

**BEATRIZ MEIRELES BARGUIL**

**ANTRACNOSE EM INFLORESCÊNCIAS DE PLANTAS  
ORNAMENTAIS TROPICAIS: CARACTERIZAÇÃO DE  
ISOLADOS DE *COLLETOTRICHUM*, ESCALA  
DIAGRAMÁTICA E REAÇÃO DE CULTIVARES**

**RECIFE – PERNAMBUCO  
2006**

**BEATRIZ MEIRELES BARGUIL**

**ANTRACNOSE EM INFLORESCÊNCIAS DE PLANTAS  
ORNAMENTAIS TROPICAIS: CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE  
*COLLETOTRICHUM*, ESCALA DIAGRAMÁTICA E REAÇÃO DE  
CULTIVARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fitossanidade da Universidade Federal Rural  
de Pernambuco, como parte dos requisitos para  
obtenção do Grau de Doutor em Fitopatologia.

Comitê de Orientação:

Profª Sônia Maria Alves de Oliveira – Orientadora  
Prof. Rildo Sartori Barbosa Coêlho – Co-Orientador

**RECIFE – PERNAMBUCO  
NOVEMBRO, 2006**

**ANTRACNOSE EM INFLORESCÊNCIAS DE PLANTAS  
ORNAMENTAIS TROPICAIS: CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE  
COLLETOTRICHUM, ESCALA DIAGRAMÁTICA E REAÇÃO DE  
CULTIVARES**

**BEATRIZ MEIRELES BARGUIL**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 23 de novembro de 2006

**ORIENTADOR:**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves de Oliveira – UFRPE

**EXAMINADORES:**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Nenmaura Gomes Pessoa – UFC

---

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima – UFAL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vivian Loges – UFRPE

---

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff – UFRPE

---

Prof. Dr. Rildo Sartori Barbosa Coelho – IPA/UFRPE

**RECIFE – PERNAMBUCO  
NOVEMBRO, 2006**

**A Deus,**

**que tem me acompanhado por toda a vida**

**Aos meus pais e irmãos,**

**que me amam, incentivam e apóiam**

**A Evando Júnior,**

**pelo amor, carinho e paciência,**

**OFEREÇO**

**“O estudo é a chave de ouro que abre a inteligência humana e nela deposita, generosamente, o tesouro eterno da sabedoria”**

**Anônimo**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelas bênçãos e oportunidades recebidas durante toda a minha vida;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao curso de Doutorado em Fitopatologia pela oportunidade;

Ao CNPq pela bolsa de estudos;

À professora Sônia M. A. Oliveira pela orientação, conselhos, exemplo, amizade e confiança;

Ao professor Rildo Sartori Barbosa Coêlho pela co-orientação, exemplo e amizade;

Ao professor Sami J. Michereff pelas valiosas sugestões durante os trabalhos e por aceitar o convite de participar da banca;

Aos Professores Gaus Silvestre de Andrade Lima, Vivian Loges e Maria Nenmaura Gomes Pessoa por aceitar o convite de participar da banca e pelas sugestões apresentadas;

Aos meus familiares residentes em Recife, tios e primos, pelo apoio, carinho e acolhimento durante minha estada na capital pernambucana;

Aos colegas e amigos do laboratório de Pós-colheita Albaneide Lopes, Alice Santos, Felipe Melo, Íris Silva, Rinaldo Filho, Roberto Luiz, Suzana Dantas e Wagner Pessoa pelo apoio que me deram;

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Doutorado em Fitopatologia da UFRPE que contribuíram para minha formação acadêmica;

Aos produtores e funcionários das propriedades visitadas pela atenção e disponibilidade;

Aos colegas de turma do Doutorado Andréa Chaves, Erick Couto, Rinaldo Filho e Sandra Magalhães pelos momentos de estudos, alegrias e estresses.

# SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
CAPÍTULO I – Introdução Geral .....	13
Referências Bibliográficas .....	27
CAPÍTULO II – Caracterização morfológica, exoenzimática, patogênica e molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> de inflorescências de plantas ornamentais tropicais.....	33
INTRODUÇÃO .....	35
MATERIAL E MÉTODOS .....	37
RESULTADOS .....	42
DISCUSSÃO .....	45
AGRADECIMENTOS .....	50
REFERÊNCIAS .....	51
CAPÍTULO III – Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da antracnose em bastão do imperador .....	61
RESUMO .....	62
ABSTRACT .....	63
MATERIAL E MÉTODOS .....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
AGRADECIMENTOS .....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

CAPÍTULO IV – Reação de cultivares, efeito da época e da quantidade de pontos de inoculação e idade da espata no desenvolvimento da antracnose em antúrio.....	77
RESUMO .....	78
ABSTRACT .....	79
MATERIAL E MÉTODOS .....	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
CONCLUSÕES GERAIS .....	91

## RESUMO

O cultivo de flores tropicais tem-se expandido em vários estados do Nordeste do Brasil pela grande aceitação desses produtos pelo mercado consumidor e a perspectiva de um agronegócio de elevado retorno econômico. A antracnose causada por *Colletotrichum* spp. pode afetar várias espécies tropicais, comprometendo a quantidade e qualidade do produto final. Devido à carência de informações nesses patossistemas, o presente trabalho objetivou: a) Caracterizar através de morfologia, produção de exoenzimas, patogenicidade e análise molecular de isolados de *Colletotrichum* de flores tropicais; b) Elaborar uma escala diagramática para avaliação da severidade da antracnose em bastão do imperador; e c) Avaliar o comportamento de cultivares de antúrio, em diferentes fases de desenvolvimento e o efeito da quantidade de pontos de inoculação na severidade da antracnose quando infectadas com *C. gloeosporioides*. Todos os 37 isolados testados produziram conídios hialinos, unicelulares, retos e cilíndricos e apressórios de coloração marrom escuro e formato variável. A coloração das colônias variou de branco a cinza escuro. O DNA da maioria dos isolados foi amplificado com o oligonucleotídeo específico para a espécie *C. gloeosporioides*, confirmando os dados obtidos através das características morfológicas. O DNA dos isolados C 23 e C 35 não foi amplificado com os primers espécie-específicos para a confirmação da espécie. Todos os isolados produziram enzimas amilolíticas, lipolíticas e proteolíticas em meios de cultura específicos. A patogenicidade dos isolados foi variável. Seis isolados obtidos de antúrio e quatro isolados de helicônia não foram patogênicos quando inoculados nos respectivos hospedeiros, sendo que todos os isolados provenientes de bastão do imperador foram patogênicos. Alguns isolados de antúrio, bastão do imperador, helicônia e musa foram patogênicos quando em inoculações cruzadas. A variabilidade genética dos 37 isolados de *Colletotrichum* foi determinada com três oligonucleotídeos arbitrários. A escala diagramática elaborada para a antracnose em bastão do imperador apresenta níveis de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 82 e 92% de área lesionada da bráctea. A avaliação da severidade da antracnose em bastão do imperador sem a utilização dessa escala gerou resultados contraditórios onde os avaliadores tanto superestimaram como subestimaram a intensidade da doença. Com o emprego da escala, os avaliadores obtiveram melhores níveis de acurácia e precisão, com os erros absolutos concentrando-

se na faixa de 10%. Os avaliadores apresentaram boa repetibilidade e elevada reprodutibilidade das estimativas com a utilização da escala, o mesmo não sendo verificado sem a utilização dessa. Em antúrios, a idade da espata influenciou o desenvolvimento da lesão para os dois isolados avaliados. Em espatas no estágio 1, sem a completa abertura, as lesões formadas foram significativamente maiores do que aquelas formadas em espatas nos estádios 4 e 5. As maiores lesões causadas pelos isolados do patógeno foram formadas com cinco pontos de ferimento nas duas cultivares de antúrio (cvs. Tropical e Cananéia). A época de inoculação não influenciou no tamanho da lesão, nas duas cultivares avaliadas. Os menores períodos de incubação (PI) para o isolado Cg 1 foram observados nas cultivares Astral, Tropical, Netuno e Farao, diferindo significativamente nas demais cultivares. Nas cultivares Sonate, Astral, Tropical, Netuno e Farao foram observados os menores PI para o isolado Cg 2. A menor AACPD resultante da inoculação com Cg 1 foi observada em Sonate, que diferiu das demais cultivares. As menores AACPD ocasionadas pelo isolado Cg 2 foram observadas em Farao e Midori, que diferiram das cultivares Cananéia, Sonate, Tropical e Netuno.

Palavras-chaves: *Anthurium andraeanum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Etilingera elatior*, *Heliconia* spp., escala diagramática, resistência.

## ABSTRACT

The tropical flower crop has increased in several states of the Northeast region of Brazil based on the high acceptance of the product and its potential as a profitable activity. The anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. can affect many of these species, influencing negatively the quantity and quality of the final product. The present work aimed: a) to characterize *Colletotrichum* isolates from tropical flowers by morphological, exoenzyme production, pathogenicity and molecular methods; b) to develop a diagrammatic key for anthracnose on torch ginger; c) to evaluate the response of anthurium cultivars, the effect of inoculation point quantity, and the different development stages on anthracnose development. All isolates presented *Colletotrichum gloeosporioides* characteristics, by morphological and molecular methods, excepted the DNA from C 23 and C 35 isolates that weren't amplified with the specific primer. The conidia from the different isolates were hyaline, unicellular and cylindrical, and apressoria varied in shape and size, with dark brown color. The colony color varied from white to dark gray. All isolates showed enzymes activity on specific mediums. The pathogenicity was variably between isolates. Six anthurium's isolates and four heliconia's isolates weren't pathogenic when inoculated on their hosts. All isolates from torch ginger were pathogenic. Some of them showed cross-infection capacity. Genetic variability was verified by ap-PCR with three different primers. The diagrammatic key elaborated to evaluate anthracnose on torch ginger includes the levels 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 82 and 92% of diseased bracts area. On the first evaluation without the key raters overestimated and underestimated the disease severity. With the diagrammatic key raters obtained better levels of accuracy and precision, with absolute errors concentrated around 10%. Raters showed good repeatability and high reproducibility of estimative by using the key compared to the no use of it. The lesion size development was influenced by espathe age on anthurium. On espathes on stage 1, where the espathes still closed, the lesions were significantly bigger than espathes on 4 and 5 stages. Bigger lesions were observed with five points per wound on the two cultivars (cvs. Tropical and Cananéia) and isolates tested. Inoculation time not influenced the lesion size on cultivars tested. The incubation period (IP) was variable with cultivars and isolate. The smaller IP for Cg 1 were observed on Astral, Tropical, Netuno and Farao. On Sonate,

Astral, Tropical, Netuno e Farao cultivars were observed the smallest IP for Cg 2. The smallest AUDPC were observed on Sonate for Cg 1 and on Farao and Midori for Cg 2.

Key-words: *Anthurium andraeanum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Etilingera elatior*, *Heliconia* spp., diagrammatic key, resistance.

# CAPITULO I

---

## INTRODUÇÃO GERAL

# **Título: Antracnose em inflorescências de plantas ornamentais tropicais: caracterização de isolados de *Colletotrichum*, escala diagramática e reação de cultivares**

## **Introdução Geral**

### **Flores Tropicais**

O mercado mundial de flores vem apresentando crescimento anual de 10% desde a década de 1990, tornando-se um dos segmentos econômicos de grande importância para a Organização Mundial do Comércio. As flores e plantas ornamentais movimentam mundialmente cerca de 49 bilhões de dólares, desde a fase de produção até a entrega final (FERREIRA et al., 2002).

No Brasil, a floricultura é uma atividade de alta rentabilidade e com grande potencial de consumo, pois abrange uma diversidade de produtos, como as flores de corte (rosa, crisântemo, lírio, cravo, gladiolo), flores de vaso (crisântemo, violeta, antúrio, azaléia e begônia) e folhagens. Os principais países consumidores das flores e plantas brasileiras são Holanda, Inglaterra, Estados Unidos, Itália, Alemanha, França, Japão e Argentina (SEBRAE, 2005). Estima-se que as exportações brasileiras de ornamentais evoluirão de forma expressiva, podendo alcançar cerca de US\$ 80 milhões em 2007 (IBRAFLOR, 2005).

A floricultura tropical é uma atividade em ascensão no Brasil e destaca-se como um agronegócio gerador de renda, fixador de mão-de-obra no campo e como cultura alternativa para pequenos produtores (WARUMBY et al., 2004). As flores tropicais apresentam diversas características que favorecem grande aceitação e que elevam o potencial de crescimento do setor no mercado nacional e internacional, como a durabilidade, a beleza e a diversidade de cores e formatos (LOGES et al., 2005).

A temperatura ideal para o cultivo das tropicais situa-se entre 22 e 25°C. No Brasil existem plantações de flores tropicais principalmente em regiões de mata úmida no Nordeste, com destaque para os estados de Pernambuco, Ceará e Alagoas (LAMAS, 2002). Nesses estados, as condições climáticas permitem o cultivo durante todo o ano, sem necessidade de grandes investimentos em infra-estrutura, resultando em custos menores que possibilitam a competição com o mercado mundial. A maioria das espécies de flores tropicais pode ser

cultivada a pleno sol ou em condições de sombreamento natural ou artificial (WARUMBY et al., 2004).

A maioria das espécies tropicais cultivadas no Nordeste pertence às famílias Araceae, Costaceae, Heliconiaceae, Musaceae e Zingiberaceae. Na família Araceae destaca-se o antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) que produz inflorescência de diversas cores e também folhagem, e outras espécies cultivadas para produção de folhagem como *Alocasia amazonica* André, *Philodendron cordatum* Kunth e *Spathiphyllum wallisi* Regel. A família Costaceae é constituída de quatro gêneros e 150 espécies, mas apenas costus (*Costus spicatus* Susseng) e tapeinóquilo (*Tapeinochilos ananassae* Hassk.) são amplamente cultivadas. Na família Heliconiaceae diversas espécies são destaques na produção, como *Heliconia bihai* (L.) L., *H. chartacea* cv. Sex Pink Lane & Barreiros, *H. psittacorum* L. F., *H. rostrata* Ruiz & Pavón e *H. wagneriana* Petersen. Dentre as musáceas destacam-se *Musa coccinea* Andrews, *M. velutina* Roxb. e *M. ornata* Roxb., que apresentam inflorescências de coloração vermelha, roxa e rosa, respectivamente. As principais espécies cultivadas da família Zingiberaceae são alpínia (*Alpinia purpurata* (Vieill.) Schum.), bastão do imperador (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith) com variedades de coloração vermelho, rosa e porcelana e sorvete (*Zingiber spectabiles* Griff.) (LINS; COELHO, 2004; LORENZI; SOUZA, 2001).

A qualidade das flores tropicais de corte quanto a durabilidade, coloração tamanho e turgidez, está relacionada com todas as etapas de produção. Flores com boa qualidade são resultado de mão-de-obra qualificada, manejo adequado e boas práticas pós-colheita (LOGES et al., 2005).

### **Antúrio**

O antúrio é uma planta semi-herbácea, ereta, perene, com altura variando de 0,30 a 1,0 m, sendo originário da Colômbia e Venezuela. Apresenta folhas verdes vistosas, com formato cordiforme e inflorescências com espatas de diversas cores de acordo com a cultivar, sendo tanto a folhagem quanto as inflorescências de grande importância ornamental (LORENZI; SOUZA, 2001). O que é conhecido como “flor”, na verdade é o conjunto da espata (folha modificada e colorida) com a espádice (inflorescência do tipo espiga), onde estão localizadas as flores femininas na base e masculinas no ápice e cuja abertura ocorre em épocas diferentes evitando a auto polinização, o que leva a uma alta variabilidade dessa espécie. A reprodução assexuada é feita por divisão de touceira ou por micropropagação. Esses métodos propiciam a obtenção de plantas idênticas à planta matriz, sendo que o primeiro resulta na produção de

pequena quantidade de mudas e o segundo em grande quantidade de material (Tombolato et al., 2004).

O cultivo de antúrios em países de clima tropical como o Brasil, deve ser feito sob telado em sistema de cultivo protegido, proporcionando 80% de sombreamento (LOGES et al., 2004). Essa estrutura protege as plantas do excesso de luminosidade e de chuva. A irrigação deve ser realizada por gotejamento, evitando o encharcamento do substrato e a disseminação de fitopatógenos. Temperaturas entre 20 e 28°C durante o dia e a umidade relativa entre 50 e 90% são condições ambientais facilmente encontradas na região Nordeste do Brasil e são ideais para o cultivo de antúrio. De modo geral, a temperatura deve permanecer abaixo de 30°C e a umidade relativa acima de 50% durante o cultivo, pois o frio, o calor, a radiação e o excesso de luminosidade causam danos às plantas (van HERK et al., 1998; Tombolato et al., 2004).

Normalmente, o ponto de colheita é determinado pela quantidade de flores femininas abertas na espádice. O amadurecimento começa na base da espádice e segue vagarosamente até o ápice. Geralmente faz-se a colheita quando 75% das flores estão abertas, ou seja,  $\frac{3}{4}$  do comprimento da espádice. O ponto de colheita pode variar entre as cultivares, como por exemplo, a cultivar Midori é colhida quando 50% das flores estão abertas e a cultivar Linda de Mol só é colhida quando encontra-se 90% de flores abertas. É importante que testes de durabilidade pós-colheita sejam conduzidos para determinar a melhor época de colheita em cada cultivar (van HERK et al., 1998). A classificação das hastes colhidas é feita de acordo com o tamanho da haste, sendo considerada pequena quando menor que 30 cm, média com tamanho entre 30 e 45 cm e grande sendo maior que 45 cm (LOGES et al., 2005).

Existem mais de cem variedades comerciais de antúrio cultivadas em diversos países. As colorações desenvolvidas podem ser agrupadas em vermelho, rosa, branco, verde, laranja, creme e mistura de cores. O grupo vermelho é o mais cultivado, sendo responsável por 40% da área plantada na Holanda no ano de 1997, seguido pelo grupo rosa com 13% e o branco com 8%. A produção deve ser conduzida de acordo com as preferências do mercado consumidor. As principais cores importadas pela Alemanha são o vermelho e o laranja, já na Itália os consumidores preferem o vermelho, o branco e o rosa e na França o branco e o rosa são os mais procurados (van HERK et al., 1998).

As cultivares comerciais de antúrio devem reunir diversas características como: qualidade da folha; haste floral ereta, firme e medindo 60 cm; espata com brilho, aberta, de textura firme e coloração uniforme; espádice ligeiramente arqueada e medindo cerca de dois

terços do comprimento da espata; boa produção; durabilidade pós-colheita; e resistência às doenças (van HERK et al., 1998; TOMBOLATO et al., 2004).

### **Bastão do imperador**

A espécie *E. elatior* é originária da Indonésia e pertence à família Zingiberaceae, sendo popularmente conhecida como bastão do imperador. Essa família compreende aproximadamente 50 gêneros e 1000 espécies, que podem ser encontradas em todo o mundo. O bastão do imperador possui hábito herbáceo, rizomatoso, porte ereto, em touceiras que podem atingir de dois a quatro metros de altura. Suas folhas são grandes, alongadas e verdes. Apresenta inflorescências grandes, sustentadas por hastes que medem entre 1,0 e 1,5 metro de altura, com coloração que pode variar de branco a preto. No Brasil são cultivadas a vermelha (cv. Red Torch), rosa (cv. Pink Torch) ou rosa-claro (cv. Porcelain) todas com elevado valor ornamental. Cultivada de forma isolada ou em grupos em parques e jardins, pode ser multiplicada por semente ou por divisão de touceira, sendo esta última a mais indicada por manter as características da cultivar (BERRY; KRESS, 1991; CHAPMAN, 1995; LORENZI; SOUZA, 2001). Em produção comercial o espaçamento adequado é de 4 metros entre linhas e de 2 a 3 metros entre plantas, devendo ser inicialmente cultivada à meia sombra.

O ponto de colheita do bastão do imperador ocorre quando as brácteas basais estão expandidas. A colheita deve ser efetuada nos horários com temperaturas amenas, como no início da manhã e no final da tarde. O transporte das hastes até o galpão de beneficiamento deve ser rápido para evitar que ocorra desidratação (CHAGAS, 2000; LOGES et al., 2005). Após a limpeza da haste faz-se a classificação de acordo com a qualidade observada, sendo considerada de boa qualidade a haste com inflorescência de botão grande ou com brácteas pouco abertas, ausência de manchas e pseudocaule com diâmetro acima de 1 cm (LOGES et al., 2005).

Após o corte, as inflorescências de bastão do imperador devem ser protegidas com redes para evitar danos provocados por atrito entre as inflorescências ou entre a inflorescência e a caixa de papelão. O número de hastes por caixa deve ser em torno de 50 e o tamanho da haste de 80 cm (LOGES et al., 2005).

### **Helicônia**

As diversas espécies compreendidas no gênero *Heliconia* são originárias de diferentes países da América Central e da América do Sul. São plantas arbustivas, herbáceas,

rizomatosas e que formam touceiras, favorecendo a propagação vegetativa. O porte é variável de acordo com a espécie, podendo atingir até 4,5 metros de altura como na espécie *H. chartacea* var. Sex Pink (LORENZI; SOUZA, 2001). Existem cerca de 200 a 250 espécies de *Heliconia* e mais de 450 nomes botânicos para espécies, variedades e híbridos desse gênero (BERRY; KRESS, 1991). Dentre esses, as seguintes espécies se destacam pela grande aceitação do mercado: *H. bihai* cv. Lobster Claw é originária do Brasil e Havaí, apresenta de 2 a 3 metros de altura, folhas grandes, com pecíolo longo e nervação paralela curvilínea. As inflorescências são eretas, longas, com brácteas rígidas, no mesmo plano, de coloração vermelho-alaranjada com faixa verde na borda superior. A espécie *H. chartacea* var. Sexy Pink é proveniente das Guianas e região Amazônica Brasileira. Suas inflorescências são longas, pendentes, com brácteas de coloração rósea e uma faixa verde-clara. Pode chegar até 4,5 metros de altura. Já *H. psittacorum* cv. Sassy é originária do Brasil, Guiana e Venezuela e apresenta inflorescências de boa durabilidade, com hastes longas, eretas e brácteas finas de coloração rosa e verde. A cultivar com coloração de bráctea vermelha e laranja é denominada Golden Torch Adrian e a de coloração amarela é denominada Golden Torch, sendo essas resultantes do cruzamento *H. psittacorum* x *H. spathocircinata*. *H. rostrata* é proveniente do Peru, Equador e Brasil, mede cerca de 2 a 3 metros de altura, inflorescências pendentes, com hastes longas, brácteas curtas e largas e coloração vermelho vivo e uma faixa na parte superior de coloração amarela e verde. Originária do Equador, Bolívia e Brasil, *H. stricta* cv. Las Cruces possui inflorescências eretas, com hastes longas, com brácteas largas e coloração vermelho. Pode chegar até 1,8 metros de altura. Medindo 1,5 a 3 metros de altura, *H. wagneriana* é originária da América Central e Colômbia. As inflorescências são eretas, de pedúnculo curto, com brácteas largas e coloração amarela na base, vermelho vivo no centro e uma faixa na borda superior de coloração verde (BERRY; KRESS, 1991; LORENZI; SOUZA, 2001).

O ponto de colheita em helicônias geralmente é realizado quando uma a cinco brácteas estiverem completamente expandidas (CHAGAS, 2000), dependendo da cultivar e do tipo de material requisitado pelo comprador.

Após a colheita, as hastes são limpas com água e sabão neutro e as flores retiradas do interior das brácteas visando aumentar a durabilidade da haste. As folhas acima da inflorescência devem ser cortadas de modo que os pecíolos fiquem 10 cm acima do final da inflorescência e a proteja de possíveis impactos durante o transporte. Uma haste de boa qualidade deve apresentar de duas a quatro brácteas abertas, com as brácteas da extremidade ainda fechadas, sem sinais de desidratação e boa coloração. As hastes precisam estar bem

acomodadas no interior das caixas de papelão para que não ocorra nenhum dano causado pelo atrito. Cada caixa deve conter apenas uma espécie da helicônia para facilitar a arrumação das hastes. Cerca de 30 e 22 inflorescências grandes e eretas de *H. bihai* e *H. wagneriana* cabem por caixa, respectivamente, enquanto que em espécies de menor porte como *H. psittacorum* e as resultantes do cruzamento de *H. psittacorum* e *H. spathocircinata* Aristeg. podem ser acomodadas cerca de 120 hastes em uma caixa (LOGES et al., 2005).

### **Doenças em flores tropicais**

As condições de cultivo exigidas pelas flores tropicais, a forma de propagação das espécies, o nível de profissionalização no setor produtivo e as poucas pesquisas desenvolvidas nessa área concorrem para que diversas doenças constituam importante fator no cultivo das diferentes espécies tropicais. Doenças causadas por vírus, bactérias, nematóides e fungos diminuem em quantidade e qualidade a produção de plantas ornamentais tropicais. As doenças de origem fúngica podem afetar inflorescências, flores, folhas, pseudocaulis, rizomas e raízes, mostrando-se mais severas sob condições de estresse hídrico ou nutricional do hospedeiro (WARUMBY et al., 2004).

Nos Estados Unidos o fungo *Deightoniella torulosa* (Syndow) M.B. Ellis foi encontrado associado a *M. coccinea* causando manchas foliares e podridão no pseudocaulis (CHASE; BROCHAT, 1991). Já o fungo *Fusarium oxysporum* foi encontrado causando murcha em espécies de *Heliconia* nos Estados Unidos e no Panamá, e a bactéria *Ralstonia solanacearum* raça 2 também foi relatada causando murcha em *Heliconia* spp. nos Estados Unidos e Equador (BUDDENHAGEN, 1997).

Lins e Coelho (2004) constataram a ocorrência de diversas doenças em plantas ornamentais tropicais causadas principalmente por fungos e nematóides, em sete municípios produtores do estado de Pernambuco. As doenças fúngicas mais freqüentes foram a mancha foliar de *Bipolaris incurvata* (C. Bernard) Alcorn. em *H. chartacea* cv. Sex Pink, *H. stricta* e *H. rostrata*, a mancha foliar de *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn em *H. chartacea* cv. Sex Pink, *H. bihai*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch, *H. psittacorum* cv. Sassy e *H. rostrata*, a mancha foliar causada por *Deightoniella torulosa* em *M. coccinea* e a podridão do rizoma causada por *Rhizoctonia solani* Kühn em *E. elatior*. A antracnose foi observada em bastão do imperador, tapeinóquilo e em três espécies de helicônias, *H. stricta*, *H. psittacorum* cv. Golden Torch e *H. bihai*. A freqüência de plantas infectadas com *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. foi de 86%, nas 15 propriedades visitadas. No Ceará foi

encontrado *Oidium* sp. e *C. gloeosporioides* em *Heliconia* spp. e *C. gloeosporioides* em *A. andraeanum* (FREIRE et al., 2003). Em Alagoas já foi observada a ocorrência de *C. gloeosporioides* em *T. ananasse* (AMORIM et al., 2006) e em *Calathea burle-max* H. Kennedy (ALMEIDA et al., 2006).

### **A antracnose**

A antracnose é uma doença de origem fúngica que ocorre no mundo inteiro e em grande variedade de hospedeiros, sendo destrutiva em inúmeras culturas e plantas ornamentais principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Os gêneros *Sphaceloma*, *Marssonina* e *Colletotrichum*, e seus estágios teleomórficos, são os principais patógenos associados à maioria das antracnoses (AGRIOS, 2005), sendo o gênero *Colletotrichum* o mais frequentemente encontrado no Brasil. Em meio de cultura, as espécies desse gênero caracterizam-se por apresentar micélio imerso, ramificado, septado, de coloração hialina, marrom claro ou marrom escuro. O acérvulo pode ser formado na subcutícula, epiderme, subepiderme ou na periderme com coloração hialina a marrom escuro. As células conidiogênicas são enteroblásticas, hialinas e cilíndricas (SUTTON, 1980).

A principal espécie associada aos sintomas de antracnose em folhagens (CHASE, 1992) e em plantas ornamentais tropicais é *C. gloeosporioides* (WARUMBY et al., 2004) descrita em 1882, tendo como teleomorfo a espécie *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk descrita em 1903 (SUTTON, 1980). Arx (1957) apud Sutton (1980) reconheceu a existência de nove formas dentro desta espécie grupo, mas as manteve dentro de *C. gloeosporioides*. Para uma melhor caracterização e/ou separação dessas formas é necessário a integração de características culturais e morfológicas, patogenicidade e gama de hospedeiros, uma vez que este fungo apresenta grande variação de suas características. Os conídios são estreitos, com ápice obtuso, cilíndricos, medindo 9 a 24 µm de comprimento por 3 a 4,5 µm de largura, apressórios clavados ou irregulares, medindo 6 a 20 µm de comprimento por 4 a 12 µm de largura (SUTTON, 1980).

Outra espécie associada a plantas ornamentais é *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx, descrita em 1957, tendo sido observado em *H. caribea* Jaquini, *H. latispatha* Benth, *H. psittacorum* e *H. rostrata* em plantios na Venezuela (MADRIZ et al., 1991). Apresenta colônias geralmente com micélio aéreo branco e abundante, tornando-se cinza com a idade, massa de esporos de coloração marrom amarelado, seta ausente, conídios estreitos, cilíndricos, medindo de 12 a 17 µm de comprimento por 4,5 a 5,5 µm de largura. Apressórios com

formato irregulares, com lobos irregulares, medindo de 9 a 13  $\mu\text{m}$  de comprimento por 9 a 11,5  $\mu\text{m}$  de largura (SUTTON, 1980).

A infecção de *Colletotrichum* spp. em ornamentais tropicais, é mais severa em épocas úmidas e temperatura em torno dos 25°C. Esses patógenos podem afetar várias espécies de flores tropicais, desenvolvendo-se em qualquer parte da planta reduzindo a produtividade e/ou desvalorizando as flores para comercialização. Dependendo da parte afetada, sintomas diferentes podem ser observados (WARUMBY et al., 2004). Em brácteas de *T. ananassae* foram observadas lesões necróticas, que coalescem e evoluem para podridão generalizada da inflorescência (AMORIM et al., 2006). Também em brácteas das inflorescências de *C. burle-max* foram verificadas lesões encharcadas seguidas de necrose ocupando grandes áreas dos tecidos florais (ALMEIDA et al., 2006). Em bastão do imperador causa lesões nas brácteas florais, a princípio pequenas manchas escuras que evoluem para uma podridão encharcada. Nas brácteas de *H. rostrata*, os sintomas se apresentam como pequenos pontos escuros, que coalescem até necrosar a inflorescência. Nas folhas de *H. psittacorum*, o fungo causa pequenas manchas vermelho-alaranjadas, circundadas por um halo amarelo e centro deprimido (WARUMBY et al., 2004). Em brácteas de *H. chartacea* cv. Sex Pink podem ocorrer lesões de coloração escura, deprimida e com formato elíptico (BARGUIL et al., 2005). Em folhas de antúrio, os sintomas de antracnose compreendem lesões pardas que aparecem mais freqüentemente nos bordos foliares ou junto às nervuras, podendo coalescer e tomar grande parte do limbo foliar (PITTA et al., 1990; TOMBOLATO et al., 2004) e nas espatas ocorrem pequenas manchas escuras, que evoluem para uma podridão encharcada e posterior necrose (WARUMBY et al., 2004).

*Glomerella cingulata* tem sido relatado causando doença em algumas plantas tropicais. Em folhas de *Calathea crotalifera* S. Watson e *C. burle-max* os sintomas se iniciam com a formação de pequenas pontuações cloróticas que evoluem tornando-se manchas ovaladas pardo-avermelhadas circundadas por halo amarelado e com bordos irregulares. A maioria das lesões é formada próxima ao bordo foliar e, geralmente, ocorre o coalescimento das lesões tomando grandes áreas do tecido foliar (WARUMBY et al., 2004). Na Venezuela, este patógeno ocorre em *H. caribea*, *H. latispatha* e *H. psittacorum*, tendo sido encontrado em 56.3, 15.6 e 5.8% das amostras desses materiais, respectivamente (MADRIZ et al., 1991).

Normalmente, os sintomas causados por *C. gloeosporioides* em diversos hospedeiros se desenvolvem em pós-colheita e refletem os fatores que ocorreram em pré-colheita, como as condições climáticas desfavoráveis para a cultura e tratos culturais incorretos, podendo ser

agravadas por fatores de colheita e pós-colheita, devido ao manuseio, limpeza, embalagem, transporte e armazenamento inadequado (SOMMER, 1982; SNOWDON, 1990).

### **Variabilidade morfológica, patogênica e molecular de *Colletotrichum***

A avaliação da diversidade genética através de estudos morfológicos tem sido realizada em isolados de *Colletotrichum* provenientes de diversas culturas, como *C. acutatum* Simmonds em lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet.) (TALHINHAS et al., 2002), *C. musae* em banana (*Musa* spp.) (COUTO; MENEZES, 2004), *C. gloeosporioides* em abacate (*Persea americana* Mill.), mamão (*Carica papaya* L.) e manga (*Mangifera indica* L.) (PERES et al., 2002), *C. gossypii* South em algodoeiro (*Gossypium* spp.) (ROCA et al., 2004), dentre outras. A caracterização morfológica, bastante utilizada e essencial, pode algumas vezes mostrar-se limitada devido ao grande número de caracteres passíveis de serem analisados, como pigmentação, textura, forma e velocidade de crescimento, que são dependentes de aspectos como composição do meio e condições de incubação. Dessa forma, podem ser subjetivos, pouco conclusivos e induzirem erros de interpretação, quando utilizados de maneira isolada. Com a elevada variabilidade das características morfológicas, a adoção de outras metodologias se faz necessária para uma identificação eficiente da espécie em estudo (SUTTON, 1980).

A variabilidade de isolados de *Colletotrichum* sugere a existência de grupos de especialização patogênica. Testes de patogenicidade em inoculações cruzadas são usados como forma de caracterização patogênica entre isolados, visando demonstrar a especificidade ou a gama de hospedeiros dos isolados avaliados. Como exemplo, em um estudo de inoculação cruzada com isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Simmonds f. *flavicarpa* Degener), caju (*Anacardium occidentale* L.), banana, manga e mamão, Lima Filho et al. (2003) verificaram a especificidade do isolado de maracujá em incitar sintomas apenas em maracujá-amarelo, enquanto que a banana foi infectada com todos os outros isolados testados. A variação patogênica de 296 isolados de *C. gloeosporioides* foi verificada em cinco espécies de estilosantes, levando a formação de oito grupos de raças. Cerca de 10% dos isolados apresentaram baixa capacidade de causar doença, enquanto que 40% dos isolados mostraram-se patogênicos a apenas uma espécie (CHAKRABORTY et al., 2002). Inoculações cruzadas com isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provenientes de amendoeira-doce (*Prunus dulcis* (Mill.) D. Webb), maçã (*Malus domestica* Borkh), abacate, manga e nectarina (*Prunus persica* var. *nucipersica* (Suckow) Schneider resultaram em sintomas típicos de antracnose em todos os frutos. Os dois isolados

de *C. gloeosporioides* provenientes de amêndoa cresceram mais vagarosamente, causando lesões significativamente menores em todos os frutos inoculados, inclusive no hospedeiro original. Não foram observadas diferenças entre tamanho das lesões nos frutos inoculados com isolados de *C. acutatum* provenientes de maçã e nectarina. Diferenças significativas foram observadas no tamanho das lesões produzidas por isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de abacate e manga. O isolado da manga foi menos agressivo nas duas cultivares de maçã e em amendoeira-doce, causando lesões maiores em nectarina e abacate (FREEMAN; SHABI, 1996).

Técnicas moleculares baseadas na análise do DNA têm sido aplicadas com êxito em diferentes áreas da micologia, possibilitando o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de fitopatógenos. Por utilizarem diretamente o DNA, não sofrem influência dos fatores que afetam a expressão gênica, sendo também consideradas viáveis para uso rotineiro devido à sua rapidez e simplicidade na detecção de variabilidade genética em fungos (TEIXEIRA et al., 2004).

Diversos métodos de detecção de polimorfismo genético foram desenvolvidos, como por exemplo: a técnica de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) que possibilita a comparação de fragmentos de DNA baseada na homologia de seqüência das bases, favorecendo a probabilidade de se encontrar associações significativas entre marcadores e genes que controlam um caráter de interesse. A técnica de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) favorece a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando em várias bandas no gel. As vantagens dessa técnica em relação à anterior é que não requer o desenvolvimento de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo em estudo e que a quantidade de DNA necessária é cerca de três vezes menos. A metodologia com a utilização de minissatélites se baseia no conhecimento de que grande proporção do genoma de organismos eucariotos é composta de seqüências repetidas de DNA. Esses marcadores tornam-se importantes ferramentas para a análise genética, pois oferecem a possibilidade de amostrar simultaneamente um grande número de locos polimórficos. A utilização da técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) propicia a síntese de milhões de cópias de um segmento específico de DNA. A facilidade, rapidez e sensibilidade propiciadas com a utilização dessa técnica, a torna extremamente útil em estudos genéticos envolvendo grande número de indivíduos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Vários trabalhos foram conduzidos utilizando essas técnicas para a caracterização de espécies de *Colletotrichum* como por exemplo, os realizados com isolados provenientes de

morango (*Fragaria ananassa* Duch.) (UREÑA-PADILLA et al., 2002; XIAO et al., 2004), de maracujá e de manga (AFANADOR-KAFURI et al., 2003), de amendoeira-doce, de maçã e de pêsego (*Prunus pérsica* L.) Batsch (FREEMAN; SHABI, 1996), de lupino ornamental (TALHINHAS et al., 2002), de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (SICARD et al., 1997), de estilosantes (MUNAUT et al., 2002; WEEDS et al., 2003), de abacate, de banana, de goiaba (*Psidium guajava* L.), de mamão, de manga e de maracujá (PERES et al., 2002), de oliveira (*Olea europaea* L.) (TALHINHAS et al., 2005), dentre outros.

### **Resistência de cultivar e idade de desenvolvimento**

O cultivo de variedades resistentes não apenas diminui perdas provocadas pela doença, mas também reduz as despesas com pulverizações e outros métodos de controle, evitando a contaminação do meio ambiente com químicos tóxicos. Mesmo após a liberação de uma cultivar resistente, medidas podem ser tomadas para prolongar a resistência. Estratégias de manejo como podas de limpeza ou aplicações de fungicidas que reduzam a exposição da cultivar a grandes populações do patógeno (pressão de inóculo), prolongam sua vida útil (AGRIOS, 2005). Vários estudos foram desenvolvidos em diversas culturas com o objetivo de comparar o comportamento de cultivares frente aos principais patógenos, como por exemplo: maçã inoculada com *C. acutatum* (BIGGS; MILLER, 2001), melancia (*Citrulus lanatus* L.) e melão (*Cucumis melo* L.) inoculados com *C. orbicularie* ((Berk. & Mont.) Arx (REGO et al., 1995), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) inoculada com *C. gloeosporioides* f.sp. *manihotis* (Henn.) Penn. (FOKUNANG et al., 2002), cafeeiro (*Coffea arabica* L.) inoculado com *C. kahawae* Waller & Bridge (OMONDI et al., 2000), pimentão (*Capsicum annum* L.) (HALFELD-VIEIRA et al., 2004) e cebola (*Allium cepa* L.) inoculados com *C. gloeosporioides* (FILHO, 2005), dentre outros patossistemas.

O melhoramento de cultivares visando resistência a doenças é uma característica desejável para a manutenção da produção das flores na presença de doenças (FUKUI et al., 1998) em diversas culturas ornamentais. Entretanto, poucos trabalhos de resposta de cultivares de espécies ornamentais foram desenvolvidos, apesar da importância desses conhecimentos. Foi observado que em bastão do imperador, as cultivares “Red Torch” e “Pink Torch” são mais suscetíveis a antracnose do que a cultivar Porcelain (LINS; COELHO, 2003).

A suscetibilidade das plantas a doenças varia de acordo com seu estágio de desenvolvimento. De acordo com Agrios (2005), existem três padrões de comportamento: em algumas plantas infectadas por bactérias, vírus e fungos causadores de míldio, ferrugem são suscetíveis apenas no período de desenvolvimento e se tornam resistentes no final do

amadurecimento; outras plantas são resistentes quando muito jovens, tornam-se suscetíveis e no final do crescimento se comportam como resistentes quando totalmente desenvolvidas; e outro tipo é observado na maioria dos frutos que são resistentes quando estão em desenvolvimento e tornam-se suscetíveis quando maduros à maioria dos patógenos de pós-colheita como *Botrytis*, *Glomerella*, *Monilinia* e *Penicillium*.

Em plantas de lentilha (*Lens culinaris* Medik.) com apenas duas semanas de idade o período de incubação de *C. truncatum* (Schw.) Andrus & Moore foi maior do que em plantas com quatro semanas de idade nos três genótipos avaliados. O número de lesões por ramo e a severidade da doença aumentou com a idade das plantas (CHONGO; BERNIER, 2000). Plantas de pimentão em diferentes idades de desenvolvimento reagiram de maneira diferente quando inoculadas com *C. coccodes* (Wallr.) Hughes através de pulverização. No estágio de duas folhas, as plantas morreram quando inoculadas com *C. coccodes*, enquanto que em plantas no estágio de oito folhas foi verificada apenas a formação de lesões pequenas e circulares (HONG; HWANG, 1998).

### **Escalas diagramáticas**

As principais formas de avaliação de doenças são a incidência e a severidade. A primeira refere-se a proporção (%) do número de plantas doentes, ou de suas partes como folhas e frutos, em relação ao total de plantas avaliadas; e a segunda está relacionada com a proporção de área ou quantidade de tecido vegetal doente em relação ao total de área analisada (AGRIOS, 2005). A utilização da incidência é rápida e fácil, sendo bastante empregada em estudos epidemiológicos de disseminação de doenças em campo e quando uma única lesão acarreta perda. Para algumas doenças a incidência está diretamente relacionada com a severidade, como em podridões e murchas. No caso de doenças foliares, por exemplo, a incidência da doença pode apresentar pouca relação com a severidade, uma vez que na folha pode ter uma ou dezenas de lesões. A severidade é geralmente expressa como a porcentagem ou proporção de área afetada pelo patógeno, sendo uma medida mais laboriosa e que exige maior conhecimento da doença (VALE et al., 2004; AGRIOS, 2005).

Os métodos mais freqüentemente utilizados para a quantificação de doenças são: escalas descritivas, escalas diagramáticas, contagem de lesões, e relação incidência-severidade. As escalas descritivas classificam a intensidade da doença e são muito utilizadas principalmente para avaliar a resistência de plantas a doenças. Já as escalas diagramáticas representam os sintomas típicos da doença em diferentes intensidades. O principal objetivo

deste tipo de escala é padronizar as avaliações e eliminar a subjetividade dos avaliadores, sendo que o desenvolvimento de programas computacionais possibilita que as escalas formuladas sejam mais acuradas e precisas (VALE et al., 2004).

Os seguintes aspectos devem ser considerados durante a elaboração de escalas diagramáticas: a) os limites inferior e superior da escala devem corresponder, respectivamente, às quantidades de doença mínima e máxima encontradas no campo; b) a representação dos sintomas deve ser próxima do observado na planta; c) os níveis intermediários devem seguir as limitações da acuidade visual humana, definidas pela “lei de estímulo-resposta de Weber-Fechner”; e d) a vista humana visualiza tecido doente para níveis de severidade abaixo de 50% e tecido sadio para níveis de severidade superiores a 50% (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). O sucesso do uso de escalas diagramáticas, medido pela precisão e acurácia na estimativa da severidade da doença, também depende da experiência e da percepção individual de cada avaliador. Antes que uma escala seja utilizada como método de avaliação padrão, ela deve ser validada por avaliadores experientes (LEITE; AMORIM, 2002) e inexperientes.

Poucos estudos de quantificação de doença foram conduzidos em espécies de interesse ornamental. No Brasil, apenas um estudo de elaboração de escala diagramática para a avaliação da ferrugem do crisântemo (*Chrysanthemum* spp.) causada por *Puccinia horiana* Henn. (BARBOSA et al., 2006) foi realizado.

Sabe-se que o cultivo de flores tropicais tem sido expandido, em vários estados do Nordeste do Brasil, pela grande aceitação desses produtos pelo mercado consumidor e a perspectiva de um agronegócio de elevado retorno econômico. As condições climáticas de temperatura e umidade relativa da maioria das regiões produtoras são favoráveis à ocorrência de problemas fitossanitários, dentre eles a antracnose. Entretanto, verifica-se a carência de conhecimentos sobre a variabilidade morfológica e molecular e a patogenicidade cruzada de isolados de *Colletotrichum* provenientes de plantas ornamentais tropicais. Além disso, existe a falta de padronização para avaliação de severidade da antracnose em bastão do imperador e o desconhecimento do comportamento de cultivares de antúrio quando inoculadas com *C. gloeosporioides*. Portanto, os objetivos dessa pesquisa foram: a) Caracterizar através de morfologia, produção de exoenzimas, patogenicidade e análise molecular os isolados provenientes de inflorescências de plantas ornamentais tropicais; b) Elaborar uma escala diagramática para avaliação da severidade da antracnose em bastão do imperador; c) Avaliar o comportamento de cultivares de antúrio em diferentes fases de desenvolvimento e o efeito da quantidade de pontos de inoculação quando infectadas com *C. gloeosporioides*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 579-587, 2003.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 2005. 922p.

ALMEIDA, G. T.; FURTADO, D. C. M.; GALVÃO, A. L. B.; AMORIM, E. P. R.; ANDRADE, D. E. G. T. Antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em inflorescências de *Calathea burlemax* cv. Green no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. S326, 2006.

AMORIM, E. P. R.; FURTADO, D. C. M.; SILVA, J. C.; GALVÃO, A. L. B. Antracnose em *Tapeinochilus ananassae* causada por *Colletotrichum gloeosporioides* no estado de Alagoas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. S360, 2006.

BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S. J.; MORA-AGUILERA, G. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem branca do crisântemo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 57-62, 2006.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.

BARGUIL, B. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Heliconia chartacea* cv. Sex Pink. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. S136, 2005.

BERRY, F.; KRESS, W. J. **Heliconia**: an identification guide. Washington: Smithsonian Institution Press. 1991. 334p.

BIGGS, A. R.; MILLER, S. S. Relative susceptibility of selected apple cultivars to *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, p. 657-660, 2001.

BUDDENHAGEN, I. W. The wilt diseases of *Heliconia*. **Bulletin Heliconia Society International**, v. 9, n.1/2, 1997.

CHAGAS, A. J. C. **Floricultura tropical na zona da mata de Pernambuco**. Recife: Sebrae, 2000. 24 p.

CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J. A.; THOMAS, M. R. Pathogenic variation in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in a center of diversity in Brazil. **Phytopathology**, Brasília, v. 92, p.553-562, 2002.

CHAPMAN, T. S. **Ornamental gingers: a guide to selection & cultivation**. USA, 1995. 50p.

CHASE, A. R.; BROSCHEAT, T. K. Pseudostem rot and leaf spot of flowering banana. **Bulletin Heliconia Society International**, v. 5, n. 2, 1991.

CHASE, A. R. **Compendium of ornamental foliage plant diseases**. Saint Paul: APS Press, 1992. 92p.

CHONGO, G.; BERNIER, C. C. Effects of hosts, inoculum concentration, wetness duration, growth stage, and temperature on anthracnose of lentil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, p. 544-548, 2000.

COUTO, E. F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n.4, p.406-412, 2004.

FERREIRA, A.; SOUZA FILHO, I. C.; ALBUQUERQUE, S. R. C.; BRASIL, H. S. Diagnóstico da floricultura Pernambucana. In: **Floricultura em Pernambuco**. Recife: Sebrae, 2002. p. 21-59.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 1998.

FILHO, J. A. Comportamento de genótipos de cebola em relação à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. S58, 2005.

FOKUNANG, C. N.; DIXON, A. G. O.; IKOTUN, T.; AKEM, C. N.; TEMBE, E. A. Rapid screening method of cassava cultivars for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *manihotis* **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 6-12, 2002.

FREEMAN, S.; SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 49, p.395-404, 1996.

FREIRE, F. C. O.; COSTA, A. K. F.; VIANA, F. M. P. Patógenos associados a flores e plantas ornamentais no Estado do Ceará (Brasil). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S209, 2003.

FUKUI, H.; ALVAREZ, A. M.; FUKUI, R. Differential susceptibility of anthurium cultivars to bacterial blight in foliar and systemic infection phases. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, p. 800-806, 1998.

HALFELD-VIEIRA, B.; NECHET, K. L.; PEREIRA, P. R. V. S.; MOURÃO Jr., M. Incidência da antracnose em frutos de cinco híbridos de pimentão em condições de cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. S33, 2004.

HONG, J. K.; HWANG, B. K. Influence of inoculum density, wetness, duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, p. 1079-1083, 1998.

IBRAFLOR. **Instituto Brasileiro de Floricultura**. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com.br>> Acesso em: 28 dez. 2005.

LAMAS, A. M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo**. Recife: SEBRAE, 2002.

LEITE, R. M. V. B. C.; AMORIM, L. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de *Alternaria* em girassol. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 14-19, 2002.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.6, p.620-625, 2003.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Antracnose em inflorescências de bastão do imperador (*Etlingera elatior*): ocorrência e métodos de inoculação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, p. 355-358, 2003.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n.3, p. 332-335, 2004.

LOGES, V.; CASTRO, A. C. R.; TEIXEIRA, M. C. F.; CASTRO, M. F. A. Experiências de cultivo de antúrio para flor de corte em Pernambuco. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, p. 38-41, 2004.

LOGES, V.; TEIXEIRA, M. C. F.; CASTRO, A. C. R.; COSTA, A. S. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 699-702, 2005.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2001. 1120p.

MADRIZ, R.; SMITS, G.; NOGUERA, R. Principales hongos patógenos que afectan algunas especies ornamentales del género *Heliconia*. **Agronomia Tropical**, Maracay, v. 41, p. 265-274, 1991.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARAITE, H. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 579-593, 2002.

OMONDI, C. O.; AYIECHO, P. O.; MWANG'OMBE, A. W.; HINDORF, H. Reaction of some *Coffea arabica* genotypes to strains of *Colletotrichum kahawae*, the cause of Coffee Berry Disease **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 61-63, 2000.

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; SOUZA, N. L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 128-134, 2002.

PITTA, G. P. B.; CARDOSO, E. J. B. N.; CARDOSO, R. M. G. **Doenças das plantas ornamentais**. São Paulo: Instituto Brasileiro do Livro Científico, 1990. 174 p.

REGO, A. M.; MAFFIA, L. A.; ALFENAS, A. C. Reação de germoplasma de melancia (*Citrullus lanatus*) e melão (*Cucumis melo*) a *Colletotrichum orbiculare*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p.48-55, 1995.

ROCA, M. G.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. C.; DAVIDE, L. C.; ROCHA, M. L. M. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 016-020, 2004.

SEBRAE AGRONEGÓCIOS. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**. Brasília: Gráfica Ipiranga, 2005.

SICARD, D.; MICHALAKIS, Y.; DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 807-813, 1997.

SNOWDON, A. L. **A color atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables**. London: WolfeScientific, 1990. v. 1, 302 p.

SOMMER, N. F. Postharvest handling practices and postharvest diseases of fruit. **Plant Disease**, St. Paul, v. 66, p. 357-364, 1982.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Great Britan: Commonwealth Agriculture Bureaux, 1980. 696 p.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S., NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of Lupins. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 986-966, 2002.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S., NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H.. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 2987-2998, 2005.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p.651-655, 2004.

TOMBOLATO, A. F.; FURLANI, P. R., CASTRO, C. E. F.; MATHES, L. A. F.; TAGLIACOZZO, G. M. D.; SAES, L. A.; RIVAS, E. B.; COUTINHO, L. N.; BERGMAN, E. C.; IMENES, S. L.; COSTA, A. M. M.; LEME, J. M. Antúrio (*Anthurium andraeanum*

Lindl.). In: TOMBOLATO, A. F. **Cultivo comercial de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2004. p. 61-94.

UREÑA-PADILLA, A. R.; MACKENZIE, S. J.; BOWEN, B. W.; LEGARD, D. E. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 1245-1252, 2002.

VALE, F. X. R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; LIBERATO, J. R.; SOUZA, C. A. Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro. In: VALE, F. X. R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. (Ed.) **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil Editora, 2004. p. 89-124.

VAN HERK, M.; VAN KOPPEN, M.; SMEDING, S.; VAN DER ELZEN, C. J.; VAN ROSMALEN, N.; VAN DIJK, J.; LONT, A.; VAN SPINGELEN, J. **Cultivation Guide Anthurium** - Global know-how for growers around the globe. Bleiswijk: Anthura B. V., 1998. 140p.

WARUMBY, J. F.; COELHO, R. S. B.; LINS, S. R. O. **Principais doenças e pragas em flores tropicais no estado de Pernambuco**. Recife: Sebrae, 2004. 98 p.

WEEDS, P. L.; CHAKRABORTY, S.; FERNANDES, C. D.; CHARCHAR, M. J. A.; RAMESH, C. R.; KEXIAN, Y.; KELEMU, S. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 176-185, 2003.

XIAO, C. L.; MACKENZIE, S. J.; LEGARD, D. E. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 446-453, 2004.

## **CAPITULO II**

---

**Caracterização morfológica,  
exoenzimática, patogênica e  
molecular de isolados de  
*Colletotrichum* de inflorescências de  
plantas ornamentais tropicais**

**Caracterização morfológica, exoenzimática, patogênica e  
molecular de isolados de *Colletotrichum*  
de inflorescências de plantas ornamentais tropicais**

B. M. Barguil<sup>1\*</sup>, S. M. A. Oliveira<sup>1</sup>, R. S. B. Coêlho<sup>1</sup>,  
J. E. A. Beserra Jr.<sup>2</sup>, W. R. L. S. Pessoa<sup>1</sup> e R. M. Lima Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia – Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE; <sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa. CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

E-mail: biabar@yahoo.com.br

Aceito em:

Título: *Caracterização de Colletotrichum de inflorescências de plantas tropicais*

Trinta e sete isolados do gênero *Colletotrichum*, obtidos de espécies de flores tropicais no Nordeste do Brasil, foram caracterizados quanto aos padrões morfológicos, exoenzimáticos, de agressividade e moleculares para a identificação da espécie; analisados quanto à diversidade genética da população por meio de AP-PCR. Todos os isolados produziram conídios hialinos, unicelulares, retos e cilíndricos e apressórios de coloração marrom escuro e formato variável. A coloração das colônias variou de branco a cinza escuro. Todos os isolados produziram as enzimas amilolítica, lipolítica e proteolítica em meios de cultura específicos. A agressividade dos isolados foi muito variável. Seis isolados de antúrio e quatro isolados de helicônia não foram patogênicos quando inoculados nas respectivas hospedeiras, sendo que todos os isolados provenientes de bastão do imperador foram patogênicos. Alguns isolados de antúrio, bastão do imperador, helicônia e musa foram patogênicos quando em inoculações cruzadas. O DNA da maioria dos isolados foi amplificado com um par de oligonucleotídeos específicos para a espécie *C. gloeosporioides*, confirmando os dados obtidos através das características morfológicas. Uma banda fraca, mas com o tamanho

esperado, foi verificada para o isolado Cg 6, enquanto nenhum produto de amplificação foi obtido quando se utilizou o DNA dos isolados C 23 e C 35 como molde. A variabilidade dos 37 isolados de *Colletotrichum* foi realizada com três oligonucleotídeos arbitrários.

Palavras-chaves: *Anthurium andraeanum*, antracnose, AP-PCR, *Etilingera elatior*, *Heliconia* spp., ITS.

---

## INTRODUÇÃO

A floricultura tropical é uma atividade em ascensão no Brasil visto que as flores tropicais apresentam diversas características, como durabilidade, beleza e diversidade de cores e formatos, que propiciam grande aceitação pelo mercado consumidor e elevado potencial de crescimento do setor no mercado nacional e internacional (Loges *et al.*, 2005).

As condições ambientais de temperatura e umidade relativa predominantes na região Nordeste do Brasil são bastante favoráveis para o cultivo das diversas espécies de plantas tropicais durante o ano todo (Warumby *et al.*, 2004). Essas condições também propiciam a ocorrência de doenças causadas por vírus, bactérias, nematóides e fungos, que diminuem em quantidade e qualidade a produção de plantas ornamentais tropicais. As doenças fúngicas ocorrem em maior quantidade e frequência, podendo afetar inflorescências, flores, folhas, pseudocauls, rizomas e raízes, tornando-se mais severas sob condições de estresse hídrico ou nutricional do hospedeiro (Warumby *et al.*, 2004). No Brasil, a antracnose destaca-se das demais doenças fúngicas em plantas ornamentais por afetar várias espécies importantes como *Anthurium andraeanum* (Pitta *et al.*, 1990), *Etilingera elatior*, *Tapeinochilos ananassae*, *Heliconia stricta*, *H. psittacorum* x *H. spathocircinata* cv. Golden Torch, *H. bihai* (Lins & Coelho, 2004) e *H. chartacea* cv. Sex Pink (Barguil *et al.*, 2005) e *Calathea burle-max* (Almeida *et al.*, 2006). Segundo

esses autores, o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* tem sido associado a esses hospedeiros através de caracterização morfológica e de patogenicidade. Entretanto, sabe-se que para uma melhor caracterização das espécies de *Colletotrichum* é necessária uma integração de características culturais e morfológicas, patogenicidade e gama de hospedeiros, uma vez que este fungo apresenta grande variabilidade (Sutton, 1980).

As técnicas moleculares vêm contribuindo para a identificação de algumas espécies de *Colletotrichum*. Vários trabalhos têm utilizado a amplificação específica da região ITS do DNA ribossomal para confirmação de espécies. Já existem oligonucleotídeos específicos para a identificação de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*. O uso de marcadores moleculares como AFLP, AP-PCR, dentre outros, vêm sendo utilizados para estudos de variabilidade genética de isolados de *Colletotrichum* provenientes de diversas fruteiras (Freeman & Shabi, 1996; Peres *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004; Talhinhos *et al.*, 2005), de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) (Sicard *et al.*, 1997), lupino ornamental (*Lupinus* spp.) (Talhinhos *et al.*, 2002) e *Stylosanthes* sp. (Weeds *et al.*, 2003), dentre outras espécies. Embora a antracnose seja considerada um fator limitante à produção de plantas ornamentais tropicais no Brasil, não existe nenhum estudo sobre a patogenicidade ou diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* provenientes dessas culturas.

Diante da falta de informações sobre as características de isolados de *Colletotrichum* obtidos em hastes florais de plantas tropicais no Brasil, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados quanto a morfologia, produção de exoenzimas, agressividade e por biologia molecular.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e manutenção dos isolados

Os isolados de *Colletotrichum* sp. foram obtidos de lesões em inflorescências de helicônia (*Heliconia* spp.), bastão do imperador (*E. elatior*), antúrio (*Anthurium* spp.) e de musa (*Musa coccinea*) provenientes de municípios dos estados de Pernambuco, Ceará e Paraíba, situados na região Nordeste do Brasil, entre os meses de fevereiro à outubro de 2005 (Tabela 1). O material coletado foi encaminhado ao laboratório, onde os fragmentos de tecido provenientes de lesões nas brácteas foram desinfestados com hipoclorito de sódio (1,5%), em seguida lavados duas vezes em água destilada esterilizada (ADE), e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Para cada isolado foram obtidas culturas puras através de cultivo monospórico, sendo a seguir repicados para tubo de ensaio contendo meio BDA e mantidos a 4°C em refrigerador.

#### **Identificação morfológica dos isolados**

A avaliação morfológica foi feita com base no tamanho dos conídios e apressórios, empregando-se a técnica da microcultura que consistiu na deposição de um bloco de ágar (1 cm<sup>2</sup>) contendo estruturas do fungo sobre uma lâmina e coberta com lamínula, sendo esse conjunto apoiado em suporte de vidro disposto em papel de filtro umedecido em ADE, no interior de placas de Petri (Menezes & Assis, 2004). As culturas foram mantidas em BOD sob luz contínua e temperatura de 25°C, durante sete dias, quando as lamínulas foram removidas, coradas com azul de Amann e observadas com o auxílio de microscópio óptico. Cada isolado foi avaliado através da medição do comprimento (C) e largura (L) de 50 conídios e apressórios

Os isolados também foram avaliados quanto às características culturais, sendo cultivados em meio BDA, sob regime de alternância luminosa, durante sete dias, com três repetições. Observou-se a coloração das colônias após o período de incubação.

#### **Produção de enzimas extracelulares em meio sólido**

Para as atividades amilolítica e proteolítica os meios de cultura foram preparados de acordo com os protocolos descritos por Hankin e Anagnostakis (1975) e para a atividade lipolítica de acordo com Paterson e Bridge (1994). Discos de meio de cultura contendo estruturas do patógeno, com sete dias de idade e 0,5 cm de diâmetro, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo o meio de cultura específico a cada atividade. As avaliações foram realizadas após seis dias de incubação medindo-se, em centímetros, o halo formado para a atividade lipolítica ou o diâmetro da colônia para as atividades amilolítica e proteolítica. Cada placa consistiu em uma unidade experimental, sendo utilizadas cinco repetições.

### **Agressividade dos isolados**

O teste de patogenicidade foi realizado em hastes florais de antúrio, bastão do imperador e helicônia no ponto de colheita comercial, procedentes do município de Paulista-PE. As hastes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (1,5%) por um minuto, lavadas duas vezes em ADE e deixadas secar a temperatura de 25°C. Todos os isolados foram inoculados em brácteas de antúrio (cv. Eidibel), bastão do imperador (cv. Red Torch) e helicônia (*H. rostrata*). O método de inoculação consistiu na deposição de um disco de meio de cultura contendo estruturas do patógeno sobre ferimentos artificiais feitos com estilete nas brácteas florais, atravessando o tecido da bráctea. As hastes inoculadas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo chumaço de algodão umedecido em ADE, assim permanecendo por 48 horas a 25°C e alternância luminosa. A unidade experimental consistiu de uma bráctea em helicônia e em bastão do imperador, e uma espádice em antúrio, empregando-se seis repetições. A avaliação foi realizada pela medição do comprimento e da largura, obtendo-se a média em centímetros, das lesões após quatro dias para antúrio e bastão do imperador e aos cinco dias em helicônias.

O delineamento experimental utilizado nos experimentos de morfologia, exoenzimas e agressividade foi inteiramente casualizado. As médias obtidas nesses ensaios foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Skott-Knott ( $P \leq 5\%$ ).

### **Identificação dos isolados de *Colletotrichum* e estudo de variabilidade mediante AP-PCR**

Os 37 isolados de *Colletotrichum* foram cultivados em meio BDA a 25°C, com fotoperíodo de 12 h. Após sete dias, cerca de 50 mg de micélio aéreo do fungo foram transferidos para microtubos de 1,5 ml com auxílio de estilete flambado e imediatamente congelados em N<sub>2</sub> líquido. Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) segundo Ferreira & Grattapaglia (1998) com modificações. O tecido congelado foi macerado em N<sub>2</sub> líquido. Após maceração foram adicionados 600 µL de tampão de extração (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,7 M NaCl, 10 mM EDTA, CTAB 1% e β-mercaptoetanol 1%), seguido de agitação em vórtex por 30 segundos. Os tubos foram incubados a 65°C durante 30 min, sendo agitados a intervalos de 5 min e, em seguida, resfriados a temperatura ambiente. Decorridos 15 min foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico, 24:1) e os tubos foram agitados por inversão, durante 5 min, até a obtenção de uma emulsão homogênea, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos, aos quais foram adicionados 60 µL de solução de precipitação (10% CTAB e 1,4 M NaCl). Novamente, misturou-se por inversão durante 5 min e acrescentou-se 600 µL de isopropanol a -20°C, seguindo-se a centrifugação a 12.000 rpm por 5 min a 4°C. O precipitado foi lavado e centrifugado duas vezes com 500 µL de etanol absoluto a 4°C por 5 min e então lavado mais uma vez com 300 µL de etanol 70% gelado e

centrifugado por 5 min. Os tubos foram secados a temperatura ambiente por 30 min. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE (Tris-EDTA) e as amostras armazenadas a -20°C.

A concentração de DNA nas amostras foi estimada em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio, pela comparação com soluções de DNA de concentrações conhecidas.

Foram utilizados os oligonucleotídeos CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3'), específico para *C. acutatum* e CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3'), específico para *C. gloeosporioides*, em conjunto com o oligonucleotídeo ITS4, para diagnóstico baseado em PCR para amplificação da região ITS do DNA ribossomal (Brown *et al.*, 1996). As PCRs foram realizadas em volume total de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão 10X (KCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 9,0; Triton-X 1%), 2,0 µL de dNTPs 2,5mM, 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de cada oligonucleotídeo 40 µM, 1U da DNA Taq Polimerase, 1 µL de DNA (10 a 100 ng) e 16,5 µL de água ultrapura. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo de desnaturação inicial por 2 min a 94°C; 30 ciclos de desnaturação por 1 min a 94°C; anelamento por 1 min a 51°C e extensão por 1 min a 72°C. Após a amplificação, os produtos foram separados em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (Tris-Borato, EDTA 0,5 M pH 8,0) a 80V por 2 h, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

Para análise de PCR com oligonucleotídeos arbitrários (AP-PCR) foram utilizados três oligonucleotídeos derivados de marcadores microsatélites: (GACAC)<sub>3</sub>, (GACA)<sub>4</sub> e (CAG)<sub>5</sub>. Foram usadas temperaturas de anelamento de 48°C para os oligonucleotídeos (GACAC)<sub>3</sub> e (GACA)<sub>4</sub>, e de 60°C para (CAG)<sub>5</sub>. As PCRs foram realizadas em volume total de 20 µL, contendo 2 µL de tampão 10X (KCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 9,0; Triton-X 1%), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2,0 µL de dNTPs

2,5 mM, 2  $\mu$ L do oligonucleotídeo correspondente, 1u da DNA Taq Polimerase, 1  $\mu$ L de DNA (10 a 100 ng) de *Colletotrichum* e 10,5  $\mu$ L de água ultrapura. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo de desnaturação inicial por 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 seg a 95°C; 30 seg com a temperatura de anelamento apropriada, 1 min e 30 seg a 72°C; e uma extensão final por 5 min a 72°C (Freeman *et al.*, 1996).

Os produtos das amplificações foram tratados como descrito anteriormente. As imagens eletrônicas dos géis foram arquivadas para posterior análise. Foi construída uma matriz binária com base na presença ou ausência de bandas. A matriz foi analisada para similaridade de bandas usando o método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average) e calculada com o coeficiente de Nei & Li usando o programa MVSP v.3.13 (Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK).

## RESULTADOS

### Características morfológicas dos isolados

Todos os isolados produziram conídios hialinos, unicelulares, retos e cilíndricos. Os valores médios obtidos através da medida do comprimento dos conídios variou de 10,4 a 17,6  $\mu$ m e do largura de 3,2 a 4,7  $\mu$ m (Tabela 2). A maioria dos isolados produziu apressórios de coloração marrom escuro e formato bastante variável, clavados ou irregulares. O comprimento médio dos apressórios variou de 6,6 a 14,3  $\mu$ m e da largura de 3,2 a 7,9  $\mu$ m (Tabela 2). Apenas os isolados Cg 8, Cg 19 e C 23 não produziram apressórios. Foi observada a formação de setas de coloração marrom escuro em meio de cultura pelos isolados Cg 3, Cg 6 e Cg 14. A coloração das colônias em meio de cultura variou de branco a cinza escuro, com predominância de branco e branco-acinzentado. Pelas características observadas, todos os isolados foram

classificados como sendo *Colletotrichum gloeosporioides*, exceto os isolados C 23 e C 35 que pertencem ao gênero *Colletotrichum*.

### **Produção de enzimas extracelulares em meio sólido**

Todos os isolados apresentaram atividade amilolítica, lipolítica e proteolítica detectadas através das reações nos meios específicos (Tabela 3). Na atividade amilolítica o diâmetro da colônia variou de 3,04 a 5,51 cm, sendo observada a formação de quatro grupos com 3, 8, 11 e 15 isolados. Para a lipolítica o halo formado variou de 0,26 a 1,09 cm, onde foram formados apenas três grupos com 2, 11 e 24 isolados. Na proteolítica o diâmetro da colônia ficou entre 3,67 e 7,71 cm, resultando na formação de sete grupos com 1, 2, 2, 2, 7, 12 e 11 isolados.

### **Agressividade dos isolados**

A agressividade dos isolados foi muito variável (Tabela 3). Dentre os dez isolados de antúrio avaliados, seis não foram patogênicos quando inoculados em antúrio (Cg 4, Cg 6, Cg 8, Cg 9, C 23, C 35). Os isolados patogênicos formaram lesões que variaram entre 0,51 e 0,61 cm. Os diâmetros das lesões formadas pelos isolados de helicônia variaram de 0,55 a 0,90 cm, entretanto quatro isolados de helicônia (Cg 3, Cg 18, Cg 19, Cg 33) não foram patogênicos quando reinoculados. Porém, todos os isolados provenientes de bastão do imperador foram patogênicos quando inoculados nesse hospedeiro, com o diâmetro da lesão entre 0,38 e 1,41 cm entre os isolados. Com as inoculações cruzadas, alguns isolados de antúrio, bastão do imperador, helicônia e musa foram patogênicos a duas ou três dessas ornamentais, como por exemplo, o isolado Cg 29 proveniente de antúrio que foi patogênico em bastão do imperador e helicônia. Os isolados Cg 4 e Cg 32 provenientes de helicônia e musa, respectivamente, não causaram lesão em nenhuma das ornamentais avaliadas.

### **Identificação dos isolados com primers específicos e variabilidade com AP-PCR**

Em testes de PCR com o oligonucleotídeo CgInt, específico para *C. gloeosporioides*, usado em conjunto com o oligonucleotídeo ITS4, os isolados produziram um fragmento de 450 pb correspondente à espécie *C. gloeosporioides*, juntamente com o controle positivo (Figura 1). Não houve amplificação para o controle negativo identificado como *C. acutatum*. Para nenhum isolado houve a amplificação do fragmento de 490 pb correspondente à *C. acutatum*. Nas análises realizadas, a banda de 450 pb gerada para o isolado Cg 6 apresentou fraca intensidade, enquanto que para os isolados C 23 e C 35 não houve amplificação com nenhum dos oligonucleotídeos específicos, ou seja, nem para *C. gloeosporioides*, nem para *C. acutatum*.

A caracterização molecular dos 37 isolados de *Colletotrichum* foi realizada com três oligonucleotídeos arbitrários. Trinta locos AP-PCR foram identificados nos isolados estudados, considerando todas as bandas, independente da intensidade, incluídas no intervalo de 400 a 1600 pb. Excluindo-se as bandas de intensidade fraca, foi possível analisar 24 bandas (locos) (Figura 2).

Não foi possível estabelecer uma relação do perfil de bandas entre os isolados de mesma origem geográfica, e/ou de mesma espécie hospedeira. A análise de agrupamento revelou a existência de três grupos que se repetiram quando se analisou todos os locos em conjunto, correspondendo aos agrupamentos obtidos com cada oligonucleotídeo em separado (dados não mostrados). Independente de suas origens geográficas ou de hospedeiro, os isolados Cg 2, Cg 14, Cg 15, Cg 16, Cg 32, Cg 37 e Cg 38 apresentaram o mesmo perfil de bandas para os três oligonucleotídeos testados (Figura 2), sendo arranjados no grupo II (Figura 3). O mesmo foi observado para os isolados Cg 6, C 23 e C 35 (grupo I). Porém, estes isolados foram obtidos da mesma espécie hospedeira (antúrio).

O oligonucleotídeo (GACAC)<sub>3</sub> foi aquele que gerou menos bandas polimórficas. Cerca de metade dos isolados (51,1%) apresentou o mesmo perfil de bandas, 29,7% apresentaram um segundo padrão, os quais fazem parte os isolados 2, 14, 15, 16, 32, 37 e 38, enquanto que os demais isolados (18,9%), dentre eles 6, 23 e 35 se enquadraram em padrões distintos. O oligonucleotídeo (GACA)<sub>4</sub> subdividiu os isolados em oito grupos distintos, com uma média de quatro isolados por grupo (Figura 2). Já o oligonucleotídeo (CAG)<sub>5</sub> foi aquele que propiciou o maior número de bandas polimórficas, onde quase metade dos isolados apresentou perfis únicos de banda.

## DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisada a diversidade de 35 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e 2 isolados de *Colletotrichum* sp. coletados em hastes florais de quatro espécies tropicais (antúrio, bastão do imperador, helicônia e musa) nos estados do Ceará, Paraíba e Pernambuco. As medidas de tamanho de conídios e apressórios, e coloração de colônia para todos os isolados estudados estão de acordo com o descrito para *C. gloeosporioides* (Sutton, 1980). Em concordância com a análise morfológica, a utilização de PCR com oligonucleotídeos espécie-específicos capazes de amplificar uma região do DNA nuclear ribossomal foi útil na identificação de *C. gloeosporioides* como agente causal da antracnose, confirmando resultados obtidos com os mesmos oligonucleotídeos para espécies de *Colletotrichum* de outras hospedeiras, como mandioca (Abrang *et al.*, 2006), oliveira (Talhinhas *et al.*, 2005) e lupinos (Talhinhas *et al.*, 2002).

Embora o DNA dos isolados C 23 e C 35 não tenham sido amplificados com os oligonucleotídeos específicos, foram identificados por meio das características morfológicas como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. A ausência de banda após a

amplificação utilizando o oligonucleotídeo CgInt já foi relatada para isolados provenientes de maracujá (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003) e mangueira (Serra, 2006), mas identificados pelas características morfológicas como *C. gloeosporioides*. Devido à natureza variável das regiões intergênicas, existe a possibilidade de que mutações tenham ocorrido nas posições de anelamento dos oligonucleotídeos, impedindo a amplificação do fragmento desejado.

De acordo com Bailey *et al.* (1992) todas as espécies de *Colletotrichum* produzem uma faixa ampla de enzimas, capazes de destruir os componentes estruturais dos tecidos da planta, acarretando morte celular. A utilização de meios de cultura contendo substratos específicos para verificação da produção de determinadas enzimas pelo fungo é uma metodologia que pode favorecer a diferenciação inter ou intra-específica de isolados de fungos fitopatogênicos (Menezes & Assis, 2004). Neste trabalho todos os isolados foram capazes de produzir enzimas extracelulares em meio sólido. Resultados semelhantes foram observados em isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de fruteiras tropicais (Lima Filho *et al.*, 2003) e em isolados de *C. musae* (Couto *et al.*, 2002). Algumas vezes é possível verificar correlação positiva entre a produção de determinada enzima e a agressividade dos isolados, conforme observado por Couto *et al.* (2002). No presente estudo, entretanto, nenhuma correlação entre a produção enzimática dos isolados e o tamanho das lesões pôde ser verificada.

Alguns isolados provenientes de antúrio, bastão do imperador e helicônia não foram patogênicos em seus hospedeiros de origem. Esse comportamento pode ser devido ao hábito endofítico ou perda de patogenicidade. Xiao *et al.* (2004) observaram que nove isolados provenientes de morango causaram os sintomas típicos da doença quando inoculados no hospedeiro de origem, com a exceção de um isolado. Resultados semelhantes foram obtidos por Chakraborty *et al.* (2002) onde 10% dos isolados de *C.*

*gloeosporioides* avaliados foram pouco ou muito pouco agressivos em cinco diferenciadoras de *Stylosanthes* spp. Nos testes de patogenicidade aqui realizados foi observado a capacidade de alguns isolados infectarem outras plantas ornamentais, sugerindo a possibilidade de ocorrência de infecções cruzadas naturais. Resultados semelhantes foram obtidos por Abang *et al.* (2006) ao observarem infecção cruzada entre isolados de *C. gloeosporioides* originários de mandioca, após inoculação em mamão, abacate e manga, induzindo sintomas moderados. Os mesmos isolados não foram capazes de causar sintomas em citrus. A capacidade de um isolado causar doença em outro hospedeiro pode estar relacionada com a quantidade de inóculo utilizado (Alahakoon *et al.*, 1994).

Análises de AP-PCR têm sido utilizadas na diferenciação de isolados de *Colletotrichum* de abacate e amêndoas (Freeman *et al.*, 1996) e em oliveira (Talhinhas *et al.*, 2005), dentre outras hospedeiras. Entretanto, não se têm conhecimento do uso do marcador AP-PCR no estudo da variabilidade de *Colletotrichum* sp. provenientes de plantas ornamentais. Os marcadores AP-PCR dividiram a população de *C. gloeosporioides* em três grupos (I, II e III), de acordo com os padrões de bandas gerados, sendo cada grupo foi representado por cerca de 1/3 dos isolados, evidenciando a variabilidade existente entre os isolados.

Poderia se esperar que houvesse algum tipo de separação entre os isolados amostrados no presente estudo, seja por origem geográfica, seja por hospedeiro de origem. Isolados coletados de diferentes hospedeiros apresentaram perfis de bandas semelhantes, o que permitiu serem distribuídos em um mesmo grupo (Figura 3). A ausência de relação entre agrupamento genético e patogenicidade observado neste estudo também foi observada em mandioca (Abang *et al.*, 2006) e *Stylosanthes* sp. (Weeds *et al.*, 2003) com o mesmo patógeno. Da mesma forma, isolados de origens

geográficas distintas, também apresentaram o mesmo padrão de bandas na AP-PCR. Isolados provenientes de municípios como Aldeia e Paulista no estado de Pernambuco, distantes cerca de 800 km dos municípios de Fortaleza e Guaramiranga no estado do Ceará, apresentaram perfis de bandas similares. A variabilidade aqui observada pode estar relacionada com a inespecificidade dos isolados, que também foi encontrada em isolados de maracujá coletados na Colômbia (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003). É possível também que isolados com padrões similares de bandas se comportem de forma diferente na patogenicidade (Xiao *et al.*, 2004).

A análise genética da população pode contribuir para o entendimento do potencial evolutivo de *C. gloeosporioides*, possibilitando o desenvolvimento de estratégias de manejo de controle apropriadas. É sabido que *C. gloeosporioides* é um fungo de limitada dispersão a longas distâncias e que o material vegetal infectado é a principal via de dispersão (Agrios, 2005). Portanto, infere-se que a troca de material vegetal infectado dentre e entre estados possa ser responsável pela disseminação de isolados desse patógeno, como pode ser evidenciado pela distribuição dos isolados analisados. O provável movimento de indivíduos entre regiões contribui para a não correlação entre distância genética e geográfica, reforçando a ocorrência do fluxo do patógeno via material vegetal infectado, onde o mesmo padrão de formação de banda pôde ser encontrado em municípios geograficamente distantes.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores expressam seus agradecimentos ao Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini da Universidade Federal de Viçosa por ter gentilmente cedido seu laboratório para a condução dos experimentos de caracterização molecular dos isolados. Os autores

também agradecem ao Prof. Dr. Sami J. Michereff da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelas valiosas sugestões durante a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

Abang MM, Asiedu R, Hoffmann P, Wolf GA, Mignouna HD, Winter S. 2006. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. *Journal of Phytopathology* 154, 51-61.

Afanador-Kafuri L, Minz D, Maymon M, Freeman S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93, 579-587.

Agrios, G. N. *Plant pathology*. San Diego: Academic Press, 2005. 922p.

Alahakoon PW, Brown, A. E., Screenivasaprasad S. 1994. Cross-infection potencial of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44, 93-103.

Almeida GT, Furtado DCM, Galvão ALB, Amorim EPR, Andrade DEGT. 2006. Antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em inflorescências de *Calathea burlemax* cv. Green no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31, S326.

Bailey JA, O' Connell RJ, Pring RJ, Nash C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey JA, Jeger MJ, eds. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford, UK: CABI, 88-120.

Barguil, BM, Oliveira SMA, Coelho RSB. 2005. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Heliconia chartacea* cv. Sex Pink. *Fitopatologia Brasileira* 30, S136.

Brown AE, Sreenivasaprasad S, Timmer LW. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and Key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86, 523-527.

Chakraborty S, Fernandes CD, Charchar MJA, Thomas MR. 2002. Pathogenic variation in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in a center of diversity in Brazil. *Phytopathology* 92, 553-562.

Couto, E. F.; Menezes, M.; Coelho, R. S. B. 2002. Avaliação da patogenicidade e diferenciação de isolados de *Colletotrichum musae*. *Summa Phytopathologica* 28, 260-266.

Ferreira ME, Grattapaglia D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, BR: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

Freeman S, Katan T, Shabi E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1014-1020.

Freeman S, Shabi E. 1996. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49, 395-404.

Hankin L, Anagnostakis SL. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67, 597-607.

Lima Filho RM, Oliveira SMA, Menezes M. 2003. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. *Fitopatologia Brasileira* 28, 620-625.

Lins SRO, Coelho RSB. 2004. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira* 29, 332-335.

Loges V, Teixeira MCF, Castro ACR, Costa AS. 2005. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. *Horticultura Brasileira* 23, 699-702.

Menezes M, Assis SMP. 2004. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Recife, BR: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Munaut F, Hamaide N, Maraite H. 2002. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. *Mycological Research* 106, 579-593.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 70, 3321-3323.

Paterson RRM, Bridge RLDL. 1994. *Biochemical techniques for filamentous fungi*. Cambridge, UK: CAB Internacional.

Peres NAR, Kuramae EE, Dias MSC, Souza NL. 2002. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology* 150, 128-134.

Pitta GPB, Cardoso EJBN, Cardoso RMG. 1990. *Doenças das plantas ornamentais*. São Paulo, BR: Instituto Brasileiro do Livro Científico.

Serra IMRS. 2006. *Colletotrichum gloeosporioides* agente de antracnose em cajueiro e mangueira: eficiência de métodos morfofisiológicos e moleculares na diferenciação e identificação específica dos isolados. Recife, Brazil: Universidade Federal Rural de Pernambuco, PhD thesis.

Sicard D, Michalakakis Y, Dron M, Neema C. 1997. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 87, 807-813.

Sutton BC, 1980. *The Coelomycetes*. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.

Talhinhas P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of Lupins. *Phytopathology* 92, 986-966.

Talhinhas P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2987-2998.

Warumby JF, Coelho RSB, Lins SRO. 2004. Principais doenças e pragas em flores tropicais no Estado de Pernambuco. Recife, BR: Sebrae.

Weeds PL, Chakraborty S, Fernandes CD, Charchar MJd'A, Ramesh CR, Kexian Y, Kelemu S. 2003. Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. *Phytopathology* 93, 176-185.

Xiao CL, Mackenzie SJ, Legard DE. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. *Phytopathology* 94, 446-453.

**Tabela 1** – Origem dos isolados de *Colletotrichum* de inflorescências de plantas tropicais.

Isolado	Origem		
	Hospedeiro	Cidade	Estado
Cg 1	<i>H. dimitri</i>	Alhandra	Paraíba
Cg 2	<i>H. chartacea</i>	Alhandra	Paraíba
Cg 3	<i>H. psitacorum</i>	Alhandra	Paraíba
Cg 4	<i>Anthurium</i> sp.	Guaiuba	Ceará
Cg 5	<i>H. bihai</i>	Guaiuba	Ceará
Cg 6	<i>Anthurium</i> sp.	Fortaleza	Ceará
Cg 7	<i>E. elatior</i>	Fortaleza	Ceará
Cg 8	<i>A.andraeanum</i>	Guaramiranga	Ceará
Cg 9	<i>A.andraeanum</i>	Guaramiranga	Ceará
Cg 10	<i>E. elatior</i>	Guaramiranga	Ceará
Cg 12	<i>H. chartacea</i>	Primavera	Pernambuco
Cg 14	<i>E. elatior</i>	Abreu e Lima	Pernambuco
Cg 15	<i>E. elatior</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 16	<i>M. coccinea</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 17	<i>E. elatior</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 18	<i>H. bihai</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 19	<i>H. chartacea</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 20	<i>E. elatior</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 21	<i>E. elatior</i>	Ribeirão	Pernambuco
Cg 22	<i>A.andraeanum</i>	Igarassu	Pernambuco
C 23	<i>A.andraeanum</i>	Igarassu	Pernambuco
Cg 25	<i>H. bihai</i>	Igarassu	Pernambuco
Cg 26	<i>H. bihai</i>	Igarassu	Pernambuco
Cg 27	<i>H. rostrata</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 28	<i>H. rostrata</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 29	<i>A.andraeanum</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 30	<i>A.andraeanum</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 31	<i>E. elatior</i>	Aldeia	Pernambuco
Cg 32	<i>M. coccinea</i>	Paulista	Pernambuco
Cg 33	<i>H. rostrata</i>	Paulista	Pernambuco
Cg 34	<i>A.andraeanum</i>	Paulista	Pernambuco
C 35	<i>A.andraeanum</i>	Paulista	Pernambuco
Cg 36	<i>E. elatior</i>	Paulista	Pernambuco
Cg 37	<i>E. elatior</i>	Paulista	Pernambuco
Cg 38	<i>E. elatior</i>	São Lourenço	Pernambuco
Cg 39	<i>H. bihai</i>	Paudalho	Pernambuco
Cg 40	<i>E. elatior</i>	Paudalho	Pernambuco

**Tabela 2** – Características morfológicas dos isolados de *Colletotrichum* de inflorescências de plantas tropicais.

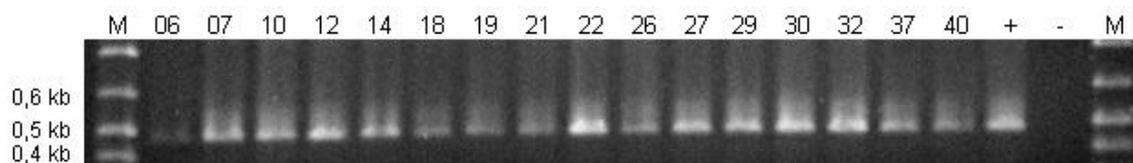
Isolado	Morfologia			
	Conídios (µm)		Apressórios (µm)	
Cg 1	14,5 (10–22,5)	3,2 (2,5-5)	12,7 (6,2-25,0)	3,2 (2,5-5,0)
Cg 2	10,4 (7,5-13,7)	3,5 (2,5-5)	11,0 (7,5-17,5)	5,7 (5,0-7,5)
Cg 3	13,7 (10-22,5)	3,8 (3,7-5)	7,0 (5,0-10,0)	6,2 (5,0-7,5)
Cg 4	16,7 (11-26,5)	3,6 (2,5-5)	10,2 (7,5-15,0)	6,5 (3,7-8,7)
Cg 5	11,8 (7,5-17,5)	3,4 (2,5-6,5)	10,9 (8,7-16,2)	6,9 (6,5-10)
Cg 6	17,0 (10-36,2)	4,2 (2,5-6,2)	11,1 (6,2-17,5)	7,2 (5,0-15)
Cg 7	11,7 (8,7-15,0)	4,3 (2,5-5,0)	9,1 (6,2-13,7)	5,8 (5,0-7,5)
Cg 8	11,3 (8,7-13,7)	3,8 (2,5-5,0)	np	np
Cg 9	12,3 (6,2-21,2)	3,5 (2,5-6,2)	8,9 (6,2-12,5)	5,9 (3,7-8,7)
Cg 10	14,6 (11,2-18)	3,7 (3,7)	14,3 (7,5-18,7)	5,5 (5-6,2)
Cg 12	14,2 (7,5-25,0)	3,7 (2,5-5,0)	10,1 (7,5-13,7)	6,3 (5,0-8,7)
Cg 14	11,7 (8,7-18,7)	4,5 (2,5-5,0)	8,5 (6,2-13,7)	5,1 (3,7-6,2)
Cg 15	10,5 (7,5-15,0)	3,5 (2,5-5,0)	7,5 (6,2-11,2)	5,3 (3,7-6,2)
Cg 16	13,5 (8,7-21,2)	3,7 (2,5-5,0)	11,0 (6,2-15,0)	5,5 (5,0-6,2)
Cg 17	15,5 (11,2-31)	4,3 (2,5-6,2)	12,5 (6,2-18,7)	7,1 (5-11,2)
Cg 18	14,4 (8,7-22,5)	3,6 (2,5-5,0)	8,9 (6,2-13,7)	5,8 (5,0-7,5)
Cg 19	13,7 (8,7-23,7)	3,3 (2,5-5,0)	np	np
Cg 20	13,8 (10-24,0)	3,0 (2,5-3,7)	7,2 (5,0-10,0)	5,2 (3,7-7,5)
Cg 21	12,2 (7,5-16,5)	3,4 (2,5-5,0)	6,6 (5,0-10,0)	5,5 (3,7-7,5)
Cg 22	15,5 (7,5-23,7)	4,0 (2,5-5,0)	9,8 (6,2-12,5)	6,0 (3,7-8,7)
C 23	17,1 (13,7-32)	4,7 (3,7-5,0)	np	np
Cg 25	14,3 (10-23,7)	3,8 (2,5-5,0)	7,4 (5,0-11,2)	6,0 (5,0-7,5)
Cg 26	14,2 (8,7-25,0)	4,2 (3,7-6,2)	8,6 (6,2-13,7)	5,9 (3,7-7,5)
Cg 27	12,8 (8,7-21,2)	3,9 (2,5-5,0)	11,8 (8,7-17,5)	6,7 (6,2-8,7)
Cg 28	17,6 (8,7-33,7)	3,4 (2,5-5,0)	9,2 (6,2-13,7)	6,1 (3,7-8,7)
Cg 29	13,7 (8,7-22,5)	4,4 (2,5-6,2)	9,9 (7,5-13,7)	6,7 (5-11,2)
Cg 30	12,3 (7,5-18,7)	3,7 (2,5-5,0)	9,5 (7,5-12,5)	6,2 (5,0-8,7)
Cg 31	15,9 (12-23,7)	4,3 (3,7-5,0)	15,6 (12-22,5)	6,1 (5,0-7,1)
Cg 32	12,4 (7,5-26,2)	3,2 (2,5-5,0)	8,5 (6,2-12,5)	5,6 (5,0-6,2)
Cg 33	10,7 (7,5-16,2)	2,8 (2,5-3,7)	11,1 (7,5-16,2)	6,0 (5,0-7,5)
Cg 34	12,7 (7,5-20,0)	3,5 (2,5-6,2)	10,2 (6,2-17,5)	5,7 (5,0-6,2)
C 35	15,0 (11-31,2)	4,7 (3,7-6,2)	12,5 (6,2-21,2)	7,9 (3,7-15)
Cg 36	13,2 (8,7-18,7)	3,6 (2,5-3,7)	9,6 (7,5-16,2)	5,6 (5,0-7,5)
Cg 37	12 (7,5-17,5)	3,5 (2,5-6,2)	9,2 (6,2-12,5)	5,1 (3,7-6,2)
Cg 38	12,3 (7,5-18,6)	3,7 (2,5-5,0)	9,5 (7,5-12,5)	6,2 (5,0-8,7)
Cg 39	16,7 (10-32,5)	4,3 (3,7-6,2)	8,9 (5,0-12,5)	6,1 (5,0-7,5)
Cg 40	11,8 (3,7-17,5)	3,5 (2,5-6,2)	9,0 (6,2-15,0)	6,3 (5,0-8,7)

<sup>1</sup> Não produziu apressório.

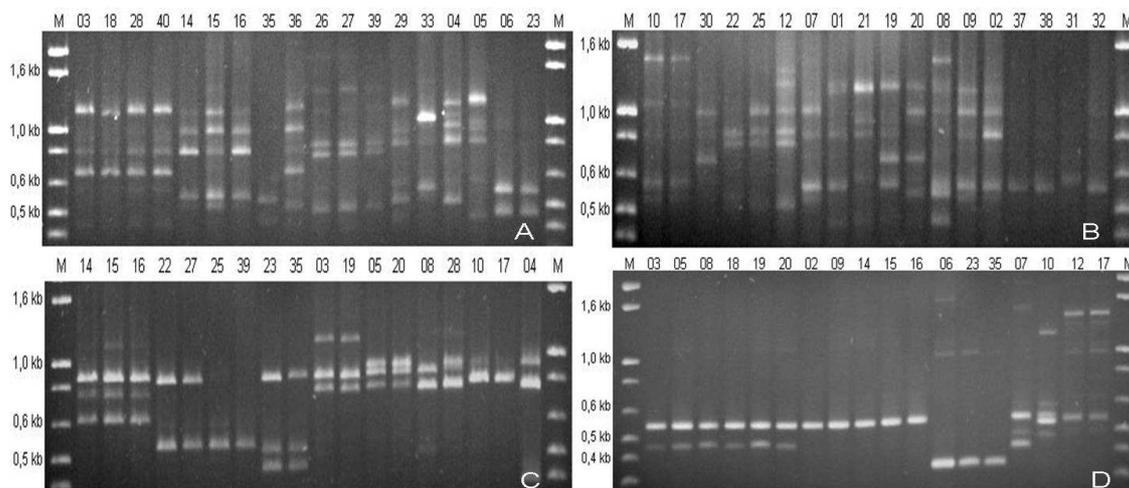
**Tabela 3** – Atividade de enzimas extracelulares em meio sólido e agressividade de isolados de *Colletotrichum* em hastes florais de diferentes plantas ornamentais tropicais.

Isolado	Enzimas em meio sólido			Agressividade		
	Amilolítica	Lipolítica	Proteolítica	Antúrio	Bastão	Heliconia
Cg 1	4.05 c <sup>1</sup>	0.82 b	7.00 b	0.00 d	0.72 b	0.58 d
Cg 2	5.11 a	0.55 c	6.19 d	0.00 d	0.77 b	0.55 d
Cg 3	4.00 c	0.81 b	6.59 c	0.00 d	0.55 b	0.00 e
Cg 4	5.23 a	0.52 c	7.12 b	0.00 d	0.00 d	0.00 e
Cg 5	4.30 c	0.36 c	6.69 c	0.63 a	0.75 b	0.64 c
Cg 6	5.51 a	0.28 c	6.89 b	0.00 d	0.38 c	0.00 e
Cg 7	4.69 b	0.26 c	7.29 a	0.33 b	0.74 b	0.56 d
Cg 8	5.01 a	0.38 c	7.43 a	0.00 d	0.60 b	0.55 d
Cg 9	4.14 c	0.36 c	6.47 c	0.00 d	0.00 d	0.57 d
Cg 10	4.18 c	0.27 c	3.67 g	0.00 d	1.29 a	0.00 e
Cg 12	4.17 c	0.52 c	7.17 b	0.31 b	0.00 d	0.90 a
Cg 14	4.98 a	0.69 b	7.37 a	0.25 c	0.56 b	0.66 c
Cg 15	4.53 b	0.72 b	7.13 b	0.00 d	0.85 b	0.00 e
Cg 16	4.10 c	0.63 b	6.85 b	0.00 d	0.65 b	0.00 e
Cg 17	3.20 d	0.30 c	4.57 f	0.00 d	1.41 a	0.56 d
Cg 18	5.08 a	0.65 b	5.76 e	0.40 b	0.00 d	0.00 e
Cg 19	5.07 a	1.09 a	7.26 a	0.65 a	0.40 c	0.00 e
Cg 20	4.95 a	0.55 c	7.19 b	0.25 c	0.38 c	0.00 e
Cg 21	5.43 a	0.47 c	5.90 e	0.00 d	0.55 b	0.00 e
Cg 22	5.19 a	0.66 b	6.98 b	0.60 a	0.62 b	0.00 e
C 23	4.73 b	0.44 c	6.66 c	0.00 d	0.00 d	0.62 c
Cg 25	3.04 d	0.51 c	6.37 c	0.00 d	0.00 d	0.71 c
Cg 26	4.77 b	0.53 c	6.23 d	0.00 d	0.00 d	0.68 c
Cg 27	5.28 a	0.38 c	6.95 b	0.56 a	0.33 c	0.68 c
Cg 28	4.80 b	0.66 b	7.21 b	0.61 a	0.54 b	0.70 c
Cg 29	5.10 a	0.55 c	7.34 a	0.63 a	0.37 c	0.75 b
Cg 30	5.15 a	0.54 c	7.22 b	0.51 a	0.28 c	0.65 c
Cg 31	3.10 d	1.00 a	4.49 f	0.00 d	1.35 a	0.64 c
Cg 32	4.27 c	0.61 b	7.30 a	0.00 d	0.00 d	0.00 e
Cg 33	4.06 c	0.50 c	6.42 c	0.00 d	0.62 b	0.00 e
Cg 34	4.66 b	0.36 c	7.25 a	0.51 a	0.00 d	0.62 c
C 35	4.84 b	0.26 c	6.72 c	0.00 d	0.52 b	0.00 e
Cg 36	4.66 b	0.62 b	7.71 a	0.00 d	0.70 b	0.00 e
Cg 37	4.33 c	0.44 c	7.10 b	0.00 d	0.60 b	0.63 c
Cg 38	4.35 c	0.59 b	7.45 a	0.00 d	0.49 b	0.00 e
Cg 39	4.98 a	0.26 c	7.59 a	0.65 a	0.60 b	0.60 d
Cg 40	4.96 a	0.46 c	7.45 a	0.00 d	0.66 b	0.66 c
cv (%)	7.26	23.69	3.74	45.57	41.76	18.94

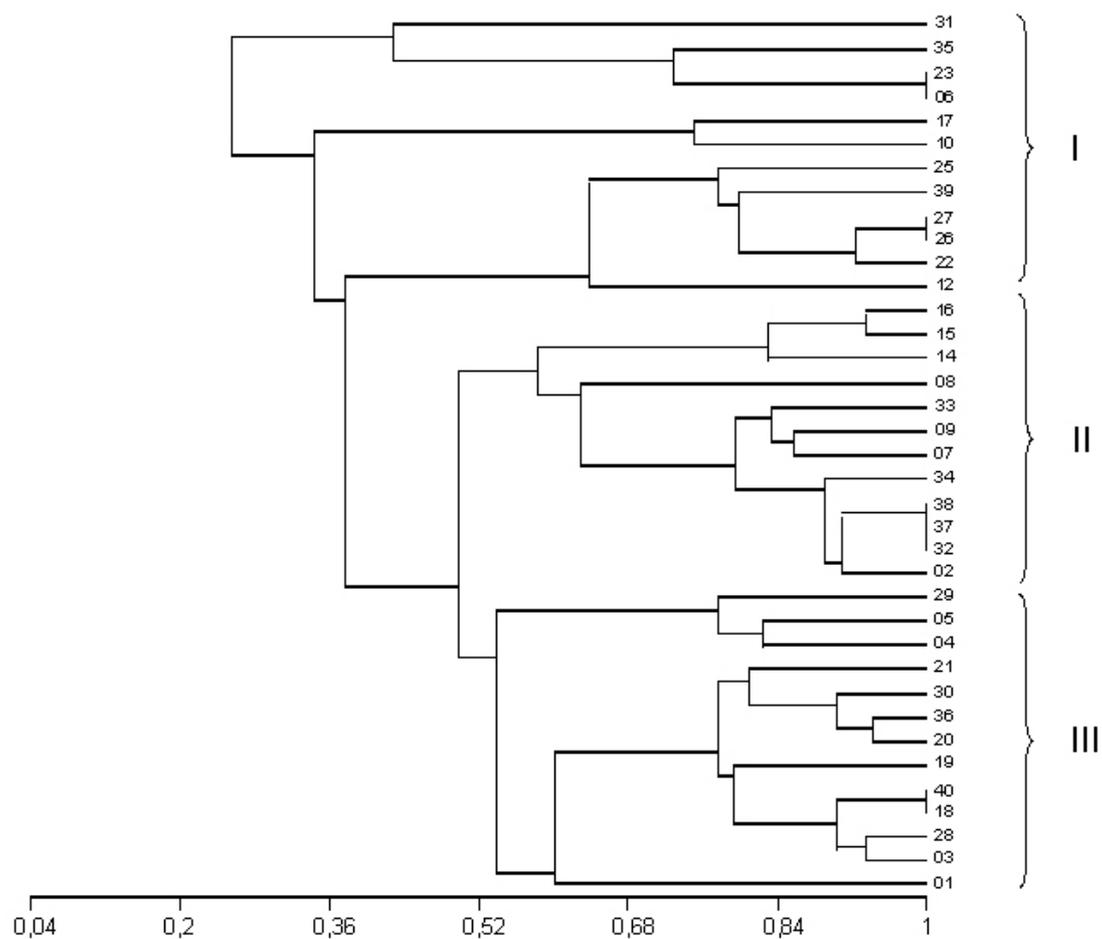
<sup>1</sup> Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.



**Fig. 1** - Produtos da amplificação obtidos por PCR utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos. Todos os isolados testados e dois isolados referência foram analisados com os oligonucleotídeos CgInt e ITS4. Para todos os isolados foi gerado um fragmento de 450 pb correspondente à espécie *C. gloeosporioides*, com exceção dos isolados C 23 e C 35. Linha M: 1Kb Ladder Plus; colunas 06 a 40: amostra dos isolados analisados; (+): isolado referência de *C. gloeosporioides*; e (-): isolado referência de *C. acutatum*.



**Fig. 2** - Produtos da amplificação obtidos por análise de PCR utilizando oligonucleotídeos arbitrários (AP-PCR), com os oligonucleotídeos (CAG)<sub>5</sub> (A e B), (GACA)<sub>4</sub> (C) e (GACAC)<sub>3</sub> (D). Linha M: 1Kb Ladder Plus; colunas numeradas: padrões de AP-PCR obtidos com os isolados analisados.



**Fig. 3** - Dendrograma de similaridade genética dos 37 isolados de *Colletotrichum* baseado em análise de agrupamento UPGMA de uma matriz de similaridade (Nei & Li) gerada a partir do perfil AP-PCR com três diferentes oligonucleotídeos.

## **CAPITULO III**

---

# **ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DA ANTRACNOSE EM BASTÃO DO IMPERADOR**

## Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da antracnose em bastão do imperador

Beatriz Meireles Barguil<sup>1</sup>, Igor Corrêa Lima Albert<sup>1</sup>, Sami Jorge Michereff<sup>1,2</sup>, Sônia Maria Alves de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia – Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: biabar@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

Autor para correspondência: Sami J. Michereff <sami@ufrpe.br>

Aceito para publicação em:

---

### RESUMO

Barguil, B.M.; Albert, I.C.L.; Michereff, S.J.; Oliveira, S.M.A. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da antracnose em bastão do imperador. *Summa Phytopathologica*

A antracnose em bastão do imperador, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, encontra-se disseminada em diversos plantios comerciais no Nordeste brasileiro. É uma importante doença para a cultura ocorrendo principalmente na época de colheita e de pós-colheita das hastes florais. Apesar da importância da doença, inexistem estudos epidemiológicos no Brasil e, para que esses estudos sejam realizados, é necessário o desenvolvimento de métodos padronizados de quantificação da severidade da doença no campo. Por essa razão, foi elaborada uma escala diagramática com os níveis de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 82 e 92% de área da bráctea lesionada, testando-se a acurácia, a precisão e a reprodutibilidade das estimativas de severidade da antracnose em bastão do imperador com e sem a utilização da escala. Para validação da escala diagramática, 45 brácteas com diferentes níveis de severidade da doença,

mensurados previamente com o programa Assess<sup>®</sup>, foram avaliadas por 10 pessoas sem e com a utilização da escala diagramática. Foram realizadas duas avaliações com utilização da escala, com intervalo de uma semana, alterando-se a seqüência das brácteas a serem avaliadas. A partir das análises por regressão linear simples foram determinadas a acurácia e a precisão de cada avaliador, entre a severidade real e a estimada. Sem a escala, os avaliadores tanto superestimaram quanto subestimaram a severidade da doença, com tendência a superestimar. Com a escala, os avaliadores obtiveram melhores níveis de acurácia e precisão, com os erros absolutos concentrando-se na faixa de 10%. Os avaliadores apresentaram boa repetibilidade e elevada reprodutibilidade das estimativas com a utilização da escala, o mesmo não sendo verificado sem a utilização desta. A escala diagramática proposta mostrou-se adequada para avaliação da severidade da antracnose em bastão do imperador.

Palavras-chave adicionais: *Etilingera elatior*, *Colletotrichum gloeosporioides*, quantificação, severidade.

### ABSTRACT

Barguil, B.M.; Albert, I.C.L.; Michereff, S.J.; Oliveira, S.M.A. Development and validation of a diagrammatic key for anthracnose of torch ginger. *Summa Phytopathologica*

Anthracnose of torch ginger caused by *Colletotrichum gloeosporioides* occurs throughout every commercial fields on Brazilian Northeast. It is an important disease for this crop occurring on flowers mainly on harvest and post-harvest time. In spite of the importance of this disease no epidemiological studies exist in Brazil and in order to perform them it is necessary to develop standard methods to quantify disease severity in field. Hence a diagrammatic key including the levels 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 82 and 92% of diseased bracts area was elaborated and tested for accuracy, precision and reproducibility of the estimative of anthracnose severity with and without using the key. The diagrammatic key was validated by 10 raters using 45 bracts with different levels of severity previously measured by the software

Assess<sup>®</sup> for Windows with and without using the key. Two evaluations were performed with the key at 7-day intervals when different sequences of the same leaves were visually estimated. The accuracy and precision of each rater were determined by simple linear regression between actual and estimated severity. Without the key, raters overestimated and underestimate the disease severity. With the key raters obtained better levels of accuracy and precision, with absolute errors concentrated around 10%. Raters showed good repeatability and high reproducibility of estimative by using the key compared to the no use of it. The proposed diagrammatic key is suitable for the evaluation of severity of anthracnose of torch ginger.

Additional keywords: *Etilingera elatior*, *Colletotrichum gloeosporioides*, assessment, severity.

---

O bastão do imperador [*Etilingera elatior* (Jack) Smith] é uma espécie vegetal com elevado valor ornamental, que possui hábito herbáceo, rizomatoso, porte ereto, em touceiras que podem atingir de dois a quatro metros de altura. Apresenta inflorescências grandes, sustentadas por hastes que medem entre 1,0 e 1,5 metro de altura, com coloração vermelha (cv. Red Torch), rosa (cv. Pink Torch) ou rosa-claro (cv. Porcelain) (11). Em Pernambuco, a qualidade das inflorescências pode ser seriamente comprometida devido à ocorrência da antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (10, 19). Os sintomas típicos da doença são lesões encharcadas, deprimidas e com formato elíptico, seguidas de necrose de coloração escura, geralmente ocorrendo nas brácteas florais mais externas e, posteriormente, nas mais internas (10).

Estudos envolvendo epidemiologia de doenças em culturas ornamentais tropicais são inexistentes, talvez porque o setor não apresentava lugar de destaque nas exportações brasileiras. No entanto, nos últimos cinco anos a floricultura nacional vem assumindo posição de destaque, cujas exportações podem alcançar a marca de US\$ 80 milhões em 2007 (6). Para a realização de estudos epidemiológicos e de comparação de estratégias de controle, é

necessário o desenvolvimento de métodos padronizados de quantificação da severidade da doença. Considerando que a antracnose do bastão do imperador é uma mancha nas brácteas, sua intensidade é melhor expressa pela determinação da severidade, ou seja, porcentagem ou proporção de área da bráctea lesionada.

A severidade de doenças é geralmente estimada visualmente. Para auxiliar o avaliador e minimizar a subjetividade da estimativa, o uso de escalas diagramáticas tem sido uma ferramenta bastante útil. Uma escala diagramática é a representação ilustrada de uma série de plantas, ou partes de plantas, com sintomas em diferentes níveis de severidade da doença, devendo ser de fácil utilização, aplicável em várias condições e com resultados reproduzíveis (2). Após a elaboração, os níveis de acurácia e precisão das estimativas propiciados pela utilização da escala diagramática devem ser analisados para determinar a qualidade das estimativas (7, 15). Acurácia refere-se à proximidade de uma estimativa a um valor real de quantidade de doença avaliada, enquanto precisão refere-se à confiabilidade e/ou repetibilidade associadas com uma estimativa (3). O único estudo de desenvolvimento e validação de escala diagramática para quantificação de doença em espécie de interesse ornamental foi da ferrugem do crisântemo (*Chrysanthemum* spp.), causada por *Puccinia horiana* Henn. (1).

Considerando a inexistência de métodos padronizados para quantificação da antracnose do bastão do imperador, este trabalho teve como objetivos desenvolver uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença e analisar os níveis de acurácia e precisão das estimativas geradas com sua utilização.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Elaboração da escala diagramática

Para elaboração da escala diagramática foram coletadas 100 brácteas externas de bastão do imperador (cv. Red Torch) em plantios comerciais no município de Paulista - PE,

com diferentes níveis de severidade de antracnose. As brácteas foram digitalizadas a 200 dpi e reproduzidas por fotocópias coloridas. Com auxílio do programa Assess<sup>®</sup> (8), foi determinada a porcentagem de área lesionada de cada bráctea, representando o grau de severidade da doença. Baseando-se no valor máximo de severidade da doença constatada nas brácteas coletados, na forma, distribuição e frequência das lesões, foi confeccionada uma escala diagramática logarítmica com nove níveis de severidade.

### **Validação da escala diagramática**

No teste de validação da escala diagramática foram utilizadas 45 brácteas de bastão do imperador com sintomas de antracnose em diferentes níveis de intensidade, reproduzidas em fotocópias coloridas. A severidade foi avaliada por 10 pessoas sem experiência na quantificação da doença, designadas pelas doenças de A a J. Inicialmente, a severidade foi estimada sem o auxílio da escala diagramática e, após sete dias foi realizada uma primeira avaliação com o auxílio desta. Visando avaliar a repetibilidade das estimativas com a escala diagramática, após sete dias, nova seqüência das mesmas brácteas foi organizada e uma segunda estimativa visual foi efetuada com o auxílio da escala pelos mesmos avaliadores.

A acurácia e a precisão de cada avaliador foram determinadas por meio de regressão linear simples, com a severidade real obtida eletronicamente como variável independente e a severidade estimada pelo avaliador como variável dependente. A acurácia das estimativas de cada avaliador e do conjunto de avaliadores foi determinada pelo teste *t* aplicado ao intercepto da regressão linear (*a*), para verificar a hipótese  $H_0: a = 0$ , e ao coeficiente angular da reta (*b*), para testar a hipótese  $H_0: b = 1$ , ao nível de 5% de probabilidade ( $P=0,05$ ). Valores de intercepto significativamente diferentes de 0 (zero) indicam superestimativa ( $>0$ ) ou subestimativa ( $<0$ ) da severidade real a níveis baixos de intensidade da doença, enquanto valores de coeficiente angular da reta que desviam significativamente de 1 (um) indicam superestimativa ( $>1$ ) ou subestimativa ( $<1$ ) sistemática da severidade real em todos os níveis de intensidade da doença. A precisão das estimativas foi determinada pelo coeficiente de

determinação da regressão ( $R^2$ ), pela variância dos erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) e pela repetibilidade das estimativas, determinada pela regressão da segunda avaliação em relação à primeira de uma mesma unidade amostral. A reprodutibilidade das estimativas foi determinada pelos valores de  $R^2$  obtidos de regressões lineares entre as severidades estimadas da mesma unidade amostral por diferentes avaliadores combinados em pares (3, 7, 15, 17). As análises de regressão foram efetuadas com o auxílio do programa Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, 2003).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O valor máximo de severidade da antracnose em brácteas de bastão do imperador coletadas em plantios comerciais foi de 91,8%. A escala diagramática elaborada para quantificação da severidade da doença foi representada pelos valores de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 82 e 92% de área da bráctea lesionada (Figura 1).

Na primeira etapa de validação da escala diagramática, ou seja, sem a sua utilização, os valores do intercepto de 80% dos avaliadores diferiram significativamente de zero ( $P \leq 0,05$ ) para as retas de regressão entre a severidade real e a estimada (Tabela 1). A maioria desses avaliadores superestimou a severidade da antracnose em bastão do imperador, indicando a presença de desvios positivos constantes para todos os níveis de severidade da doença. Na média dos avaliadores, o valor do intercepto foi de 4,12 e diferiu significativamente de zero (Tabela 1). Essa superestimativa dos níveis de severidade da doença sem o uso da escala assemelha-se ao constatado em diversos estudos de validação de escalas diagramáticas (1, 5, 9, 13, 14, 18). Com a utilização da escala, os valores do intercepto de 40% dos avaliadores (A, B, F e H) diferiram significativamente de zero ( $P \leq 0,05$ ) na primeira avaliação e 30% (A, B e F) na segunda, todos com desvios negativos constantes, ou seja, com tendência a subestimativa. Os valores do coeficiente angular da reta de 30% dos avaliadores diferiram significativamente de 1 ( $P \leq 0,05$ ) sem a utilização da escala diagramática, indicando a

presença de desvios sistemáticos. Com a utilização da escala, nenhum dos avaliadores apresentou coeficiente angular significativamente diferente de 1 ( $P \leq 0,05$ ) nas duas avaliações (Tabela 1), assemelhando-se ao constatado na validação da escala do carvão da folha do caupi (12).

A análise da precisão das estimativas visuais da severidade sem a utilização da escala diagramática explicou de 72 a 89% da variação ( $R^2$ ) na mensuração eletrônica da doença, com média de 84% (Tabela 1). Esses valores podem ser considerados elevados, tendo em vista a inexperiência dos avaliadores, o que pode ser decorrente da facilidade da estimativa da severidade dessa doença, principalmente devido ao tipo de lesão e a coalescência das mesmas. Com a utilização da escala, na primeira avaliação as estimativas visuais explicaram 91 a 95% da variação na mensuração eletrônica, com média de 93%, enquanto na segunda avaliação, as estimativas visuais explicaram 93 a 97% da variação, com média de 95%. Os elevados níveis de precisão das estimativas visuais da antracnose em bastão do imperador com auxílio da escala diagramática assemelham-se aos verificados em outros estudos de validação de escalas (1, 4, 5, 9, 14, 18), tendo alcançado a média de 95%, considerada a desejável (7).

A maioria dos avaliadores obteve boa repetibilidade nas estimativas, pois a quantidade média de variação na primeira avaliação explicada pela segunda avaliação foi de 95% (Tabela 2). Para apenas um avaliador, o valor do intercepto diferiu de zero ( $P \leq 0,05$ ), enquanto que para todos os avaliadores o valor do coeficiente angular da reta não foi significativamente diferente de 1 ( $P \leq 0,05$ ) (Tabela 2).

A distribuição dos resíduos, que representa a diferença entre os valores estimados visualmente e os reais obtidos eletronicamente na quantificação da severidade, sem a utilização da escala diagramática foram elevadas, variando entre -18,98 e 36,12%, com média de 8,8% (Figura 2A). Nas duas avaliações com o auxílio da escala os resíduos concentraram-se na faixa de 10% e não atingiram valores superiores a 20% (Figura 2B e 2C), com médias de 0,80% na primeira avaliação com a escala e de -0,68% na segunda. Esses níveis de

resíduos são considerados aceitáveis segundo os critérios adotados em estudos de avaliação de escalas diagramáticas e podem ser reduzidos com o treinamento dos avaliadores (15).

A utilização de uma escala por diferentes avaliadores deve resultar na obtenção dos mesmos valores de severidade (17). A reprodutibilidade das avaliações entre os avaliadores combinados aos pares, também pode ser utilizada como um indicativo de precisão de um método de quantificação de doenças (16). As regressões lineares entre as severidades estimadas pelos 10 avaliadores, quando não utilizaram a escala diagramática, produziram coeficientes de determinação ( $R^2$ ) variando de 67 a 92%, sendo que em somente 6,7% dos casos foi  $\geq 90\%$  (Tabela 3). Os valores de  $R^2$  foram mais elevados nas duas avaliações com a utilização da escala. Os valores variaram entre 84 e 97% na primeira avaliação com a escala, sendo  $\geq 90\%$  em 75,6% dos casos, enquanto na segunda avaliação variaram entre 89 e 97%, sendo  $\geq 90\%$  em 91,1% dos casos. Portanto, com o emprego da escala diagramática, as estimativas da severidade da antracnose em bastão do imperador estiveram próximas a uma concordância ideal, indicando alta precisão (17).

O uso da escala diagramática propiciou aumento significativo nos níveis de acurácia e precisão das estimativas, confirmando a importância sua utilização para “calibrar” o sistema visual do avaliador. A padronização de uma metodologia de quantificação de doença é desejável, pois permite comparações entre os resultados obtidos em diferentes instituições e localidades (14). A escala diagramática proposta para quantificação da antracnose em bastão do imperador mostrou ser de fácil utilização, capaz de fornecer uma rápida estimativa da doença, podendo ser utilizada em estudos de comportamento de cultivares, efeito de produtos no manejo da doença, bem como análise de progresso e disseminação da doença.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores expressam seus agradecimentos a todos os avaliadores que participaram das etapas de validação da escala diagramática.

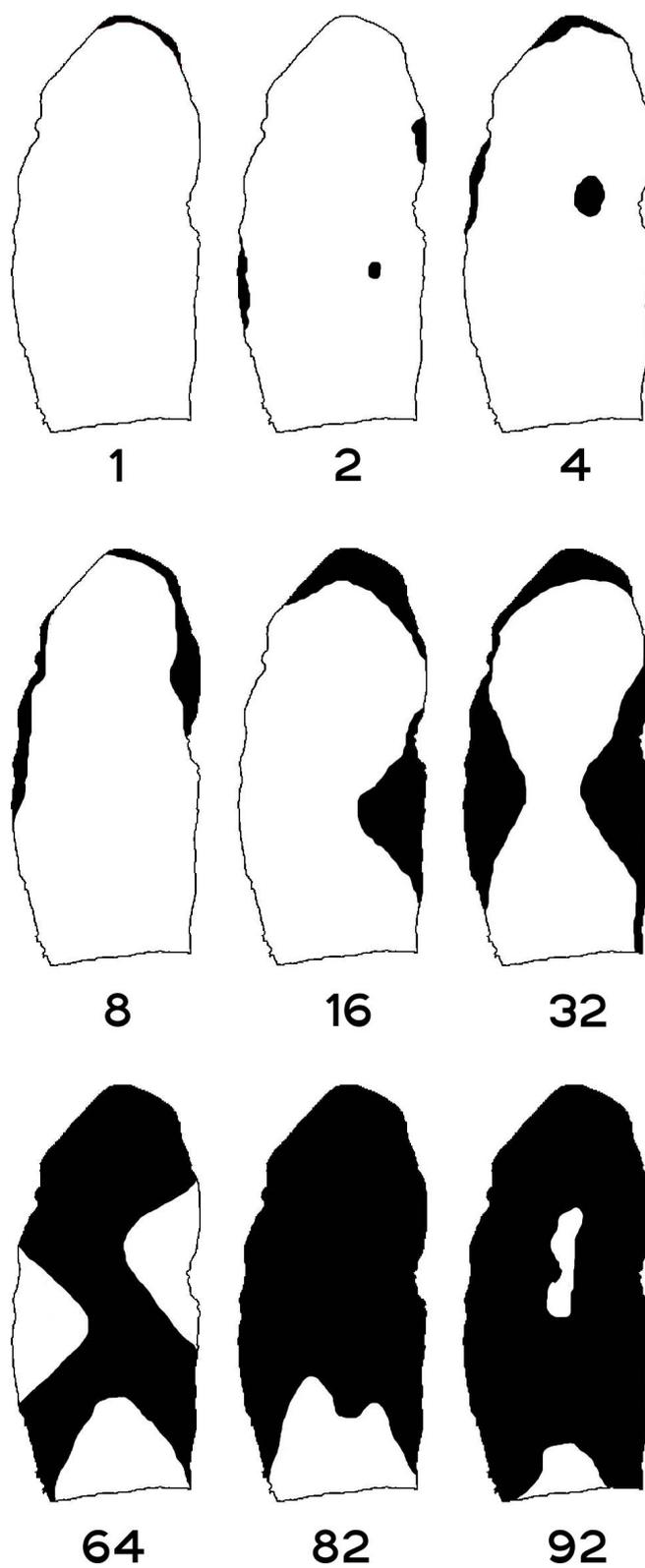
## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barbosa, M.A.G.; Michereff, S.J.; Mora-Aguilera, G. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem branca do crisântemo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.1, p.57-62, 2006.
2. Bergamin Filho, A.; Amorim, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.
3. Campbell, C.L.; Madden, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. 532p.
4. Díaz, C.G.; Bassanezi, R.B.; Bergamin Filho, A. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.35-39, 2001.
5. Halfeld-Vieira, B.A.; Nechet, K.L. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da mancha-de-cercospora em melancia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.1, p.46-50, 2006.
6. IBRAFLOR. **Instituto Brasileiro de Floricultura**. Disponível em: <http://www.ibraflor.com.br>. Acesso em: 29.10.2006.
7. Kranz, J. Measuring plant disease. In: Kranz, J.; Rotem, J. (Eds) **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. p.35-50.
8. Lamari, L. ASSESS: image analysis software for plant diseases. St Paul: APS Press, 2005. CD-Rom.
9. Leite, R.M.V.B.C.; Amorim, L. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de *Alternaria* em girassol. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, n.1, p.14-19, 2002.

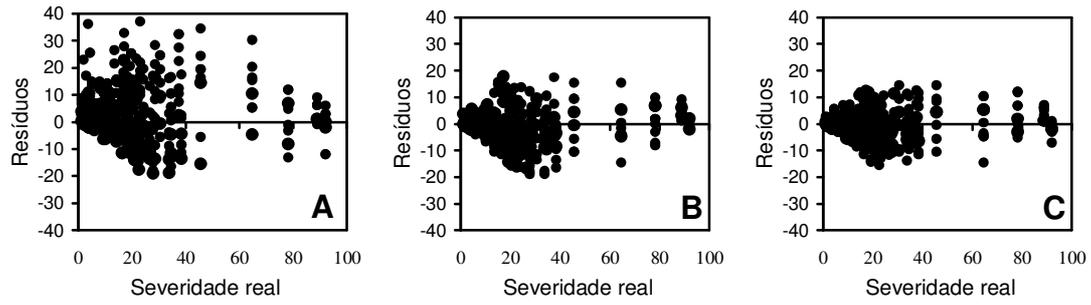
10. Lins, S.R.O.; Coelho, R.S.B. Antracnose em inflorescências de bastão do imperador (*Etilingera elatior*): ocorrência e métodos de inoculação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.4, p.355-358, 2003.
11. Lorenzi, H.; Souza, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1120p.
12. Michereff, S.J.; Andrade, D.E.G.T.; Noronha, M.A. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade do carvão da folha do caupi. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.1, p.51-56, 2006.
13. Michereff, S.J.; Noronha, M.A.; Andrade, D.E.G.T.; Oliveira, E.P.; Xavier Filha, M.S.; Moreira, P.A.A. Elaboração e validação de escala diagramática para a cercosporiose do pimentão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.1, p.57-62, 2006.
14. Nascimento, A. R. P.; Michereff, S. J.; Mariano, R. L. R.; Gomes, A. M. A. Elaboração e validação de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, n.1, p.59-64, 2005.
15. Nutter Jr., F.W.; Esker, P.D.; Coelho Netto, R.A. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.115, n.1, p.95-103, 2006.
16. Nutter Jr., F.W.; Gleason, M.L.; Jenco, J.H.; Christians, N.C. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.8, p.806-812, 1993.
17. Nutter Jr., F.W.; Schultz, P.M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.17, n.1, p.174-184, 1995.
18. Tovar-Soto, A.; Hernandez-Martínez, M.; Cristóbal-Alejo, J.; Romero-Hijo, R.; Mora-Aguilera, G. Escala logarítmica diagramática de severidade de la mancha negra

(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill). **Revista Mexicana de Fitopatología**, Obregón, v. 20, n.1, p.103-109, 2002.

19. Warumby, J.F.; Coelho, R.S.B.; Lins, S.R.O. **Principais doenças e pragas em flores tropicais no Estado de Pernambuco**. Recife: Sebrae, 2004. 98p.



**Figura 1.** Escala diagramática para avaliação da antracnose em brácteas de bastão do imperador indicando os níveis de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 82 e 92% de severidade.



**Figura 2.** Distribuição dos resíduos (severidade estimada - severidade real) das estimativas da antracnose em bastão do imperador realizadas sem o auxílio da escala diagramática (A) e com auxílio da escala diagramática na primeira (B) e segunda (C) avaliação.

**Tabela 1.** Estimativas do intercepto ( $a$ ), do coeficiente angular da reta ( $b$ ) e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de equações de regressão linear simples relacionando estimativas visuais da antracnose em bastão do imperador efetuadas por 10 avaliadores, sem e com o auxílio da escala diagramática.

Avaliador	Sem Escala			Com Escala					
				1ª. Avaliação			2ª. Avaliação		
	$a$	$b$	$R^2$	$a$	$b$	$R^2$	$a$	$b$	$R^2$
A	12,63*	0,81*	0,74	-6,29*	1,03	0,91	-3,83*	0,99	0,94
B	2,59*	1,05	0,87	-5,19*	1,03	0,92	-4,42*	1,04	0,95
C	4,47*	1,14*	0,72	0,12	1,05	0,92	0,13	1,04	0,93
D	3,31*	0,97	0,83	0,77	1,03	0,93	1,92	1,04	0,96
E	1,81	0,97	0,88	0,12	1,00	0,94	0,35	0,99	0,95
F	-2,13	0,87*	0,89	-4,50*	0,95	0,94	-3,82*	0,97	0,95
G	9,40*	0,96	0,82	-0,82	0,99	0,94	-0,35	0,98	0,94
H	-4,48*	0,97	0,88	-4,33*	1,05	0,95	-2,09	1,02	0,97
I	4,42*	1,05	0,89	1,25	1,02	0,94	1,91	1,05	0,96
J	9,13*	0,96	0,88	0,83	1,00	0,93	0,48	0,99	0,96
Média	4,12*	0,98	0,84	-1,80	1,02	0,93	-0,97	1,01	0,95

\*Asterisco representa situações onde a hipótese de nulidade ( $a=0$  ou  $b=1$ ) foi rejeitada pelo teste  $t$  ( $P=0,05$ ).

**Tabela 2.** Estimativas do intercepto ( $a$ ), do coeficiente angular da reta ( $b$ ) e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de equações de regressão linear simples relacionando a segunda à primeira estimativa da antracnose em bastão do imperador por um mesmo avaliador, com o auxílio da escala diagramática.

Avaliador	$a$	$b$	$R^2$
A	3,01*	0,92	0,94
B	1,41	0,97	0,96
C	1,38	0,94	0,92
D	2,14	0,96	0,94
E	0,96	0,96	0,94
F	1,27	1,00	0,95
G	0,87	0,97	0,97
H	2,10	0,94	0,95
I	1,52	1,00	0,95
J	0,75	0,94	0,94
Média	1,54	0,96	0,95

\*Asterisco indica que a hipótese de nulidade ( $a=0$  ou  $b=1$ ) foi rejeitada pelo teste  $t$  ( $P=0,05$ ).

**Tabela 3.** Frequência dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de equações de regressão linear simples relacionando as estimativas da antracnose do bastão do imperador entre avaliadores sem o auxílio da escala diagramática e com auxílio da escala diagramática na primeira e segunda avaliação.

Intervalo de coeficiente de determinação ( $R^2$ )	Frequência (%)*		
	Sem escala	Com Escala	
		1 <sup>a</sup> . Avaliação	2 <sup>a</sup> . Avaliação
0,60 – 0,69	4,4	0,0	0,0
0,70 – 0,79	37,8	0,0	0,0
0,80 – 0,89	51,1	24,4	8,8
0,90 – 1,00	6,7	75,6	91,2

\*Calculada considerando o número de ocorrências do intervalo em relação ao total de 45 combinações possíveis entre os 10 avaliadores em cada avaliação da severidade da doença.

## **CAPITULO IV**

---

**REAÇÃO DE CULTIVARES, EFEITO DA  
ÉPOCA E DA QUANTIDADE DE  
PONTOS DE INOCULAÇÃO E IDADE  
DA ESPATA NO DESENVOLVIMENTO  
DA ANTRACNOSE EM ANTÚRIO**

## Reação de cultivares, efeito da quantidade de pontos e da época de inoculação e idade da espata no desenvolvimento da antracnose em antúrio

Beatriz M. Barguil<sup>1</sup>, Sônia Maria A. Oliveira<sup>2</sup>, Rildo Sartori B. Coêlho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluna de doutorado em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bolsista CNPq. E-mail: biabar@yahoo.com.br.; <sup>2</sup>Departamento de Agronomia – Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil. E-mail: smao@ufrpe.br; E-mail: rsartori@oi.com.br

Autor para correspondência: Sônia Maria A. Oliveira

Aceito para publicação em:

---

### RESUMO

Barguil, B. M.; Oliveira, S. M. A.; Coelho, R. S. B. Reação de cultivares, efeito da quantidade de pontos e da época de inoculação e idade da espata no desenvolvimento da antracnose em antúrio. **Summa Phytopathologica.**

O antúrio é uma planta semi-herbácea que apresenta folhas verdes vistosas, com formato cordiforme e inflorescências com espatas de diversas cores de acordo com a cultivar, sendo tanto a folhagem quanto as inflorescências de grande importância ornamental. A antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* é uma das principais doenças nessa cultura, estando presente em vários plantios comerciais brasileiros. Os sintomas manifestam-se sobre as folhas na forma de lesões pardas que aparecem mais freqüentemente nas bordas ou junto às nervuras. Nas espatas ocorrem pequenas manchas escuras, que evoluem para uma podridão encharcada, prejudicando a comercialização das hastes. Essa pesquisa objetivou verificar o efeito da idade da espata, da quantidade de pontos e época de inoculação no desenvolvimento dos sintomas da antracnose e a reação de cultivares de antúrio quando inoculadas com *C.*

*gloeosporioides*. A idade da espata influenciou o desenvolvimento da lesão para os dois isolados avaliados. Em espatas no estágio 1, sem a completa abertura, as lesões formadas foram significativamente maiores do que aquelas formadas em espatas nos estádios 4 e 5. As maiores lesões causadas pelos isolados do patógeno foram formadas com cinco pontos de ferimento nas duas cultivares de antúrio (cvs. Tropical e Cananéia). A época de inoculação não influenciou no tamanho da lesão, nas duas cultivares avaliadas. Os menores períodos de incubação (PI) para o isolado Cg 1 foram observados nas cultivares Astral, Tropical, Netuno e Farao, diferindo significativamente das demais cultivares. Nas cultivares Sonate, Astral, Tropical, Netuno e Farao foram observados os menores PI para o isolado Cg 2. A menor AACPD resultante da inoculação com Cg 1 foi observada em Sonate, que diferiu das demais cultivares. As menores AACPD ocasionadas pelo isolado Cg 2 foram observadas em Farao e Midori, que diferiram das cultivares Cananéia, Sonate, Tropical e Netuno.

Palavras-chaves adicionais: *Anthurium andraeanum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, Flores tropicais.

---

#### ABSTRACT

Barguil, B. M; Oliveira, S. M. A.; Coelho, R. S. B. Cultivars reaction and influence of inoculation points and time, and espathe age on anthracnose development on anthurium.

#### **Summa Phytopathologica.**

Anthurium is a semi-herbaceous plant with green leaves, of heart form, inflorescence with espathe of different colors changing with the cultivar. Anthracnose can be found on almost crop areas. Espathe age, influence of inoculation points, moment of inoculation and susceptibility of cultivars to *Colletotrichum gloeosporioides* were evaluated. The lesion size development was influenced by espathe age. On espathe on estage 1, the lesions were significantly different from espathes on 4 and 5 estages. Bigger lesions were achieved with five points per wound on the two cultivars (cvs. Tropical and Cananéia) and isolates tested.

Inoculation time not influenced the lesion size on cultivars tested. The incubation period (IP) was variable with cultivars and isolate. The smaller IP for Cg 1 were observed on Astral, Tropical, Netuno and Farao. On Sonate, Astral, Tropical, Netuno e Farao cultivars were observed the smaller IP for Cg 2. The smallest AUDPC were observed on Sonate for Cg 1 and on Farao and Midori for Cg 2.

*Additional keywords:* *Anthurium andraeanum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, Tropical flowers.

---

O antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) é uma planta semi-herbácea, ereta, perene, com altura variando de 0,30 a 1,0 m, sendo originária da Colômbia e Venezuela. Apresenta folhas verdes vistosas, com formato cordiforme e inflorescências com espatas de cores variadas de acordo com a cultivar, sendo tanto a folhagem quanto as inflorescências de grande importância ornamental (7; 13).

As cultivares comerciais de antúrio devem reunir diversas características como: qualidade da folha; haste floral ereta, firme e medindo 60 cm; espata com brilho, aberta, de textura firme e coloração uniforme; espádice ligeiramente arqueada e medindo cerca de dois terços do comprimento da espata; boa produção de hastes; durabilidade pós-colheita e também resistência às doenças (13; 14). O melhoramento de cultivares visando resistência a doenças é uma característica desejável para a manutenção da produção das flores na presença de uma doença (4) e diversas medidas de controle devem ser tomadas para prolongar a durabilidade dessa resistência (1), como remoção de restos culturais, irrigação por gotejamento e nutrição equilibrada (15).

No Brasil, as doenças relatadas em antúrio são a podridão das raízes (*Phytophthora* sp. ou *Pythium* sp.), a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.), a podridão negra (*Phytophthora citrophthora* (R. E. & E. H. Smith) Leonian) afetando a parte aérea da planta, *Pestalotiopsis guepinii* ((Desm.) Stey) causando manchas necróticas em folhas e

flores, as bacterioses causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ((McCulloch & Pirone) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings) ou *Pseudomonas* sp. e a virose causada pelo *Dasheen mosaic virus* (DsMV) (2; 3; 9; 13). Dentre essas, destaca-se a antracnose por estar presente na maioria dos plantios comerciais brasileiros. Nas folhas, os sintomas de antracnose compreendem lesões pardas que aparecem mais freqüentemente nos bordos foliares ou junto às nervuras, podendo coalescer e afetar grande parte do limbo foliar (9; 13). A incidência da doença aumenta quando as condições ambientais de umidade relativa e temperatura são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (9). Nas espatas ocorrem pequenas manchas escuras, que evoluem para uma podridão encharcada (15).

Pouco se conhece sobre o comportamento de cultivares de antúrio quando infectadas com seus principais patógenos. No Havaí, oito cultivares de antúrio foram avaliadas quanto à suscetibilidade a *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. Foi observado que folhas inoculadas dessas cultivares podem apresentar suscetibilidade ou resistência, com áreas infectadas variando de 84 a 8%, respectivamente (4). No Brasil, a cultivar Astral (IAC 154) é medianamente resistente a essa bacteriose (13) e a cultivar Ômega (IAC 14021) é suscetível à antracnose, sobretudo em locais de elevada precipitação pluviométrica (Tombolato, comunicação pessoal). Entretanto, o comportamento das demais cultivares, nacionais ou importadas, utilizadas pelos produtores é desconhecido. Com relação a antracnose, embora ocorra em diversas espécies ornamentais tropicais produtoras de flores e/ou de folhagens, ainda são escassos os trabalhos de comportamento de cultivares, estando disponível apenas um realizado em bastão do imperador (6). Desconhece-se também a reação da espata quando inoculada com *C. gloeosporioides* em diferentes estádios de desenvolvimento.

Nesse trabalho, os objetivos foram verificar o efeito da idade da espata na suscetibilidade à antracnose; observar a influência da quantidade de ferimentos e época de inoculação no desenvolvimento dos sintomas e, verificar o comportamento de cultivares de antúrio quando inoculadas com *C. gloeosporioides*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e manutenção dos isolados

Isolados de *C. gloeosporioides* foram obtidos de lesões em espatas de antúrios cultivados em municípios produtores dos estados de Ceará (Cg 1) e Pernambuco (Cg 2 e Cg 3). Fragmentos de tecido provenientes de lesões presentes nas espatas foram desinfestados em álcool 70% por 30 segundos e em hipoclorito de sódio (1,5%) por um minuto. Em seguida, foram lavados duas vezes em água destilada esterilizada (ADE) e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após a obtenção de cultura pura, os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA e mantidos a 6 °C. Antes dos ensaios os isolados foram repicados para meio BDA onde permaneceram por sete dias. Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Pós-colheita da UFRPE, a uma temperatura de  $25 \pm 2$  °C com alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro).

### Idade da espata sobre o desenvolvimento da antracnose

Nesse primeiro experimento avaliou-se três fases de desenvolvimento de hastes florais de antúrio, sendo utilizada a cultivar Tropical (espata vermelha e espádice branca) da empresa holandesa Antura®. As hastes florais nos estádios 1 (espata fechada), 4 (menos de 2/3 da espádice madura) e 5 (mais de 2/3 da espádice madura), definidos por Souza et al. (11), foram cortadas e enviadas ao laboratório. As hastes foram delicadamente lavadas com água e sabão e, posteriormente, postas a secar a temperatura de laboratório ( $25 \pm 2$  °C) e a base das hastes imersas em baldes plásticos com água, onde permaneceram durante todo o experimento. Em seguida, as espatas foram feridas com estilete e inoculadas com um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura BDA contendo estruturas do patógeno. Após inoculadas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo algodão umedecido em ADE, constituindo uma câmara úmida durante 48 horas. Os isolados utilizados foram o Cg 2 e o Cg 3 provenientes de antúrios cultivados nos municípios de Aldeia – PE e Paulista – PE, respectivamente.

### Efeito da quantidade de pontos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*

A influência da quantidade de pontos de inoculação na severidade da antracnose em espata de antúrio foi avaliada nesse experimento, sendo utilizadas as cultivares Tropical e Cananéia (espata branca e espádice rosa – IAC 16772) proveniente do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). As hastes florais foram cortadas no ponto de colheita e enviadas ao laboratório conforme o experimento anterior. Em seguida, as espatas receberam um, três e cinco furos realizados com auxílio de um estilete, em seguida inoculadas com um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA mais as estruturas de *C. gloeosporioides*. As hastes inoculadas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo algodão umedecido em ADE, constituindo uma câmara úmida durante 48 horas. Os isolados utilizados foram o Cg 1 e Cg 2 provenientes dos municípios de Guaramiranga-CE e Aldeia-PE, respectivamente.

#### **Efeito da época de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em antúrio**

A influência do momento de inoculação na severidade da lesão em espata de antúrio foi avaliada, sendo utilizadas as cultivares Tropical e Cananéia. As hastes florais foram cortadas, lavadas e acondicionadas conforme anteriormente descrito. Em seguida, as espatas foram feridas com estilete e inoculadas com os mesmos isolados do experimento anterior em épocas diferentes: imediatamente ou duas horas após o ferimento, com disco de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA e estruturas do patógeno. As hastes inoculadas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo algodão umedecido em ADE, constituindo uma câmara úmida durante 48 horas.

#### **Reação de cultivares de antúrio à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides***

Foram avaliadas inflorescências de oito cultivares de antúrio, sendo utilizadas as hastes florais de Tropical, Midori (espata verde e espádice branco e verde), Laguna (espata verde e espádice rosa e verde), Faraó (espata verde e vermelho e espádice) e Sonate (espata rosa e espádice rosa) da empresa holandesa Antura® e Netuno (espata vermelho escuro e espádice branco e amarelo – IAC 154), Astral (IAC 154 espata vermelho claro e espádice branco e amarelo) e Cananéia provenientes do IAC. As hastes florais foram cortadas no

estádio de espata aberta e até 50% da espádice madura. No laboratório, as hastes foram lavadas com água e sabão, postas a secar a temperatura ambiente e colocadas em baldes plásticos com água de torneira, onde permaneceram durante o experimento. Em seguida, as espatas foram feridas e inoculadas conforme descrito no item anterior. As hastes inoculadas permaneceram em câmara úmida por 48 horas. Os isolados utilizados foram o Cg 1 e Cg 2.

### **Análise experimental**

A unidade experimental em todos os experimentos consistiu de uma haste floral, sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado e 12 repetições. A severidade dos sintomas foi quantificada através da média da medida do diâmetro da lesão no comprimento e na largura, avaliada em centímetros. A avaliação foi realizada aos um, três e cinco dias após a inoculação no experimento de idade da espata. Nos demais experimentos as espatas foram avaliadas com um, três, cinco e sete dias após a inoculação, sendo que o último experimento (reação de cultivares) também foi avaliado aos nove dias. Com as médias dos dados obtidos foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em todos os ensaios conduzidos. No experimento com cultivares também foi avaliado o período de incubação (PI), que compreende o período entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias separadas pelo teste de Duncan ( $P < 5\%$ ). Também foi realizada a análise de correlação de Pearson entre os dados de período de incubação, severidade no último dia de avaliação e a AACPD com os dados do último experimento.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Idade da espata sobre o desenvolvimento da antracnose**

A idade da espata influenciou no desenvolvimento da lesão para os dois isolados de *C. gloeosporioides* avaliados. Em hastes com as espatas fechadas, as lesões formadas foram significativamente maiores do que aquelas formadas em espatas nos estádios 4 e 5. O tamanho

das lesões em espatas no estágio 4 não diferiu daquele formado em espatas no estágio 5, para os dois isolados utilizados (Figura 1).

Resultados similares foram observados em plantas de pimentão (*Capsicum annum* L.) em diferentes idades de desenvolvimento quando inoculadas com *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes através de pulverização da parte aérea. Plantas no estágio de duas folhas morreram quando inoculadas com o patógeno, enquanto que no estágio de oito folhas foi verificado apenas a formação de lesões pequenas e circulares (5). Em pistilos de flores de macieira (*Malus domestica* Borkh) com um, dois ou três dias de idade inoculadas com *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow foi observado que a população da bactéria dobrou sete dias após a inoculação. Entretanto, em pistilos de flores com cinco, seis, sete e oito dias a população da bactéria ficou próxima a zero após o mesmo período (12). Esse comportamento de suscetibilidade em antúrio condiz com um dos três padrões citados por Agrios (1) de que algumas plantas são suscetíveis no período inicial de desenvolvimento, tornando-se resistentes no final.

#### **Efeito da quantidade de pontos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides***

A quantidade de pontos de ferimento para a inoculação influenciou diretamente no desenvolvimento das lesões provocadas por *C. gloeosporioides* em espatas de antúrio (Figura 2). As maiores lesões foram formadas com cinco pontos de ferimento nas duas cultivares e com os dois isolados utilizados. Essas lesões diferiram significativamente daquelas formadas com três e com um ponto de ferimento antes da inoculação.

A elevação da severidade da doença, com o maior número de pontos de inoculação, pode ser explicada pela quantidade de aberturas disponíveis para a penetração, potencializando a ação do patógeno através de infecções simultâneas em uma pequena área. Em frutos de meloeiro inoculados com *Myrothecium roridum* Tode ex Fries, a severidade observada acompanhou a quantidade de pontos de ferimento, sendo maior em locais com dez pontos, independente do isolado e da cultivar avaliados (10).

### **Época de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em antúrio**

A época de inoculação não diferiu nas duas cultivares avaliadas, ou seja, a severidade observada com a inoculação após o ferimento ou somente duas horas depois foi a mesma. Também não houve diferença quando se comparou as cultivares Cananéia e Tropical no momento zero de inoculação e após duas horas do ferimento. Provavelmente, esse fato se deve ao aumento da síntese de etileno por ocasião dos ferimentos, que propicia a senescência do tecido que pode permanecer suscetível por um maior espaço de tempo.

### **Resposta de cultivares de antúrio a infecção de *Colletotrichum gloeosporioides***

As cultivares de antúrio avaliadas comportaram-se de modo diferente quanto ao período de incubação (PI), a severidade (SEV) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Tabela 1). Os menores PI para o isolado Cg 1 foram observados nas cultivares Astral, Tropical, Netuno e Farao, diferindo significativamente nas demais cultivares. Esse período variou de 12 a 44 horas nas cultivares Tropical e Sonate, respectivamente. Nas cultivares Sonate, Astral, Tropical, Netuno e Farao foram observados os menores PI para o isolado Cg 2. Esses períodos variaram de 13 horas, nas cultivares Tropical e Farao, a 66 horas na cultivar Cananéia.

Os isolados se comportaram de maneira diferente quando inoculados em cultivares de antúrio (Tabela 1). O menor valor de severidade ocasionado pelo isolado Cg 1 foi observado na cultivar Sonate, que diferiu significativamente das demais cultivares. Para o isolado Cg 2 os menores valores de severidade foram observados em Farao e Midori.

A severidade das lesões também foi avaliada pelo cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Tabela 1). A menor AACPD resultante da inoculação com Cg1 foi observada em Sonate, que diferiu das demais cultivares. As menores AACPD ocasionadas pelo isolado Cg 2 foram observadas em Laguna e Midori, que diferiram das cultivares Cananéia, Astral, Sonate, Tropical e Netuno.

Os valores obtidos por análise de correlação entre o período de incubação e a severidade das lesões, bem como entre o período de incubação e a AACPD foram negativos para o isolado Cg 1, indicando que quanto menor o período de incubação, maiores serão os valores de severidade e AACPD (Tabela 2). Resultado similar foi observado para o isolado Cg 2 onde a correlação entre o período de incubação e a AACPD também foi negativa. As análises entre a severidade e a AACPD foram positivas para os dois isolados avaliados.

As principais cultivares de bastão do imperador (*Etilingera elatior* (Jack) Smith) comportaram-se de maneira diferente quando inoculadas com *C. gloeosporioides*. Foi observado que as lesões formadas na cultivar vermelha (Red Torch) apresentavam o dobro do tamanho daquelas formadas na cultivar porcelana (Porcelain), sendo que nesta o patógeno foi incapaz de se desenvolver quando inoculado sem ferimento (6). Cultivares da planta ornamental cartamus (*Carthamus tinctorius* L.) também responderam de forma diferente quando naturalmente infectadas com *Colletotrichum acutatum* Simmonds no campo. A incidência da doença variou de 27,6 a 97,1% e a severidade de 2,0 a 3,5 nas sete cultivares avaliadas (8).

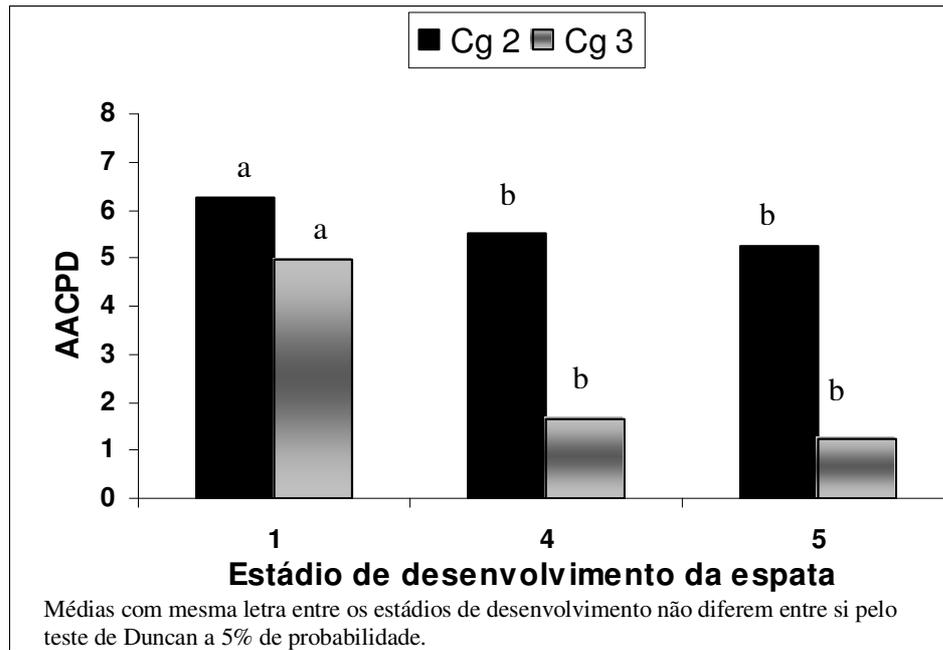
Dessa forma, a idade da espata, a quantidade de pontos de ferimento para a inoculação, a cultivar e o isolado utilizado influenciaram no desenvolvimento da antracnose em espatas de antúrio, porém o mesmo não ocorreu para a época de inoculação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

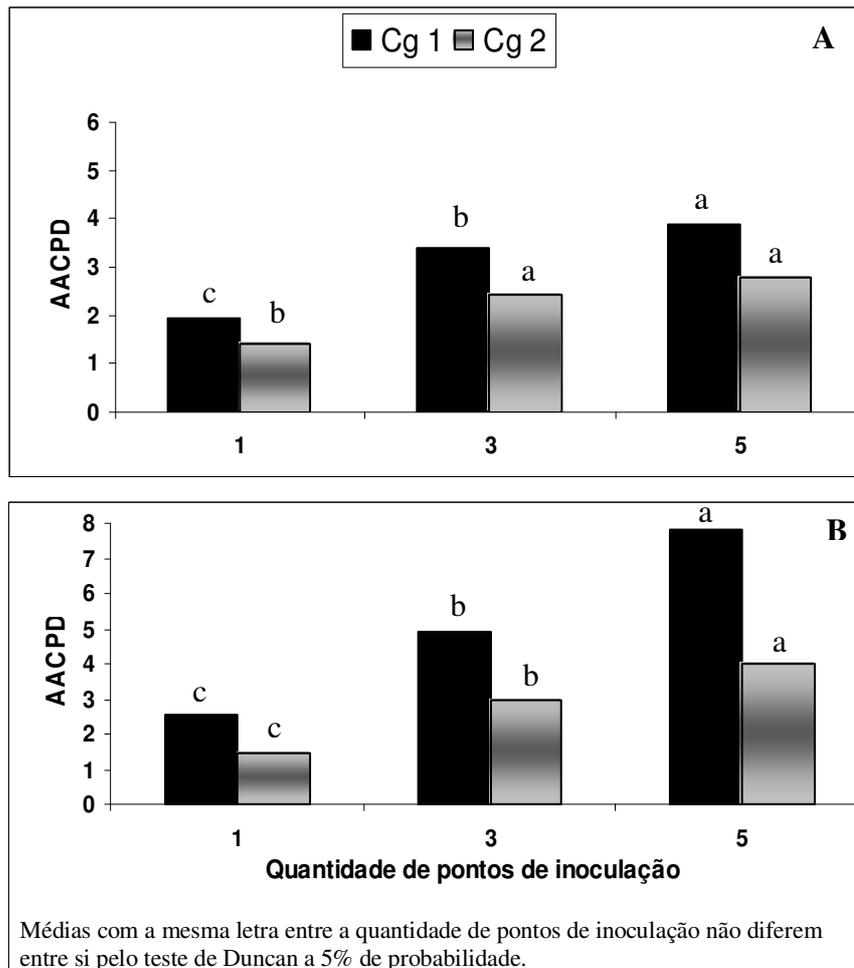
1. Agrios, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 2005. 922p.
2. Amorim, E. P. R. Ocorrência de *Pestalotiopsis guepinii* (Sin. *Pestalotia guepinii*) em antúrio (*Anthurium andraeanum*) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, p. 363-364, 1999.
3. Freitas-Astúa, J.; Caldari Jr., P.; Giória, R. Doenças das plantas ornamentais. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. **Manual de**

- fitopatologia** – doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 523-539.
4. Fukui, H.; Alvarez, A. M.; Fukui, R. Differential susceptibility of anthurium cultivars to bacterial blight in foliar and systemic infection phases. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 800-806, 1998.
  5. Hong, J. K.; Hwang, B. K. Influence of inoculum density, wetness, duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 1079-1083, 1998.
  6. Lins, S. R. O.; Coelho, R. S. B. Antracnose em inflorescências de bastão do imperador (*Etilingera elatior*): ocorrência e métodos de inoculação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, p. 355-358, 2003.
  7. Lorenzi, H.; Souza, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1120p.
  8. Park, S. D.; Park, K. S.; Kim, K. J.; Kim, J. C.; Yoon, J. T.; Khan, Z. Effect of sowing time on development of safflower anthracnose disease and degree of resistance in various cultivars. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p.48-51, 2005.
  9. Pitta, G. P. B.; Cardoso, E. J. B. N.; Cardoso, R. M. G. **Doenças das plantas ornamentais**. São Paulo: Instituto Brasileiro do Livro Científico, 1990. 174p.
  10. Senhor, R. F.; **Epidemiologia da podridão-de-cratera em frutos de meloeiro**. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
  11. Souza, J. W. O.; Pinheiro, P. G. L.; Loges, V.; Castro, A. C. R.; Lira Júnior, M. A. Desenvolvimento de inflorescências de *Heliconia*, *Anthurium andraeanum* e *Renanthera coccinea* em Pernambuco. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 2003, Lavras - MG. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 2003. p. 394-394.

12. Thomson, S. V.; Gouk, S. C. Influence of age of apple flowers on growth of *Erwinia amylovora* and biological control agents. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 502-509, 2003.
13. Tombolato, A. F.; Furlani, P. R.; Castro, C. E. F.; Mathes, L. A. F.; Tagliacozzo, G. M. D.; Saes, L.A.; Rivas, E. B.; Coutinho, L. N.; Bergman, E. C.; Imenes, S. L.; Costa, A. M. M.; Leme, J. M. Antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.). In: Tombolato, A. F. **Cultivo comercial de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2004. p. 61-94.
14. Van Herk, M.; Van Koppen, M.; Smeding, S.; Van Der Elzen, C. J.; Van Rosmalen, N.; Van Dijk, J.; Lont, A.; Van Spingelen, J. **Cultivation Guide Anthurium** - Global know-how for growers around the globe. Bleiswijk: Anthura B. V., 1998. 140 p.
15. Warumby, J. F.; Coelho, R. S. B.; Lins, S. R. O. **Principais doenças e pragas em flores tropicais no Estado de Pernambuco**. Recife: Sebrae, 2004. 98 p.



**Figura 1** – Influência da idade de desenvolvimento da espata na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da antracnose na cultivar Tropical de antúrio, inoculada com dois isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.



**Figura 2** – Influência da quantidade de pontos de inoculação na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da antracnose em espadas das cultivares Cananéia (A) e Tropical (B) de antúrio, inoculadas com dois isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

**TABELA 1** – Período de incubação - PI (horas), severidade (cm) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da antracnose em espatas de cultivares de antúrio inoculadas com dois isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

	Isolado Cg 1			Isolado Cg 2		
	PI (horas)	Severidade (cm)	AACPD	PI (horas)	Severidade (cm)	AACPD
<b>Cananéia</b>	38,00 <sup>1</sup> a	0,55 ab	3,46 bc	66,00 a	0,83 ab	4,45 ab
<b>Sonate</b>	44,00 a	0,30 c	1,76 d	26,00 c	0,89 a	5,14 a
<b>Astral</b>	14,00 b	0,58 ab	4,42 ab	17,00 de	0,69 abc	5,14 a
<b>Tropical</b>	12,00 b	0,73 a	5,08 a	13,00 e	0,73 ab	5,05 a
<b>Netuno</b>	22,00 b	0,74 a	4,33 ab	22,00 cd	0,85 ab	5,01 a
<b>Farao</b>	19,00 b	0,49 b	3,71 bc	13,00 e	0,50 c	3,65 bc
<b>Laguna</b>	37,00 a	0,56 ab	3,18 c	51,00 b	0,66 bc	3,23 cd
<b>Midori</b>	36,00 a	0,59 ab	3,71 bc	59,00 a	0,50 c	2,65 d
cv (%)	34,09	33,45	33,31	28,74	32,31	25,88

<sup>1</sup>Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

**Tabela 2** – Coeficiente de correlação entre o período de incubação (PI), a severidade da lesão (SEV) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) dos isolados Cg 1 e Cg 2 de *Colletotrichum gloeosporioides* em cultivares de antúrio

	Cg 1		Cg 2		
	SEV (cm)	AACPD	SEV (cm)	AACPD	
PI (horas)	<b>-0,46*</b>	<b>-0,63*</b>	PI (horas)	<b>-0,08<sup>NS</sup></b>	<b>-0,44*</b>
SEV (cm)	-	<b>0,88*</b>	SEV (cm)	-	<b>0,85*</b>
AACPD	-	-	AACPD	-	-

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t; <sup>NS</sup> Não significativo.

---

## **Conclusões Gerais**

## CONCLUSÕES GERAIS

- ⊗ A caracterização morfológica e a utilização de oligonucleotídeos específicos foram eficientes para classificar a maioria dos isolados coletados como *Colletotrichum gloeosporioides* e dois como *Colletotrichum* sp.;
- ⊗ Os isolados não apresentaram especificidade a nenhum dos hospedeiros utilizados;
- ⊗ A escala diagramática elaborada mostrou-se eficiente para avaliação da antracnose em bastão do imperador;
- ⊗ A idade da espata e a quantidade de pontos de inoculação influenciaram no desenvolvimento da antracnose em antúrio;
- ⊗ As cultivares de antúrio reagiram do modo diferente quando inoculadas com os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.