O C participa com 45-55% do peso seco do micélio dos fungos, enquanto o N constitui 5-12% do total. Embora baixa a quantidade de N em relação ao C, esta

se torna elevada frente à dos demais elementos, sendo considerado como o segundo elemento em importância nutricional para os fungos (Hawker, 1950).

Isoenzimas têm contribuído significativamente para estudos de genética de população de muitos organismos por diversas décadas, embora apenas na última década tenham sido usadas extensivamente no estudo de genética de população de fungos (Old *et al.*, 1984; Fry *et al.*, 1992). A análise de isoenzimas é uma técnica usada por micologistas e fitopatologistas para obtenção de dados mais confiáveis na identificação de isolados conhecidos e na determinação da extensão da variação genética dentro e entre populações de fungos relacionados (Micales *et al.*, 1988). As isoenzimas detectam variação na seqüência de aminoácidos de moléculas de proteínas que tenham a mesma função catalítica e, dessa forma, detectam variação entre seqüências de DNA que codificam para proteínas (McDonald & McDermott, 1993).

A análise eletroforética de proteínas totais e isoenzimas de fungos pode ser realizada tanto nos tecidos vegetativos (micélio) e reprodutivos (conídios, endosporos, ascocarpos e basidiocarpos), sendo fundamental o emprego de um mesmo tipo de tecido para todas as culturas a serem comparadas (Alfenas *et al.*, 1991). Ainda, segundo os autores, os sistemas protéicos mais estudados são proteínas totais, esterase, malato desidrogenase, superóxido dismutase e peroxidase.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de fontes de carbono e nitrogênio sobre a morfologia e fisiologia de *F. oxysporum* f. sp.

¹UFRPE/DEPA-Fitossanidade, 52171-900, Recife/PE

^{*}Bolsista CAPES/FACEPE,

^{**}Bolsista CAPES.

cepae e *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, bem como a caracterização isoenzimática dos mesmos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Micologia, Área de Fitossanidade, Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foram utilizados os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) e *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP) obtido de plantas de cebola e maracujá, respectivamente, provenientes do município de Vitória de Santo Antão-PE.

Determinação do crescimento micelial. Discos de 4 mm de diâmetro de meio de cultura com crescimento ativo dos fitopatógenos, cultivados por oito dias em luz contínua, foram transferidos para o centro de placas de Petri, contendo meio basal de Lilly & Barnett (1951) (dextrose – 30g; asparagina – 1g; $MgSO_4$ - 0,5g; KH_2PO_4 - 1,5g; ágar - 17g e água destilada - 1000mL) com diferentes fontes de carbono (frutose=F; sacarose=S; glicerol=G; dextrose=D), fixando-se peptona com fonte de N, e diferentes fontes de nitrogênio (caseína=C; nitrato de cálcio=NC; sulfato de amônio=SA; peptona=P), fixando-se dextrose com única fonte de C, numa relação C/N de 10:1. Logo após as repicagens, as placas foram incubadas sob regime de luz contínua, fornecida por lâmpada fluorescente GE (General Electric) de 40w, em câmara incubadora B.O.D. (FANEN), com temperatura de $25\pm 2^\circ C$. As leituras foram realizadas diariamente em intervalos de 24h, medindo-se o crescimento micelial em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de régua milimetrada, até o fungo atingir o diâmetro completo da placa (90 mm) em qualquer um dos tratamentos.

Determinação da esporulação. Quando realizada a última leitura do crescimento micelial, determinou-se a quantidade de conídios com auxílio de hemacitômetro (câmara de Neubauer). Obteve-se a suspensão de esporos através da adição de 20mL de água destilada esterilizada, contendo o espalhante adesivo Tween 80 a 0,05%, na placa contendo o crescimento fúngico, seguido da raspagem da superfície do meio com auxílio de uma escova de cerdas macias, e posterior filtragem em camada dupla de gaze. Para cada repetição, obteve-se a média do número de esporos encontrados nos dois campos de leitura na câmara de Neubauer.

Determinação do tamanho dos esporos. Utilizou-se a suspensão obtida no item anterior, acrescentando três gotas do corante azul de Amann para inibir a germinação dos esporos, e

através de objetiva micrométrica mediu-se o comprimento e a largura de 50 microconídios e 20 macroconídios tomados aleatoriamente em cada preparação micrométrica.

Determinação do peso seco. Cultivou-se o fungo em meio basal de Lilly & Barnett (1951), excluindo-se o ágar, contendo as diferentes fontes de C e N, utilizando-se a relação C/N de 10:1. Discos de 4mm de diâmetro das culturas de FOC e FOP foram transferidos para Erlenmeyers de 250mL contendo 125mL das combinações em cultura líquida e incubadas em B.O.D. à temperatura de $25\pm 2^\circ C$ e regime de luz contínua. Os Erlenmeyers foram agitados manualmente, três vezes ao dia, para renovação do ar. Após oito dias, seu conteúdo foi filtrado em tecido de nylon e o material retido na malha colocado em recipientes de papel alumínio e secos em estufa a $80^\circ C$. Após 24h, procedeu-se a pesagem do peso seco em balança de precisão.

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2×7 (duas espécies de *Fusarium oxysporum* x sete combinações de CxN), com três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Para a variável esporulação, os dados foram transformados em $\log(x+1)$ e peso seco em \sqrt{x} .

Análise isoenzimática. Os isolados foram cultivados em Erlenmeyers contendo 500mL de meio líquido BD (batata-dextrose). Após seis dias de incubação a temperatura de $25\pm 2^\circ C$, o micélio foi filtrado, lavado com água destilada esterilizada e seco à temperatura ambiente. Da massa micelial seca, foram retirados 2g do micélio e triturados em almofariz, mantido sob banho de gelo, contendo 2mL de tampão tris-glicina a 0,125 M, pH 8,2, 300mg de sacarose e 300mg de polivinilpirrolidona (PVP). Após o processo, as amostras foram mantidas a $4^\circ C$, por um período de 4h, e filtradas em gaze para obtenção do extrato protéico (Alfenas *et al.*, 1998). Para a análise eletroforética foi utilizada uma placa de gel de poli(acrilamida) a 5% de AA/BIS (acrilamida e bisacrilamida). Com a polimerização completa do gel de poli(acrilamida), a placa foi colocada numa cuba horizontal contendo tampão tris-glicina a 0,125 M, pH 8,2, fazendo-se uso do "perfex" como ponte de conexão. Os extratos das espécies de *Fusarium* foram aplicados com auxílio de micropipetas, empregando-se 20 μ L em cada cavidade do gel. Em seguida, foi feita a corrida eletroforética a $4^\circ C$, durante 4h, mantendo-se a corrente constante a 10mA. O corante marcador utilizado

foi o azul de bromofenol (Alfenas & Brune, 1998). Para coloração de esterase, após a corrida, o gel foi retirado cuidadosamente da placa e submetido por uma hora, no escuro, a uma solução corante preparada com tampão fosfato a 0,1 M, pH 6,5 (100mL), alfa-naftil-acetato 1% (2mL) e fast blue (0,05g). Logo após, foi efetuada a fixação da cor com ácido acético por uma hora. Para detecção das proteínas totais foi utilizado o mesmo procedimento empregado para detecção de esterase, utilizando-se a solução corante de coomassie blue R250 ao invés de azul de bromofenol, durante 12 horas (Brune *et al.*, 1998). Para preservação, os géis foram colocados sobre papel celofane apropriado para eletroforese, ajustando-se a uma placa de vidro, e cobertos com outra folha de papel celofane. A secagem foi feita à temperatura ambiente por 24 horas (Alfenas *et al.*, 1998). A interpretação foi baseada no número, intensidade da cor e posição das bandas para esterase e proteínas totais. A mobilidade relativa (Rf) das bandas foi calculada pela fórmula descrita por Alfenas *et al.* (1991): $Rf = (d/D) \times 100$, onde: Rf=mobilidade relativa das bandas; d=distância percorrida pela molécula e D=distância percorrida pela linha frontal do corante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial e esporulação de um fungo são influenciados por fatores ambientais e nutricionais tais como luminosidade, umidade, aeração, concentração hidrogeniônica (pH), potencial solúvel do meio, fontes de carbono e nitrogênio, relação carbono/nitrogênio (C/N), dentre outros (Cochrane, 1958). Os resultados do presente trabalho mostraram que as diferentes fontes de carbono e nitrogênio interferiram na fisiologia de FOC e FOP.

Com relação ao efeito das fontes de carbono e nitrogênio no crescimento micelial observou-se que o melhor desenvolvimento ocorreu na interação peptona x glicerol para os dois isolados (FOC = 9,00cm e FOP = 8,67cm), embora sem diferir significativamente das interações peptona x frutose (8,32cm) e dextrose x caseína (8,75cm) para FOC e peptona x frutose (8,08cm), peptona x sacarose (8,12cm) e peptona x dextrose (7,97cm) para FOP. Foi verificada diferença estatística significativa entre o crescimento micelial dos dois isolados nos meio contendo sacarose, caseína e sulfato de amônio (Figura 1).

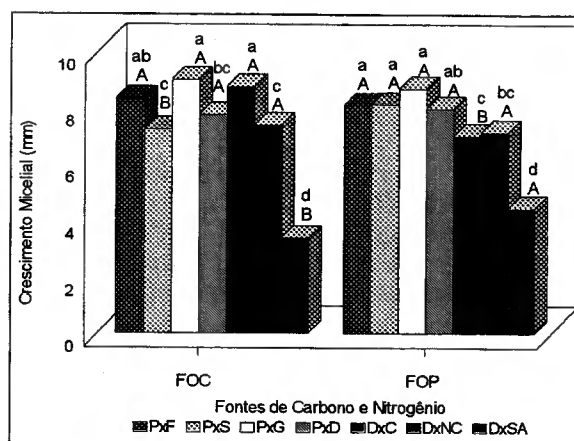


Figura 1 - Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (FOC) e *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP) em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, aos sete dias de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, minúsculas dentro da categoria e maiúscula entre categorias, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P > 0.05$). PxF (peptonaxfrutose); PxS (peptonaxsacarose); PxG (peptonaxglicerol); PxD (peptonaxdextrose); DxNC (dextrosexnitrato de cálcio); DxSA (dextrosexsulfato de amônio).

Para esporulação, não houve diferença significativa entre as fontes de C e N para o isolado de FOP, observando-se melhor esporulação na interação peptona x glicerol ($534,53 \times 10^5$ conídios/mL). No entanto, em relação a FOC a interação peptona x frutose ($207,76 \times 10^5$ conídios/mL) propiciou a melhor esporulação, diferindo significativamente das interações dextrose x nitrato de cálcio (5×10^5 conídios/mL) e dextrose x sulfato de amônio ($0,92 \times 10^5$ conídios/mL). Não houve diferença significativa entre a esporulação dos dois isolados em relação as fontes de C nas interações peptona x frutose e peptona x sacarose, e na fonte de N, na interação dextrose x caseína (Figura 2).

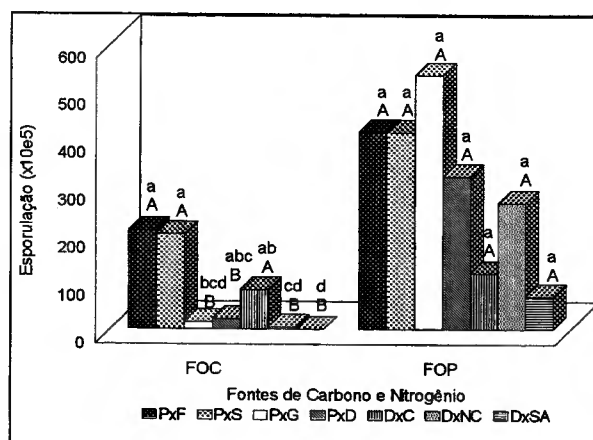


Figura 2 - Esporulação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) e *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP) em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, aos sete dias de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, minúsculas dentro da categoria e maiúscula entre categorias, não diferem

estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P>0.05$). Dados transformados em log ($x+1$). PxF (peptonaxfrutose); PxS (peptonaxsacarose); PxG (peptonaxglicerol); PxD (peptonaxdextrose); DxNC (dextrosexnitrato de cálcio); DxSA (dextrosexsulfato de amônio).

Os resultados demonstraram que as fontes que proporcionaram o melhor crescimento micelial também foram eficazes para esporulação de FOP, assemelhando-se ao afirmado por Barnett (1985) que a produção de estrutura de frutificação e esporulação ocorre no mesmo meio do crescimento micelial, demonstrando neste caso, haver poucas evidências sobre a necessidade de um nutriente específico que provoque a esporulação. Entretanto, segundo Griffin (1991) e Cochrane (1958), às vezes um excelente meio de cultura para o crescimento de determinado organismo poderá não ser o mesmo para produção de esporos e vice-versa, pois as condições nutricionais sob as quais os fungos esporulam são completamente diferentes daquelas julgadas ótimas para o crescimento vegetativo, sendo esta situação encontrada para FOC.

Em relação a dimensão dos conídios (Figuras 3 e 4), os macroconídios de FOC variaram de 17,00 a 21,25 μm x 3,19 a 6,19 μm e os microconídios de 6,19 a 8,00 μm x 2,50 a 4,50 μm . Para FOP os macroconídios apresentaram dimensões de 14,50 a 19,34 μm x 3,06 a 4,12 μm , enquanto os microconídios variaram de 6,75 a 9,56 μm x 2,31 a 2,94 μm . O maior comprimento de macroconídios em FOC foi observado na interação peptona x dextrose (19,87 μm), sem diferir significativamente das outras interações. Em FOP, o maior crescimento foi observado na interação peptona x frutose (19,34 μm) diferindo estatisticamente apenas das interações peptona x dextrose (14,50 μm) e peptona x glicerol (14,50 μm). Em relação aos microconídios, não foi observada diferença significativa entre as interações para FOC e FOP. A largura de macroconídios de FOC foi maior na interação dextrose x caseína (6,19 μm), enquanto que em FOP, a maior largura foi observada em peptona x sacarose (4,12 μm), diferindo significativamente de peptona x glicerol (3,06 μm), dextrose x sulfato de amônio (3,12 μm) e dextrose x caseína (3,12 μm). Em relação aos microconídios, a maior largura de FOC foi detectada na interação dextrose x caseína (4,50 μm), diferindo apenas de peptona x glicerol (2,94 μm) e dextrose x nitrato de cálcio (2,50 μm). Para FOP não houve diferença entre as interações.

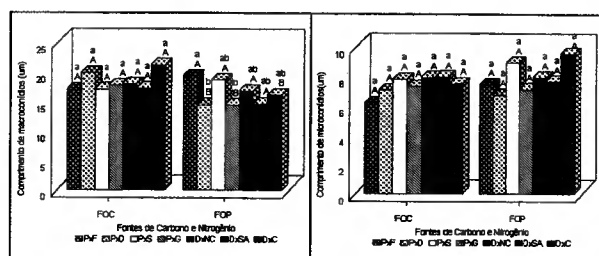


Figura 3 - Comprimento de macroconídios e microconídios de *Fusarium oxysporum* em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, aos sete dias de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, minúsculas dentro da categoria e maiúscula entre categorias, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P>0.05$). PxF (peptonaxfrutose); PxS (peptonaxsacarose); PxG (peptonaxglicerol); PxD (peptonaxdextrose); DxNC (dextrosexnitrato de cálcio); DxSA (dextrosexsulfato de amônio).

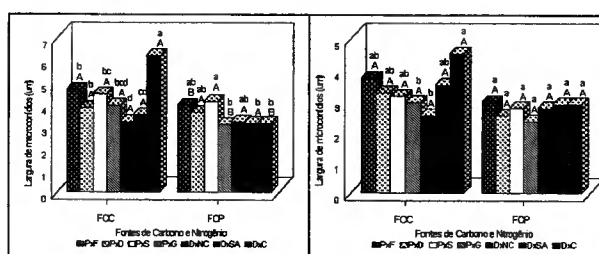


Figura 4 - Largura de macroconídios e microconídios de *Fusarium oxysporum* em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, aos sete dias de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, minúsculas dentro da categoria e maiúscula entre categorias, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P>0.05$). PxF (peptonaxfrutose); PxS (peptonaxsacarose); PxG (peptonaxglicerol); PxD (peptonaxdextrose); DxNC (dextrosexnitrato de cálcio); DxSA (dextrosexsulfato de amônio).

O maior peso seco de FOC foi observado na interação dextrose x nitrato de cálcio (0,18g), sem diferir significativamente de dextrose x caseína (0,15g) e peptona x glicerol (0,14g), enquanto que para FOP, não houve diferença significativa entre as fontes de C e N. O peso seco diferiu significativamente entre as duas espécies de *Fusarium* nas interações peptona x glicerol e dextrose x nitrato de cálcio (Figura 5).

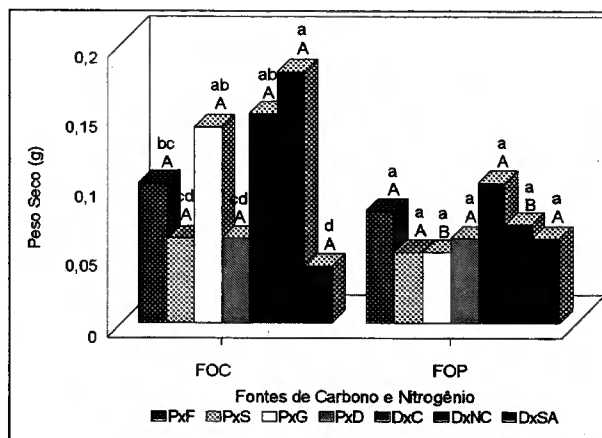


Figura 5 - Peso seco de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (FOC) e *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP) em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, aos sete dias de incubação. Colunas seguidas da mesma letra, minúsculas dentro da categoria e maiúscula entre categorias, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P > 0.05$). Dados transformados em \sqrt{x} . PxF (peptonaxfrutose); PxS (peptonaxsacarose); PxG (peptonaxglicerol); PxD (peptonaxdextrose); DxNC (dextrosexnitrato de cálcio); DxSA (dextrosexulfato de amônio)

De maneira geral, as condições que proporcionaram maior crescimento micelial não induziram a obtenção de maior peso seco. Segundo Cochrane (1958) e Griffin (1994), o peso seco é a maneira mais utilizada para avaliar o crescimento de fungos, porém a sua limitação é que pode refletir na acumulação de polissacarídeos ou materiais de reserva, ao invés da síntese de novo protoplasma.

Os resultados da análise eletroforética em gel de poliácridamida mostraram diferenças nos padrões de esterase e proteínas totais, quanto a intensidade, número de bandas e mobilidade relativa das mesmas, apresentadas por FOC e FOP, indicando uma base genética diferenciada para esses isolados. As distâncias de migração das bandas de esterase e proteínas totais, também indicaram comportamento diferente de atividade enzimática, conforme mostrados nos zimogramas (Figura 6). Portanto, comparando-se os resultados da análise eletroforética dos isolados citados, FOP destacou-se por maior atividade enzimática em todos os padrões de esterase e proteínas totais ressaltando, desta forma, a importância da utilização desses marcadores na análise de fungos fitopatogênicos. Machado & Menezes (1997) consideram que a análise de isoenzima em fungos constitui uma ferramenta simples que serve para separar isolados diferentes, porém o aspecto morfológico pelo método tradicional é necessário para a denominação das espécies, mas o método de isoenzimas e, mais modernamente, o de marcadores moleculares servem para identificar as espécies com maior exatidão.

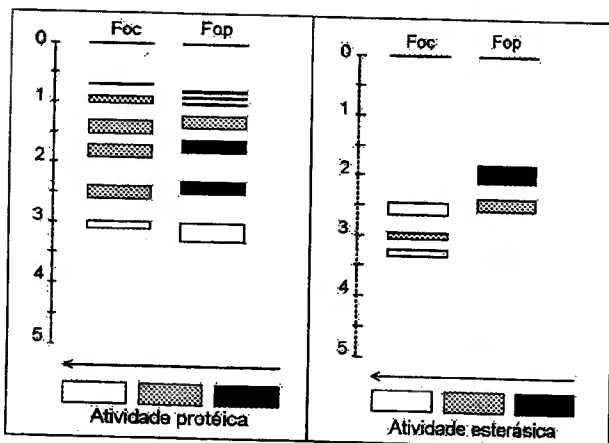


Figura 6 - Atividade protéica e esterásica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (Foc) e *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* (Fop), em gel de poliácridamida.

O conhecimento das condições adequadas que favoreçam o crescimento micelial e esporulação, revestem-se de fundamental importância em trabalhos de melhoramento visando a seleção de fontes de resistência às doenças e, também, estudos envolvendo a natureza da resistência, devido a grande quantidade de conídios necessárias para inoculações nas plantas testes (Woltz & Jones, 1981).

ABSTRACT

Isoenzyme characterization and effects of carbon and nitrogen sources on morphology and physiology of *Fusarium oxysporum* species

Research of the effects of carbon (C) (glucose, fructose, sucrose, glycerol) and nitrogen (N) (peptone, casein, calcium nitrate, ammonium sulfate) sources on the morphology and physiology of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (FOC) e um de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* (FOP) was carried out under continuous light and at a temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The mycelial growth, sporulation, dry weight and the conidia's dimension were the variables analyzed. A electroforetic analysis under esterase and total proteins pattern also took place. The results showed similarities on the colonies phenotype on most solid media used on both isolates. The medium that contained glycerol provided a better mycelial growth for both isolates. The FOC macroconidia varied from $17.00-21.25\mu\text{m} \times 3.19-6.19\mu\text{m}$ while the microconidia de $6.19-8.00\mu\text{m} \times 2.50-4.50\mu\text{m}$. The FOP macroconidia had a size of $14.50-19.00\mu\text{m} \times 3.06-4.12\mu\text{m}$ while microconidia varied from $6.75-9.56\mu\text{m} \times 2.31-2.94\mu\text{m}$. The FOP sporulation was not affected on the C and N sources, but in the FOC, the fructose turned out to be the best sources for this variable. The calcium nitrate provided the largest dry weight for the FOC, while for the FOP there was no significant difference between the C and N sources. Comparing the esterase and total protein patterns the FOP isolate showed a high proteic and esterasic activity when compared to the FOC isolate. On the other hand, the FOC isolate presented a higher number of bands and mobility when compared to the FOP.

Key words: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, onion, passion fruit, carbon, nitrogen, isoenzymes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliácridamida. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) . **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa:UFV, 1998. p. 151-182.
- 2 ALFENAS, A.C. et al. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) . **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa:UFV, 1998. p. 85-114.
- 3 ALFENAS, A.C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa:UFV, 1991. 242p.
- 4 ASSIS, S.M.P.; REIS, A.; MENEZES, M. Efeito de fontes de carbono e nitrogênio sobre o crescimento micelial, peso seco, esporulação e tamanho de conídios de *Fusarium solani*.

Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba, v.10, n.4, p.893-901, 1997.

5

BARNETT, H.L. **Fungus physiology research at the west Virginia agricultural and forestry experiment station, 1922-1982**. Morgantown: West Virginia University, 1985. 113 p.

6

BRUNE, W.; ALFENAS, A.C. Modalidades da eletroforese. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) . **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa:UFV, 1998. p. 25-83.

7

BRUNE, W.; ALFENAS, A.C.; JUNGHANS, T.G. Identificações específicas de enzimas em géis. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) . **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. p. 201-316.

8

COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York:John Wiley & Sons, 1958. 438 p.

9

FRY, W.E. et al. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p. 107-129, 1992.

10

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2nd ed., New York:Jonh Wiley & Sons, 1994. 458p.

11

HAVEY, M.J. Fusarium basal plate rot. In: SCHWARTZ, H.F.; MOHAN, S.K. (Eds.). **Compendium of onion and garlic diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1995. p.10-11.

12

HAWKER, L.E. **Physiology of fungi**. London:University of London, 1950. 360p.

13

LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw Hill, 1951. 464p.

14

MACHADO, M.C.V.; MENEZES, M. Efeito de *Trichoderma* no biocontrole de *Myrothecium roridum* e na germinação de sementes de melão e caracterização isoesterásica do antagonista. **Revista Ômega**, Recife, n.10, p.49-58, 1997.

15

McDONALD, B.A ; McDERMOTT, J.M. Population genetics of plant pathogenic fungi. Electrophoretic markers give unprecedented precision to analyses of genetic structure of populations. **BioScience**, Washington, v.43, n.5, p.311-319, 1993.

16

MICALES, J.A. BONDE, M.R.; PETERSON, G.L. Isozyme analysis and aminopeptidasa activities within the genus *Peronosclerospora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.11, p. 1396-1402, 1988.

17

OLD, K.M.; MORAN, G.F.; BELL, G. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamoni* from Australia and Papua New Guinea. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, p.2016-2022, 1984.

18

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R.L.R. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia - doenças das plantas cultivadas**. 2^a ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p.525-534.

19

ROBINSON, P.M. **Practical fungal physiology**. Chichester:Jonh Wiley & Sons, 1978. 123p.

20

WOLTZ, S.S.; JONES, J.P. Nutricional requeriments of *Fusarium oxysporum*: basis for a disease. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R.J. **Fusarium: diseases, biology and taxonomy**. University Park: The Pensilvanya State University, 1981. p.340-350.

21

YAMASHIRO, T. Principais doenças do maracujazeiro amarelo no Brasil. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.146-159.