

ISSN 1980-041X

Outubro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Florestas
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 32

Etiologia e Controle da Antracnose da Pupunheira para Palmito

Álvaro Figueredo dos Santos

Dauri José Tessmann

Rudimar Mafacioli

João Batista Vida

Embrapa Florestas
Colombo, PR
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, Km 111, CP 319

83411 000 - Colombo, PR - Brasil

Fone/Fax: (41) 3675 5600

www.cnpf.embrapa.br

sac@cnpf.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Luiz Roberto Graça

Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida

Membros: Álvaro Figueredo dos Santos, Edilson Batista de

Oliveira, Honorino Roque Rodigheri, Ivar Wendling, Maria

Augusta Doetzer Rosot, Patrícia Póvoa de Mattos, Sandra Bos

Mikich, Sérgio Ahrens

Supervisão editorial: Luiz Roberto Graça

Revisão de texto: Mauro Marcelo Berté

Normalização bibliográfica: responsabilidade do autor

Fotos da capa: Álvaro Figueredo dos Santos, João Batista Vida

Editoração eletrônica: Mauro Marcelo Berté

1ª edição

1ª impressão (2007): sob demanda

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Florestas

Etiologia e controle da antracnose da pupunheira para palmito [recurso eletrônico] / Álvaro Figueredo dos Santos ... [et al.]. Dados eletrônicos - Colombo : Embrapa Florestas, 2007.

1 CD-ROM. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Florestas, ISSN 1980-041X ; 32)

ISSN 1676-9449 (impresso)

1. *Melanconiaceae*. 2. *Arecaceae*. 3. *Bactris gasipaes* - Fungo. 4. Doença de planta. I. Santos, Álvaro Figueredo dos. II. Tessmann, Dauri José. III. Mafacioli, Rudimar. IV. Vida, João Batista. V. Série.

CDD 579.55 (21. ed.)

© Embrapa 2007

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	18
Conclusões	34
Referências	35

Etiologia e controle da antracnose da pupunheira para palmito

Álvaro Figueredo dos Santos¹

Dauri José Tessmann²

Rudimar Mafacioli³

João Batista Vida⁴

Resumo

A antracnose é a principal doença da pupunheira (*Bactris gasipaes*) no Centro Sul do Brasil, causando necrose em folhas de mudas, em viveiros, e em plantios com até 8 meses. Considerando-se a escassez de informações sobre este patossistema procurou-se, neste trabalho, caracterizar a variabilidade fenotípica de isolados de *Colletotrichum* sp. associados com antracnose procedentes de diferentes regiões produtoras de pupunha do Brasil, com base em caracteres fenotípicos, além de desenvolver estratégias de controle da antracnose (químico e biológico). Os isolados foram obtidos de folhas da pupunheira com sintomas típicos de antracnose procedentes de várias regiões do Brasil. Os 17 isolados de *Colletotrichum* sp. de pupunheira avaliados neste estudo foram enquadrados como *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*). Apenas um isolado desenvolveu a fase perfeita, *G. cingulata*. Os isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram a maior taxa de crescimento micelial a 30°C, enquanto que a esporulação foi menos influenciada pela temperatura. Todos os isolados foram patogênicos à pupunheira, observando-se diferenças significativas de agressividade entre os isolados. O método de folha destacada mostrou-se adequado para testes de patogenicidade ou de agressividade. A escala de notas desenvolvida mostrou-se adequada para avaliação de agressividade de isolados. Verificou-se que isolados de bactérias inibiram o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, no entanto, nos testes *in vivo* os resultados foram inconsistentes. Os fungicidas tiofanato metílico e a mistura de tiofanato metílico + clorotalonil foram eficientes no controle da antracnose em plantas jovens.

Palavras-chave: *Bactris gasipaes*, Arecaceae

Referência Processo: 520234/02-2 (RE) – CNPq (Relatório Final)

¹Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. E-mail: alvaro@cnpf.embrapa.br

²Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor da Universidade Estadual de Maringá. E-mail: djtessmann@uem.br

³Engenheiro Agrônomo, Doutor

⁴Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor da Universidade Estadual de Maringá. E-mail:

Etiology and Control of Antracnose on Peach Palm

Álvaro Figueredo dos Santos¹

Dauri José Tessmann²

Rudimar Mafacioli³

João Batista Vida⁴

Abstract

Antracnosis is the main disease of peach palm (*Bactris gasipaes*) in the Central and Southern regions of Brazil, causing leaf damages on transplants, in nurseries, and on young plants up to eight months after transplanting to the field. Considering the lack of information about this pathosystem, this work studied the phenotypic variability among *Colletotrichum* isolates associated with anthracnosis on palm heart from several regions of Brazil. All the 17 isolates belonged to the species *C. gloeosporioides*, and only one isolate developed the perfect stage, named *Glomerella cingulata*. All isolates presented the highest mycelial growth rate at 30 °C, but sporulation was less affected by temperature. All isolates were pathogenic to palm heart and significant differences were observed on aggressiveness of isolates. The method of inoculation using detached leaves was shown adequate for pathogenicity test and a disease rating scale was developed for assessing aggressiveness of the isolates. It was observed that isolates of some bacteria inhibited mycelial growth of *C. gloeosporioides* 'in vitro'; however, the results of using these bacteria for controlling the disease in field were not consistent. The fungicides methyl thiophanate and methyl thiophanate + chlorothalonil were efficient for controlling this disease in young plants.

Keywords: *Bactris gasipaes*, Arecaceae.

Introdução

O cultivo de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) para palmito constitui-se em uma importante alternativa agroecológica para diversificação e fonte de renda para sistemas de produção em várias regiões brasileiras. A pupunha poderá exercer um papel preponderante na solução do problema de oferta de matéria-prima no Brasil (KULCHETSCHI et al., 2001), considerando: sua precocidade na produção de palmito (primeiro corte com 1,5 a 2 anos após o plantio, contra 4 a 8 anos para o açaí e a juçara, respectivamente), sendo que, após o primeiro corte, pode ser cortada a cada 12 a 14 meses (no caso do açaí, os cortes têm intervalos de dois anos e no da juçara a planta é destruída); uma produção comercial programável de 150 g a 300 g de palmito por planta (na Costa Rica têm-se alcançado produções de 250 a 300 kg ha/ano, incluindo os resíduos apical e basal), conferindo à pupunha rendimentos superiores em pelo menos oito vezes ao do açaí; excepcionais vantagens industriais devido à ausência de enzimas oxidantes, possuindo oxidação (mudança de cor) praticamente nula e farto perfilhamento; que lhe confere a condição de planta perene, inclusive para a produção de palmito, condição extremamente vantajosa sobre o ponto de vista econômico e ecológico.

Devido à alta produtividade da pupunha por unidade de área, o aumento na oferta de palmito cultivado representa um decréscimo na pressão ainda existente sobre as populações remanescentes de juçara, na Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Estes fatos contribuirão não apenas para a preservação das populações remanescentes da juçara, mas, principalmente, para promover o fortalecimento e o crescimento da economia de municípios que apresentem potencial para a produção de palmito. No Brasil, encontra-se distribuída principalmente nos estados do Acre, Espírito Santo, Bahia, Amazonas, São Paulo e Pará (BOVI, 1998; BOVI, 2000). No Estado do Paraná, a cultura da pupunha está em expansão nas regiões do Litoral, Alto Ribeira, Noroeste e Norte, constituindo-se numa importante alternativa agroecológica para a diversificação, além de fonte de renda para sistemas de produção dessas regiões (SANTOS et al., 2001a).

Nas regiões produtoras do Brasil e da Costa Rica, a pupunheira é atacada por várias doenças parasitárias. No Brasil, a antracnose, cujo agente causal tem sido descrito como sendo o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (*Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. Schrenk), é uma das principais doenças que ocorrem na cultura, causando danos principalmente em mudas e em plantios com até 8 meses de idade (SANTOS et al., 2001a; SANTOS et al., 2001b).

A antracnose afeta as folhas das plantas jovens, caracterizando-se por manchas arredondadas e deprimidas, de coloração marrom, com anéis concêntricos onde aparecem as estruturas do fungo de cor escura. Em plantas com um a três anos, causa queimaduras e secamento das folhas novas e lesões no ápice do tronco. Nessas plantas, o ataque é mais severo nos folíolos da base da segunda ou da terceira folha e nos bordos da bainha. As lesões da antracnose servem como porta de entrada para patógenos secundários, agravando com isso o quadro sintomatológico da doença (SANTOS et al., 2001b).

Embora *C. gloeosporioides* seja citado como agente causal da antracnose da pupunheira, não há relatos na literatura de estudos mais detalhados de identificação e de caracterização da variabilidade fenotípica e genotípica de espécie(s) de *Colletotrichum* patogênica(s) à pupunheira (SANTOS et al., 2001a). Estudos realizados em outras plantas hospedeiras mostraram que mais de uma espécie de *Colletotrichum* pode estar associada com as antracnoses (BUDDIE et al., 1999; MARTIN; GARCIA-FIGUERES, 1999; FREEMAN et al., 2000). O fungo *C. gloeosporioides* possui uma distribuição ampla, sendo inclusive considerado por alguns taxonomistas como um grupo de espécies (SUTTON, 1980; CANNON; BRIDGE, 2000). Portanto, eventualmente, mais de uma espécie de *Colletotrichum* pode estar associada à antracnose da pupunheira. Tradicionalmente, as espécies de *Colletotrichum* têm sido diferenciadas através de caracteres morfológicos, fisiológicos e especificidade a hospedeiros (SUTTON, 1980; LOPEZ, 2001). Mais recentemente, as modernas técnicas de biologia molecular também têm sido úteis para a diferenciação e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas com doenças de várias culturas (CANNON;

BRIDGE, 2000; LOPEZ, 2001).

Considerando que a identificação do agente causal é o primeiro passo para estudos de medidas de controle de uma fitomoléstia, tornam-se necessários estudos de identificação e caracterização da extensão da variabilidade de *Colletotrichum*. Pretende-se comparar uma população de isolados do agente causal da antracnose da pupunheira obtidos em diferentes regiões produtoras do Brasil (Acre, Rondônia, Espírito Santo, São Paulo e Paraná) com base em caracteres fenotípicos e em marcadores moleculares. Ressalta-se que a utilização de tal abordagem para estudos taxonômicos e de diversidade genética em *Colletotrichum* está bem estabelecida (SREENIVASAPRASAD et al., 1993; SREENIVASAPRASAD et al., 1994; ALAHAKOON et al., 1994; SHERRIFF et al., 1994; BALARDIN et al., 1999; MARTINEZ-CULEBRAS et al., 2000; MUNIZ et al., 1988; CHAKRABORTY et al. 1998). Estas informações serão úteis em outros estudos sobre etiologia e epidemiologia da doença, visando ao desenvolvimento de medidas apropriadas de controle.

Apesar de existir extensa pesquisa sobre a antracnose em diversos hospedeiros (LOPEZ, 2001), praticamente nada se conhece sobre a epidemiologia de *Colletotrichum* em pupunheira. Esse conhecimento é indispensável para que o manejo da doença passe a basear-se em sólidas informações epidemiológicas (CAMPBELL; MADDEN, 1990; JONES, 1998). As áreas produtoras brasileiras, novas e tradicionais, (SANTOS et al., 2001a), têm sido infectadas com antracnose e a abrangência parece crescer a cada ano. Existe uma demanda, por parte dos produtores, em pesquisa para o controle da doença e a análise do comportamento da epidemia.

A importância crescente da pupunheira no Brasil como uma alternativa para o aproveitamento de áreas abandonadas pela agricultura (SANTOS et al., 2001b), a ocorrência generalizada da antracnose, a escassez de estudos epidemiológicos e de métodos de controle para o patossistema *C. gloeosporioides* – pupunheira, evidenciaram a necessidade de definir estratégias de manejo capazes de controlar a antracnose, eficiente e

economicamente. No Brasil, não existe produto biológico ou químico registrado para o controle da antracnose e nem resultados de pesquisa sobre a variabilidade do patógeno ou a resistência do hospedeiro. O estudo da variabilidade do patógeno e de técnicas alternativas de controle (genético, cultural, biológico e químico) da doença visando ao seu manejo integrado preencherá importante lacuna na oferta de conhecimentos/tecnologias para o sistema de produção da pupunheira e dará suporte à expansão de palmito cultivado, de forma sustentável.

Este trabalho teve como objetivos: 1) caracterizar a variabilidade fenotípica de isolados de *Colletotrichum* sp. procedentes de diferentes regiões produtoras de pupunha do Brasil; e 2) desenvolver as bases para um sistema de manejo integrado da antracnose.

Material e Métodos

Parte I. Caracterização morfo-fisiológica de *Colletotrichum* sp.

Exp. 1. Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* sp. e suas características culturais.

Os isolados foram obtidos de folhas da pupunheira com sintomas típicos de antracnose procedentes de várias regiões do Brasil (Tabela 1). Para a obtenção de culturas puras, foi utilizado o método indireto, no qual fragmentos de tecido foliar doente foram transferidos para placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar, suplementado com ampicilina (250 ppm) (BDA-S). As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo 12 h luz/12 h escuro, por cinco dias. Após, foi retirado um disco de micélio da extremidade da colônia característica de *Colletotrichum* e transferido para tubo de ensaio contendo meio BDA-S e incubados nas mesmas condições anteriores. Para todos os isolados obteve-se culturas puras a partir de pontas de hifas. Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA-S, armazenados à 10 °C ou em óleo mineral.

Obtiveram-se 17 isolados de *Colletotrichum* sp. oriundos de pupunheira dos

estados do Paraná, Espírito Santo, Acre e Rondônia (Tabela 1).

Para a análise do crescimento micelial, esporulação e coloração das colônias, os isolados foram crescidos em meio de cultura de aveia-ágar (60 g de farinha de aveia Quaker, 12 g de ágar, 1.000 mL de água destilada esterilizada), com incubação a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo 12 h luz/12 h escuro, por cinco dias.

A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição diária das colônias em dois sentidos diametralmente opostos, obtendo-se uma média para cada repetição. O delineamento estatístico do ensaio foi inteiramente casualizado, com três repetições, e o teste de Tukey, a 5 % de probabilidade, foi empregado para comparação das médias. A análise dos dados foi processada com programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG).

As características culturais foram avaliadas com base no aspecto geral das colônias (contorno e cor do micélio) e na esporulação. A esporulação dos isolados foi descrita com base na distribuição das massas de conídios na placa de Petri, como abundante (+ +), escassa (+) e ausência (-).

Tabela 1. Isolados de *Colletotrichum* sp. utilizados no estudo.

Isolados	Origem geográfica	Coletor	Ano de coleta
CGA-PR	Cidade Gaúcha (PR)	Rudimar Mafacioli	2001
CAM-SP1	Registro (SP)	Álvaro F. Santos	2002
CAM-SP2	Registro (SP)	Álvaro F. Santos	2002
STO-PR1	São Tomé (PR)	Rudimar Mafacioli	2002
STO-PR2	São Tomé (PR)	Rudimar Mafacioli	2002
STO-PR3	São Tomé (PR)	Rudimar Mafacioli	2002
PGA-PR1	Paranaguá (PR)	Rudimar Mafacioli	2002
PGA-PR2	Paranaguá (PR)	Rudimar Mafacioli	2002
PGA-PR3	Paranaguá (PR)	Rudimar Mafacioli	2002
PGA-PR4	Paranaguá (PR)	Rudimar Mafacioli	2002
LIN-ES1	Linhares (ES)	**	2002
LIN-ES2	Linhares (ES)	**	2002
RBR-AC1	Rio Branco (AC)	***	2002
RBR-AC2	Rio Branco (AC)	***	2002
PVE-RO1	Porto Velho (RO)	****	2002
PVE-RO2	Porto Velho (RO)	****	2002
PVE-RO3	Porto Velho (RO)	****	2002

* Material vegetal (folhas) enviado pelo IAC (SP); **Material vegetal (folhas) enviado pelo INCAPER (ES); ***Material vegetal (folhas) enviado pela EMBRAPA (AC); **** Material vegetal (folhas) enviado pela EMBRAPA (RO).

Exp. 2. Características culturais, crescimento micelial e esporulação de *Colletotrichum* sp. em diferentes meios de cultura

Utilizaram-se 17 isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de folhas da pupunheira com sintomas típicos de antracnose procedentes dos estados do Paraná, São Paulo, Espírito Santo, Acre e Rondônia. Pelo método indireto, fragmentos de tecido da região de transição da lesão com o tecido sadio da folha foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e ampicilina a 250 ppm.

Para a multiplicação do inoculo, as placas foram mantidas na temperatura de 25 ± 2 °C, sob alternância de luminosidade (12 horas) durante cinco dias. Após este período, um disco do micélio de 7 mm de diâmetro foi retirado da extremidade da colônia e transferido para placas de Petri contendo os meios de cultura testados: batata-dextrose-ágar (extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 17 g ágar, e água destilada e esterilizada, quantidade suficiente para 1.000 mL), suco V8-ágar (10 % de suco V8, 0,02 % CaCO_3 , 2 % de Select ágar, e água destilada e esterilizada, q.s.p. 1.000 ml), aveia-ágar (60 g de farinha de aveia Quaker, 12 g de ágar e água destilada e esterilizada, q.s.p. 1.000 mL) e cenoura-ágar (extrato de 20 g de cenoura triturada, 17 g de ágar e água destilada e esterilizada, quantidade suficiente para 1.000 mL). As condições do experimento foram temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e incubação por sete dias.

Quanto às características culturais, foi considerado o aspecto geral das colônias, baseando-se na superfície de contorno cor do micélio, sendo que notas foram atribuídas à esporulação: esporulação abundante (+ +), esporulação escassa (+) e esporulação ausente (-).

A avaliação do crescimento micelial consistiu na medição diária das colônias em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de um régua milimetrada, obtendo-se a média de cada repetição.

Determinou-se o número de conídios adicionando-se 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de Petri e removendo-se os esporos com alça de Drigalky. A suspensão foi filtrada em duas camadas de gaze e a concentração dos conídios, determinada através da câmara de Neubauer, repetindo-se a operação três vezes por isolado/amostra, obtendo-se a média da suspensão.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5 % de significância, para comparação das médias, utilizando o programa estatístico SAEG (Sistema de análises

estatísticas e genéticas, Viçosa, UFV, 1997).

Exp. 3. Identificação de *Colletotricum* sp.

Folhas de pupunheira com sintomas de antracnose procedentes de diversas regiões do País foram analisadas no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá. O material foi incubado em câmara úmida por 24 horas e cortes longitudinais foram feitos em lesões jovens, utilizando-se estilete cirúrgico. Lâminas foram montadas para a observação de acérvulos em microscópio ótico. A análise da morfologia de conídios e apressórios dos isolados foi feita com culturas puras. Com o auxílio de uma agulha esterilizada, uma porção da massa de conídios foi coletada e depositada em uma lâmina com lactofenol e azul de algodão. Após, realizou-se observações em microscópio óptico com aumento de 100 X. Foram realizadas determinações do comprimento e da largura de 150 conídios para cada isolado, observando-se a morfologia dos mesmos.

Para a indução de formação de apressórios, uma lâmina foi colocada no interior de uma placa de Petri e, em seguida, vertida uma suspensão de 10 mL de conídios na concentração de 1×10^5 conídios/mL. Este material foi colocado em uma incubadora por 24 horas, a 25 °C, no escuro. Após, as lâminas foram retiradas e secadas com papel absorvente (papel toalha), adicionando-se uma gota de lactofenol com azul de algodão. As observações foram realizadas em microscópio óptico com aumento de 100 X. Observou-se a morfologia e determinou-se o comprimento e a largura de 60 apressórios. A identificação do patógeno foi feita com base em Sutton (1980).

Exp. 4. Caracterização sintomatológica da antracnose e avaliação da agressividade dos isolados de *Colletotrichum* sp.

Os sintomas foram avaliados a campo, de acordo com o desenvolvimento das lesões nas folhas de pupunheira. Utilizando-se estilete cirúrgico, foram efetuados em folhas com lesões jovens cortes longitudinais para identificar os corpos de frutificação, característicos do gênero *Colletotrichum* e denominados de acérvulos.

A doença foi reproduzida pela inoculação de folhas destacadas de mudas de pupunheira acondicionadas em placas de Petri contendo duas camadas de papel filtro esterilizado. A inoculação foi realizada em ferimentos feitos nas folhas com um conjunto de seis agulhas espaçadas de 5 mm e afixadas em rolha de cortiça, previamente flambadas. Em seguida, um disco de papel filtro de 10 mm de diâmetro, previamente embebido em uma suspensão conidial na concentração de 10⁵ conídios/mL, foi depositado sobre cada ponto da folha com ferimentos. A testemunha consistiu em depositar um disco de papel filtro embebido em água destilada sobre folhas com ferimentos, conforme descrito anteriormente.

As placas foram mantidas fechadas em incubadora tipo BOD à temperatura de 22 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro por 10 dias. O delineamento do ensaio foi completo casualizado, com três repetições.

Foram inoculados os 17 isolados de *Colletotrichum* sp. (Tabela 1). A avaliação da agressividade foi feita através de uma escala de notas atribuídas às lesões, onde: 0 = ausência de necrosamento, 1 = necrosamento sem coalescimento, 2 = coalescimento de até 50 % das lesões, 3 = coalescimento maior do que 50 % das lesões, 4 = coalescimento de 100 % das lesões e 5 = expansão da área necrosada em relação ao ferimento.

Parte II. Desenvolvimento de estratégias de controle integrado da doença

Exp. 1. Isolamento e seleção de bactérias antagônicas à *C. gloeosporioides*

Isolamento de bactérias. Os isolados de bactérias usados nos testes foram obtidos através do método descrito por Bettiol (1995), adaptado por Kupper e Fernandes (2002). As folhas de pupunha coletadas de plantios comerciais foram submetidas a lavagem em água de torneira e, posteriormente, retiraram-se discos de 10 mm de diâmetro. Estes discos foram imersos em água destilada esterilizada (1 g de discos de folhas/100

mL de água). Em seguida, foram colocados em agitador mecânico por uma hora. O sobrenadante foi distribuído em tubos de ensaio (10 mL/tubo) e submetidos a banho-maria a 80 °C durante 10 minutos. Alíquotas foram retiradas dos tubos de ensaio para a obtenção de diluições em série de 10, 10-1, 10-2 e 10-3, e transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sendo espalhadas com o auxílio da alça de Drigalski (0,2mL/placa de Petri). Após, foram incubados a 25 °C por 10 dias. Com o aparecimento das bactérias, procedeu-se a repicagem para o meio de BDA.

Pareamento *in vitro*. As bactérias isoladas das folhas de pupunheira foram pareadas com isolados de *C. gloeosporioides*. O pareamento foi realizado em placas de Petri contendo BDA, colocando-se dois discos de meio BDA contendo micélio do fungo, eqüidistantes a 3,3 cm. Entre os dois discos foi repicada a colônia da bactéria a ser testada. Após este procedimento, as placas de Petri foram incubadas por seis dias a 25 °C. Para o tratamento testemunha, foram pareados dois discos de *C. gloeosporioides* distanciados de 3,3 cm.

A avaliação consistiu na determinação da distância entre o crescimento fúngico e a colônia bacteriana. Este teste foi realizado duas vezes.

Produção de antibióticos *in vitro*. Utilizou-se batata-dextrose (BD), colocando-se 200 mL de meio em frascos erlenmeyers. Em seguida foram adicionados cinco discos de 4 mm de diâmetro de BDA contendo colônias de bactérias. Após este procedimento, os frascos foram fechados e mantidos na ausência de luz a 24 °C, por 15 dias e sem agitação.

Após o período de incubação, foram adicionados 3 g de ágar em cada frasco, sendo, em seguida, autoclavados por 20 minutos. O caldo resultante foi vertido em placas de Petri. Nestas, foram repicados discos de meio BDA contendo micélio de *C. gloeosporioides*. Em seguida, as placas foram incubadas por 18 dias no ambiente.

A avaliação consistiu na medida do diâmetro do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, em dois sentidos.

Teste de controle em mudas. Neste teste, utilizaram-se quatro mudas de pupunha, as quais foram colocadas em duas caixas de plástico (31 cm x 51 cm) sobrepostas, envolvidas em jornal umedecido, formando uma câmara úmida. Foram feitos ferimentos, com seis agulhas, nas folhas de duas plantas, numa área de 6 mm de diâmetro; enquanto que as demais plantas foram deixadas intactas. Em seguida, procedeu-se a aplicação de uma suspensão bacteriana do isolado de bactéria AP49 na concentração $1,54 \times 10^8$ células bacterianas/mL, nas faces abaxial e adaxial das folhas.

Após 24 horas, procedeu-se a inoculação com discos de papel de filtro previamente imersos em uma suspensão de $5,437 \times 10^6$ conídios/mL de *C. gloeosporioides*. Inocularam-se também folhas de pupunha com discos de BDA (6 mm de diâmetro) contendo micélio do mesmo fungo. Para o controle, as mudas receberam apenas disco de BDA, discos de papel filtro embebido em água destilada esterilizada ou apenas disco de BDA contendo o micélio do fungo.

A avaliação foi realizada a partir dos 15 dias da inoculação do fungo, através de uma escala de notas, conforme segue: 0 = ausência de necrosamento, 1 = necrosamento sem coalescimento, 2 = coalescimento de até 50 % das lesões, 3 = coalescimento maior que 50 % das lesões, 4 = coalescimento de 100% das lesões e 5 = expansão da área necrosada em relação ao ferimento.

Exp. 2. Monitoramento da antracnose em áreas experimentais e plantios comerciais de pupunheira

Nos anos de 2003 e 2004, realizou-se o monitoramento da antracnose em experimentos de adubação e de irrigação e em viveiros e plantios comerciais localizados nas regiões do litoral, do norte e do noroeste do Paraná.

Exp. 3. Avaliação de fungicidas para o controle da antracnose

O experimento foi conduzido em Cidade Gaúcha, PR, com os seguintes tratamentos: Calda viçosa (Viça-café) - 1,25 g.p.c./100 L; Azoxystrobin

(Amistar WG) – 16 g.p.c./100 L; Tebuconazole (Folicur 200 CE) – 100 mL p.c./100 L; Benomil (Benlate 500) – 100 g.p.c./100 L; Chlorothalonil (Daconil BR) – 200 g.p.c./100 L; Tiofanato méfílico + Chlorothalonil (Cerconil SC) – 250 mL p.c./100 L; e testemunha sem fungicida. As dosagens foram estabelecidas de acordo com recomendações do fabricante para doenças causadas por *C. gloeosporioides* em outras culturas.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições e parcelas com área útil de 12 plantas, no espaçamento 2 m x 1 m. Os tratamentos foram aplicados com intervalo de 15-20 dias, no período de quatro meses após o plantio das mudas. Os fungicidas foram aplicados com pulverizador costal com pressão de 40 PSI. As médias dos índices de doença (% folhas com sintomas) foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Resultados e Discussão

Parte I. Caracterização fenotípica de *Colletotrichum* sp.

Exp. 1. Obtenção dos isolados de *Colletotrichum* sp. e suas características culturais

Foram observados quatro tipos de colônias, com a coloração variando de cinza-escuro a cinza-claro, branco e branco-acinzentado (Tabela 2). Os isolados apresentaram variações entre si, na taxa de crescimento micelial, sendo que o isolado PGA-PR1, aos sete dias, já atingia a margem da placa, enquanto que os isolados STO-PR1 e PVE-RO3 foram os de crescimento mais lento (Tabela 2). Todos os isolados produziram conídios no meio de cultura aveia-ágar, e a maioria deles produziu conídios em abundância (Tabela 2). Outros trabalhos também verificaram a ocorrência de variabilidade na coloração de colônias, na esporulação e no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em cacauzeiro (FEITOSA et al., 1987), mangueira (MENEZES; HANLIN, 1988a), cajueiro (MENEZES; HANLIN, 1988b) e morangueiro (TANAKA et al., 1998). Veras et al. (1997) também verificaram que o meio de aveia foi o melhor substrato para a produção de conídios de *C. graminicola*.

Tabela 2. Características culturais de isolados de *Colletotrichum* sp. da pupunheira em meio aveia ágar, à temperatura de 25 ± 2 °C, após sete dias de incubação.

Designação	Coloração da colônia	Crescimento micelial (mm.dia ⁻¹) ¹		Esporulação ²
CGA-PR	Branca acinzentada	8,3	ab	**
REG-SP1	Cinza claro	7,7	bc	**
REG-SP2	Cinza escuro	7,7	bc	**
STO-PR1	Branca acinzentada	6,8	bc	**
STO-PR2	Branca acinzentada	7,8	abc	**
STO-PR3	Branca	8,7	ab	**
PGA-PR1	Branca	10,0	a	**
PGA-PR2	Branca acinzentada	9,0	ab	**
PGA-PR3	Branca	8,6	ab	**
PGA-PR4	Branca acinzentada	8,8	ab	**
LIN-ES1	Branca	7,2	bc	**
LIN-ES2	Branca acinzentada	8,7	ab	**
RBR-AC1	Branca	7,0	bc	**
RBR-AC2	Branca acinzentada	8,4	ab	**
PVE-RO1	Branca acinzentada	7,6	bc	**
PVE-RO2	Branca	8,4	ab	*
PVE-RO3	Branca	6,1	c	*

¹ Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade;

² Esporulação abundante (***) e escassa (*).

Exp. 2. Características culturais, crescimento micelial e esporulação de *Colletotrichum* sp. em diferentes meios de cultura

Os efeitos dos meios de cultura apresentaram quatro tipos culturais distintos de colônias, todas com aspecto cotonoso, micélio aéreo, cinza escuro, cinza claro, branco acinzentado e cinza claro (Tabela 3), sendo que apenas um isolado (REG-SP1) apresentou variações nestes padrões devido ao meio de cultura. O aspecto cultural dos isolados variou em relação à cor do micélio, podendo ser atribuída ao genótipo de cada isolado, cuja

expressão fenotípica está associada ao ambiente de cultivo (BAILEY et al., 1992). Variações na coloração das colônias de *C. gloeosporioides* também são relatadas na literatura, com variações na cor da colônia de cinza-clara, cinza-escura, cinza-olivácea e salmão (TANAKA; PASSOS, 1998), também variações na cor das colônias como: cinza-escuro, cinza-claro e cinza-esverdeado (FEITOSA et al., 1987) e cor das colônias variando de cinza-clara, cinza-escura e esbranquiçada (MENEZES; HANLIN, 1988b).

Tabela 3. Características culturais de isolados de *Colletotrichum goeosporioides* da pupunheira em diferentes meios de cultura, na temperatura de 25 ± 2 °C, após sete dias de incubação.

Isolados	Meios de cultura							
	V8-água		Batata-dextrose- água		Aveia-água		Cenoura-água	
	Cor ¹	Esporulação ²	Cor	Esporulação	Cor	Esporulação	Cor	Esporulaçã
CGA-PR	BA	++	BA	++	BA	++	BA	++
REG-SP1	CC	++	CE	++	CC	++	CC	++
REG-SP2	BA	++	BA	++	BA	++	BA	++
STO-PR1	BA	-	BA	-	BA	+	BA	-
STO-PR2	BA	+	BA	+	BA	+	BA	+
STO-PR3	B	+	B	+	B	+	B	+
PGA-PR1	B	-	B	-	B	+	B	+
PGA-PR2	BA	+	BA	-	BA	+	BA	+
PGA-PR3	B	+	B	+	B	+	B	+
PGA-PR4	BA	+	BA	+	BA	+	BA	+
LIN-ES1	B	+	B	-	B	+	B	+
LIN-ES2	BA	+	BA	-	BA	+	BA	+
RBR-AC1	B	-	B	-	B	+	B	+
RBR-AC2	BA	-	BA	-	BA	+	BA	-
PVE-RO1	BA	+	BA	-	BA	+	BA	+
PVE-RO2	B	-	B	-	B	+	B	+
PVE-RO3	B	-	B	-	B	+	B	-

¹ Coloração da colônia: BA (branco acinzentado), CE (cinza escuro), CC (cinza claro), B (branco); ² Esporulação: abundante (++), escassa (+), ausente (-).

Os isolados STO-PR2, PGA-PR1, PGA-PR2, LIN-ES1, RBR-AC1, RBR-AC2 e PVE-RO1 foram os que obtiveram diferenças significativas mais acentuadas quanto ao efeito do meio de cultura para o crescimento micelial (Tabela 4).

Da mesma forma, observaram-se diferenças significativas na capacidade de produção de conídios dos isolados, sendo que os meios de cultura interferiram nesta característica. Os isolados PGA-PR1, RBR-AC1, RBR-AC2, PVE-RO2 e PVE-RO3 não produziram conídios em meio V8-ágar. Os isolados STO-PR1, PGA-PR1, PGA-PR2, LIN-ES1, LIN-ES2, RBR-AC1, RBR-AC2, PVE-RO1, PVE-RO2 e PVE-RO3 não produziram conídios em BDA. Os isolados STO-PR1, RBR-AC2 e PVE-RO3 não produziram conídios em meio de cenoura-ágar. Entretanto, no meio de cultura aveia-ágar todos os isolados produziram conídios (Tabela 5). Griffin (1984) e Castro e Coelho (2000) asseguram que o crescimento micelial é um processo complexo no qual muitos componentes influenciam o desenvolvimento e a diferenciação celular. Dentre esses componentes destaca-se o substrato do qual o fungo retira seus nutrientes, a depender de suas exigências nutricionais, para os processos metabólicos. Em laboratório, os meios de cultura exercem esta função. A esporulação é um processo de diferenciação mais específico, no qual estão envolvidas as células reprodutivas afetadas por modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

De acordo com a composição do meio, os isolados se diferenciaram quanto à taxa de crescimento micelial e de esporulação, sendo que o meio que favoreceu a melhor taxa de crescimento micelial para um determinado isolado não necessariamente foi o melhor meio para a produção de conídios. Segundo Tuite (1969) e Dhingra e Sinclair (1995), um determinado meio que favoreça a taxa de crescimento micelial para um patógeno não necessariamente será o melhor meio de cultura para a produção de conídios.

Portanto, esta interação significativa entre meio e isolado é comum em estudos de nutrição de fungos, onde a composição do meio de cultura determina a quantidade e a qualidade do crescimento micelial e da esporulação (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). A concentração mínima de nutrientes que permite o crescimento micelial é, muitas vezes, insuficiente para produção de esporos, no entanto, alguns meios naturais são mais favoráveis que outros para a esporulação de fungos (VERAS et al., 1997).

Tabela 4. Taxa de crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira em diferentes meios de cultura, após sete dias de incubação.

Isolados	Meios de cultura			
	V8 ágar	Batata-dextrose-ágar	Aveia-ágar	Cenoura-ágar
CGA-PR	8,52 ¹ Abcde	8,59 Aabcd	8,33 Aab	8,76 Aabc
REG-SP1	7,81 Ae	8,31 Abcd	7,74 Abc	7,69 Abc
REG-SP2	8,45 Abcde	8,07 Abcd	7,73 Abc	7,81 Abc
STO-PR1	8,21 Acde	6,81 Ad	6,81 Abc	7,18 Ac
STO-PR2	10,69 Aab	10,78 Aa	7,86 Babc	9,31 Ababc
STO-PR3	10,35 Aabc	9,64 Aab	8,71 Aab	9,88 Aab
PGA-PR1	9,23 Abcde	7,26 Bcd	10,07 Aa	10,59 Aa
PGA-PR2	8,07 Bde	9,50 Ababc	9,05 Abab	9,76 Aab
PGA-PR3	10,21 Aabcd	8,81 Aabcd	8,69 Aab	8,86 Aabc
PGA-PR4	10,14 Aabcd	9,23 Aabc	8,81 Aab	9,93 Aab
LIN-ES1	9,52 Abcde	8,21 ABbcd	7,26 Bbc	8,81 Ababc
LIN-ES2	9,61 Abcde	8,78 Aabcd	8,76 Aab	9,59 Aab
RBR-AC1	10,33 Aabc	8,69 Ababcd	7,02 Bbc	9,93 Aab
RBR-AC2	10,61 Aab	8,86 Babcd	8,45 Bab	9,64 ABab
PVE-RO1	10,78 Aa	8,78 Bcabcd	7,62 Cbc	9,29 Ababc
PVE-RO2	10,45 Aabc	9,12 Ababc	8,40 Bab	9,19 Ababc
PVE-RO3	8,78 Abcde	6,85 BCd	6,07 Cc	8,23 Abbc
CV = 9,01 %				

¹ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste Tukey (P = 0,05).

Neste trabalho, o meio de cultura aveia-ágar estimulou a esporulação de todos os isolados de *C. gloeosporioides*. Isto também foi relatado por Veras et al. (1997) em que, estudando a variabilidade fisis-morfológica de *C. graminicola* em diferentes

substratos, o meio de aveia se destacou como o melhor substrato para a produção de conídios. É também enfatizado por Dhingra e Sinclair (1995), que recomendam meios mais pobres para estimular a esporulação.

Tabela 5. Produção de conídios de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira em diferentes meios de cultura, na temperatura de 25 ± 2 °C, após sete dias de incubação.

Isolados	Esporulação ²							
	V8-água		Batata-dextrose-água		Aveia-água		Cenoura-água	
	A	B	A	B	A	B	A	B
CGA-PR	1,32 Aabc ¹	1,64	0,84 Bb	0,22	1,22 ABbcd	1,01	1,05 ABa	0,62
REG-SP1	0,81 Bcd	0,48	1,45 Aa	3,81	1,31 Abc	1,33	0,80 Ba	0,33
REG-SP2	1,65 Aa	2,23	1,45 Aba	0,17	1,22 Babcd	1,89	0,79 Ca	0,12
STO-PR1	0,70 Ad	0,00	0,70 Ab	0,00	0,83 Acd	0,21	0,70 Aa	0,00
STO-PR2	0,98 Abcd	0,47	0,81 Ab	0,09	0,79 Ad	0,13	0,91 Aa	0,33
STO-PR3	1,10 Bbcd	0,72	1,05 Bab	1,52	1,72 Aab	2,77	1,06 Ba	0,61
PGA-PR1	0,70 Ad	0,00	0,70 Ab	0,00	0,72 Ad	0,16	0,73 Aa	0,03
PGA-PR2	0,90 Abcd	0,33	0,70 Bb	0,00	1,13 Acd	0,81	0,88 ABa	0,28
PGA-PR3	0,86 Acd	0,25	1,05 Aab	0,64	1,20 Acd	0,95	0,82 Aa	0,19
PGA-PR4	0,99 Abcd	0,50	0,89 Ab	0,34	0,97 Acd	0,45	0,93 Aa	0,37
LIN-ES1	1,47 Aab	1,67	0,70 Cb	0,00	1,17 ABcd	0,92	0,86 Bca	0,28
LIN-ES2	0,85 Acd	0,24	0,70 Ab	0,00	0,85 Acd	0,22	0,76 Aa	0,08
RBR-AC1	0,70 Bd	0,00	0,70 Bb	0,00	1,93 Aa	3,24	0,86 Ba	0,27
RBR-AC2	0,70 Ad	0,00	0,70 Ab	0,00	0,87 Acd	0,26	0,70 Aa	0,00
PVE-RO1	0,75 Ad	0,07	0,70 Ab	0,00	1,00 Acd	0,53	0,87 Aa	0,26
PVE-RO2	0,70 Ad	0,00	0,70 Ab	0,00	0,77 Ad	0,10	0,78 Aa	0,10
PVE-RO3	0,70 Ad	0,00	0,70 Ab	0,00	0,74 Ad	0,04	0,70 Aa	0,00

CV = 19,33 %

¹ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P = 0,05).

² A- Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$, onde x é a esporulação de *C.gloeosporioides* B - Dados originais, produção de conídios $\times 10^5$

Exp. 3. Identificação de *C. gloeosporioides*

Os conídios, quando observados ao microscópio ótico, apresentaram-se hialinos e unicelulares. A forma dos conídios variou de bastonete, elíptico a claviforme, com ápice obtuso e a base arredondada, algumas vezes truncada. O tamanho dos conídios variou de 10,0 – (17,7) – 24,2 μm para comprimento e 2,5 – (3,7) – 5,0 μm para largura, observando-se variações entre os isolados (Tabela 6).

Os apressórios dos isolados apresentaram o formato clavado, irregular e oval; cor castanha com poro germinativo localizado geralmente no centro da célula, apresentando variações entre isolados comparados (Tabela 6). As médias obtidas ficaram em 5,0 – (10,0) – 13,7 μm para comprimento e 3,7 – (8,0) – 11,2 μm para largura.

A morfologia dos conídios e de apressórios variou entre os isolados, porém ficou nos limites estabelecidos por Sutton (1992; 1980) para *C.*

gloeosporioides. As características desta espécie, de acordo este autor, são: colônias com coloração variável de branco acinzentado para cinza escuro, micélio aéreo uniforme, associados com conidiomata acervular, reverso da cultura com coloração variando entre branca para cinza escuro, especialmente em culturas mais velhas. Setas presentes ou ausentes. Escleródio ausente. Apressórios com formato clavado, ovóide ou irregular, de cor marrom-escuro (castanho), medindo 6-20 mm x 4-12 mm. Conídios retos (lisos), cilíndricos, ápice obtuso, e algumas vezes base truncada, medindo 12-17 (9-24) mm x 3.5-6 mm. Os conídios são formados em massa com aspecto mucilaginoso com a coloração salmão.

Os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio de cultura BDA-S, incubados na temperatura de 25 ± 2 °C por 30 dias, para verificar a presença de estrutura sexual. Verificou-se a ocorrência da fase teleomórfica apenas para o isolado LIN-ES2, oriundo de Linhares, ES. Este isolado produziu peritécio, asca e ascósporo (Figura 3), típicos da fase meiospórica *Glomerella cingulata* (Hanlin, 1990). Para os demais isolados não foi verificada a ocorrência da fase meiospórica no período de incubação das culturas de aproximadamente 40 dias. Não foi possível determinar

porque isso ocorreu com apenas um isolado. Possivelmente, foi porque uma mesma espécie de *Glomerella* pode conter linhagens homotáticas e heterotáticas (VAILLANCOURT et al., 2000).

Este trabalho analisou a variabilidade em algumas características morfológicas e fisiológicas em isolados identificados como *C. gloeosporioides* "sensu" Sutton (1992; 1980), obtidos de folhas de pupunheira com sintomas de antracnose e procedentes de diversas regiões do País. Verificou-se que apenas uma espécie causa a doença em folhas de pupunheira no centro de origem da planta (Acre e Rondônia) e em áreas onde a planta foi introduzida mais recentemente (Espírito Santo, São Paulo e Paraná). Este trabalho contribuiu para o melhor entendimento da etiologia da antracnose em folhas da pupunheira e as informações obtidas poderão ser empregadas na diagnose da doença e para o desenvolvimento de medidas de controle.

Os 17 isolados de *Colletotrichum* sp. de pupunheira avaliados neste estudo foram enquadrados como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc. (*Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. Schrenk) (MAFACIOLI, 2002). Apenas um isolado desenvolveu a fase perfeita, *G. cingulata*.

Tabela 6. Dimensões de conídios e apressórios, morfologia de apressórios e fase meiospórica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira, em meio aveia ágar, a temperatura de 25 ± 2 °C, após sete dias de incubação.

Isolado	Conídios (μm)		Apressórios (μm)		Morfologia dos apressórios (%) ⁴			Fase teleomórfica ⁵
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	OV	IR	CL	
CGA-PR	16,77 ¹ \pm 5,65 ² (11,2 – 22,5) ³	3,1 \pm 0,85 (2,5 – 3,7)	9,03 ¹ \pm 2,9 ² (6,2 – 12,0) ³	7,27 \pm 1,85 (5,4 – 9,1)	57	23	20	-
REG-SP1	16,6 \pm 4,81 (12,0 – 21,6)	3,5 \pm 1,32 (3,0 – 5,0)	10,13 \pm 3,33 (7,1 – 13,7)	7,5 \pm 2,1 (5,4 – 9,6)	49	19	32	-
REG-SP2	18,17 \pm 5,65 (13,0 – 24,2)	4,0 \pm 0,89 (3,3 – 5,0)	9,53 \pm 2,95 (6,6 – 12,5)	7,7 \pm 2,3 (5,4 – 10)	48	40	12	-
STO-PR1	14,97 \pm 3,75 (11,2 – 18,7)	3,1 \pm 0,85 (2,5 – 3,7)	9,33 \pm 3,15 (6,2 – 12,5)	7,9 \pm 3,12 (5,0 – 11,2)	45	45	10	-
STO-PR2	13,7 \pm 3,10 (10,6 – 16,8)	3,1 \pm 0,6 (2,5 – 3,7)	9,13 \pm 3,17 (6,2 – 12,5)	7,9 \pm 3,12 (5,0 – 11,2)	70	05	25	-
STO-PR3	14,23 \pm 3,76 (10,6 – 18,1)	3,5 \pm 0,92 (2,5 – 4,3)	8,37 \pm 1,91 (6,6 – 10,4)	6,8 \pm 2,3 (4,5 – 9,1)	56	16	28	-
PGA-PR1	13,27 \pm 3,3 (10,0 – 16,6)	3,1 \pm 0,85 (2,5 – 3,7)	8,1 \pm 2,3 (5,8 – 10,4)	6,47 \pm 1,5 (5,0 – 8,0)	58	27	15	-
PGA-PR2	14,0 \pm 2,8 (11,2 – 16,8)	3,7 (3,7)	9,53 \pm 2,95 (6,6 – 12,5)	7,43 \pm 2,95 (4,5 – 10,4)	57	17	26	-
PGA-PR3	17,73 \pm 4,75 (13,0 – 22,5)	3,1 \pm 0,85 (2,5 – 3,7)	8,93 \pm 3,1 (5,8 – 12,0)	7,43 \pm 2,05 (5,4 – 9,5)	08	50	42	-
PGA-PR4	16,6 \pm 5,01 (11,8 – 21,8)	3,1 \pm 0,6 (2,5 – 3,7)	9,87 \pm 3,2 (6,6 – 13,0)	7,7 \pm 2,7 (5,0 – 10,4)	18	57	25	-
LIN-ES1	14,67 \pm 3,15 (11,6 – 17,9)	3,4 \pm 0,42 (3,1 – 3,7)	9,2 \pm 2,71 (6,6 – 12,0)	7,9 \pm 1,65 (6,2 – 9,5)	60	23	17	-
LIN-ES2	13,5 \pm 1,9 (11,6 – 15,4)	3,7 (3,7)	7,03 \pm 2,05 (5,0 – 9,1)	6,03 \pm 1,95 (4,1 – 8,0)	48	22	30	+
RBR-AC1	12,23 \pm 2,25 (10 – 14,5)	3,7 (3,7)	6,63 \pm 1,65 (5,0 – 8,3)	6,23 \pm 1,75 (4,5 – 8,0)	57	30	13	-
RBR-AC2	14,23 \pm 2,3 (12,0 – 16,6)	3,7 (3,7)	8,7 \pm 2,1 (6,6 – 10,8)	6,23 \pm 1,25 (5,0 – 7,5)	50	37	13	-
PVE-RO1	12,5 \pm 2,5 (10,0 – 15,0)	3,1 \pm 0,6 (2,5 – 3,7)	7,93 \pm 2,5 (5,4 – 10,4)	6,2 \pm 2,5 (3,7 – 8,7)	65	10	25	-
PVE-RO2	15,0 \pm 3,0 (12,0 – 18,0)	3,7 (3,7)	8,6 \pm 2,51 (6,2 – 11,2)	6,77 \pm 1,91 (5,0 – 8,8)	60	23	17	-
PVE-RO3	13,1 \pm 2,7 (10,4 – 15,8)	3,1 \pm 0,6 (2,5 – 3,7)	8,37 \pm 2,1 (6,2 – 10,4)	4,87 \pm 1,8 (5,0 – 6,6)	65	18	17	-

1 Média de 150 conídios e 60 apressórios; 2 Desvio padrão; 3 Menor e maior tamanho; 4 OV = oval, IR = irregular; CL = clavado; 5 presença (+) e ausência (-).

Exp. 4. Caracterização sintomatológica da antracnose e avaliação da agressividade dos isolados de *Colletotrichum* sp.

A antracnose caracteriza-se por manchas arredondadas e deprimidas, de coloração marrom, com anéis concêntricos de cor escura. As lesões mais velhas apresentam centro claro e, devido à necrose do tecido, pode apresentar perfuração. Nas áreas necrosadas são formados acérvulos do patógeno, nos quais pode ocorrer a formação de setas. Para todos os isolados foi observada a presença de acérvulos típicos de *Colletotrichum* no tecido vegetal lesionado. No teste de patogenicidade, os primeiros sintomas apareceram aos sete dias após a inoculação, com formação de acérvulos e conídios.

Todos os isolados foram patogênicos à pupunheira e observaram-se diferenças significativas na agressividade dos isolados (Tabela 7). Com base no agrupamento proporcionado pelo teste de Tukey ($P=0.05$), os isolados mais agressivos foram CAM-SP2, PGA-PR1, PGA-PR2 e PVE-RO3. Observou-se produção de conídios nas lesões.

O método de folha destacada e a escala de avaliação mostraram-se adequados para os testes de patogenicidade e de agressividade dos isolados.

Tabela 7. Agressividade¹ de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em Folhas de pupunheira 15 dias após a inoculação.

Isolado	Média
CAM-SP2	2,25 a
PGA-PR2	2,16 ab
PGA-PR2	2,08 abc
PVE-RO3	1,91 abcd
CAM-SP1	1,50 abcde
STO-PR3	1,50 abcde
PGA-PR3	1,50 abcde
STO-PR2	1,33 bcde
PVE-RO2	1,33 bcde
PVE-RO2	1,33 bcde
LIN-ES1	1,25 cde
CGA-PR	1,08 cde
PGA-PR4	1,08 de
LIN-ES2	1,08 de
STO-PR1	1,00 e
RBR-AC1	1,00 e
RBR-AC2	1,00 e
CV (%)	44,9

¹ Escala de notas, onde: 0 = sem necrosamento ; 1 = necrosamento sem coalescimento; 2 = coalescimento de até 50 % das lesões; 3 = coalescimento de mais de 50 % das lesões; 4 = coalescimento de 100 % das lesões; 5 = expansão da área necrosada em relação ao ferimento.

² Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Parte II. Desenvolvimento de estratégias de controle integrado da doença

Exp. 1. Isolamento e seleção de bactérias antagonistas à *C. gloeosporioides*

Isolamento de bactérias. Foram obtidos 20 isolados de bactérias (Tabela 8).

Pareamento *in vitro*. Os 20 isolados de bactérias foram avaliados quanto à inibição de crescimento micelial, com três isolados de *C. gloeosporioides* (Tabela 8; Figura 1). Destes, apenas nove isolados de bactérias - AP49, PS4, PS5, SA1/1, SA1/3, SA6/1, SA6/2, G1 e G2 apresentaram um forte halo de inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Faltam trabalhos dessa natureza com *C. gloeosporioides* da pupunheira, no entanto, trabalhos em outros sistemas têm sido realizados mostrando *in vitro* o efeito antagonico de bactérias (BETTIOL, 1995).



Figura 1. Pareamento de bactéria antagonista com isolado de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tabela 8. Halo de inibição (cm) do crescimento micelial de três isolados *Colletotrichum gloeosporioides*, oriundos de Rondônia (RO), São Paulo (SP) e Paraná (PR), quando pareados com isolados de bactéria.

Bactérias/Testemunha	RO	SP	PR
Testemunha	0,0*	0,0	0,0
AP49	2,4	2,5	2,5
PS1	1,9	1,3	1,8
PS2	2,2	2,1	2,5
PS3	2,1	1,5	1,9
PS4	3,0	2,8	3,0
PS5	3,0	2,7	3,0
PI	1,0	1,0	0,9
PII	0,9	1,2	1,1
KIII	1,0	0,6	0,5
KIII2	1,6	1,8	1,5
SA1/1	2,2	2,3	2,6
SA1/2	1,0	0,4	1,1
SA1/3	2,3	2,7	2,5
SA6/1	2,4	2,4	2,2
SA6/2	2,7	2,3	2,5
SA5/1	0,4	0,4	0,5
SA5/2	0,7	0,3	0,9
SA5/3	0,4	0,4	0,4
G1	2,3	2,1	2,3
G2	2,3	2,3	2,3

*Médias de três repetições.

Teste de controle em mudas. Neste teste observaram-se variações entre as bactérias em inibir o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (Tabela 9).

Tabela 9. Crescimento micelial (cm) de cinco isolados (PVE-RO1, LIN-ES2, RBR-AC1, PGA-PR4, PTO-MG) de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio de batata-dextrose-ágar submetido a crescimento prévio de bactérias.

Bactérias / Testemunha	PVE-RO1		LIN-ES2		RBR-AC1		PGA-PR4		PTO-MG	
	1*	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Testemunha	7,0**	8,1	9,0	9,0	7,6	7,0	8,6	7,9	7,7	7,3
G2	1,0	3,0	1,8	**	1,7	2,8	1,6	2,3	1,6	2,0
AP49	0,9	0,9	1,1	1,5	1,8	2,5	1,5	1,6	2,5	2,6
PS5	2,7	4,5	7,1	8,5	4,0	7,5	9,0	9,0	8,5	7,2
G1	1,8	0,0	4,3	2,9	1,6	3,2	1,5	2,2	2,4	2,2
SA6/2	1,1	8,0	8,1	9,0	5,7	6,5	9,0	9,0	6,0	9,0
PS4	3,9	6,8	9,0	9,0	4,5	5,9	9,0	9,0	8,2	7,0
SA1/3	5,9	6,0	9,0	7,8	5,4	4,1	9,0	4,7	6,3	7,5
SA6/1	1,3	6,7	9,0	9,0	2,6	9,0	9,0	9,0	5,9	7,6

*Teste realizado duas vezes; **Médias de três repetições.

Teste *in vivo*. Mudanças. O teste em mudas foi realizado duas vezes (Tabela 10). No entanto, os resultados foram inconsistentes. Outros testes devem ser conduzidos.

Tabela 10. Efeito da aplicação preventiva da bactéria antagonista AP-49 em folhas de pupunheira na severidade da antracnose, aos 15 e 30 dias após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tratamentos		1ª avaliação (15 dias)***	2ª avaliação (30 dias)
Testemunha (BDA)	F- 24 h*	0	0
	F**	0	0
Testemunha (Disco de papel com água)	F- 24 h	0	0
	F	0	0
Isolado de <i>Colletotrichum</i> PGA-PR4 (aplicação prévia de AP-49)	F- 24 h	1	1
	F	1	1
Isolado de <i>Colletotrichum</i> PGA-PR4	F- 24 h	1	1
	F	1	1
Isolado de <i>Colletotrichum</i> STO-PR2 (aplicação prévia de AP-49)	F- 24 h	1	2
	F	1	2
Isolado de <i>Colletotrichum</i> STO-PR2	F- 24 h	1	2
	F	1	1
Isolado de <i>Colletotrichum</i> LIN-ES2 (aplicação prévia de AP-49)	F- 24 h	1	1
	F	1	1
Isolado de <i>Colletotrichum</i> LIN-ES2	F- 24 h	1	1
	F	1	1

*Ferimentos feitos nas folhas 24 horas antes da inoculação (F-24h); **Ferimentos nas folhas na inoculação (F).

***Escala de notas variando de 0 a 5; Médias de oito repetições.

Exp. 2. Monitoramento da antracnose em áreas experimentais e plantios comerciais de pupunheira

O monitoramento de doenças nos experimentos e nos plantios comerciais feitos nas regiões do litoral, do norte e do noroeste do Paraná nos anos de 2003 e 2004 demonstraram que a antracnose é a principal doença foliar da pupunheira. A doença causa danos na fase de muda, em viveiros, e no primeiro ano após o transplante no campo.

A antracnose ocorre com maior frequência e severidade em plantas sob alguma forma de estresse, tais como: mudas em substratos inadequados, plantas sujeitas a ventos constantes, déficit hídrico e adubação inadequada. O frio, o vento e a falta de água causaram uma maior predisposição das plantas a *C. gloeosporioides*.

As observações mostraram que a disponibilidade de água é um dos fatores limitantes da cultura da pupunha nas regiões norte e noroeste do Paraná. A ocorrência de períodos de déficit hídrico na região, principalmente no outono e no inverno, prejudica o estabelecimento da cultura após o transplante das mudas; assim como o crescimento das plantas. Enquanto que nos experimentos irrigados a primeira colheita de palmito ocorre aos 24 meses, nos experimentos sem irrigação a primeira colheita só ocorre aos 36 meses.

O uso de adubação equilibrada, quebra-ventos e irrigação deve ser indicado nestas regiões. Como o patógeno sobrevive em restos culturais, recomenda-se, para os viveiros, a remoção e a queima das folhas doentes.

Exp. 3. Avaliação de fungicidas para o controle da antracnose.

Verificou-se que o tratamento mais eficiente na redução da intensidade da antracnose foi tiofanato metílico, seguido de tiofanato metílico + chlorothalonil. Não houve diferença significativa entre os tratamentos a base dos fungicidas tebuconazole, azoxystrobin, benomil e calda viçosa, entretanto, esses tratamentos diferiram da testemunha não tratada ($P=0.05$).

Conclusões

As principais conclusões foram:

- Os 17 isolados de *Colletotrichum* sp. de pupunheira avaliados neste estudo foram enquadrados como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Apenas um isolado desenvolveu a fase perfeita, *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. Schrenk
- Os isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram colônias de coloração cinza-claro, cinza-escuro, branco-acinzentado e branca.
- Os isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram a maior taxa de crescimento micelial a 30 °C, enquanto que a esporulação foi menos influenciada pela temperatura.

- Os isolados de *C. gloeosporioides* de pupunheira no Brasil apresentaram alta homologia pelos resultados moleculares ou PCR com isolados de *C. gloeosporioides* de diversas espécies de plantas.
- Todos os isolados foram patogênicos à pupunheira, observando-se diferenças significativas de agressividade entre os isolados.
- O método de folha destacada mostrou-se adequado para testes de patogenicidade ou de agressividade.
- A escala de notas desenvolvida mostrou-se adequada para avaliação de agressividade de isolados.
- O monitoramento de doenças nos experimentos e nos plantios comerciais demonstraram que a antracnose é a principal doença foliar da pupunheira no Paraná.
- A antracnose causa danos nas fases de muda e de plantios até oito meses.
- Os isolados de bactérias - AP49, PS4, PS5, SA1/1, SA1/3, SA6/1, SA6/2, G1 e G2 – inibiram o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. No teste de controle da doença em mudas, os resultados foram inconsistentes.
- O uso de adubação equilibrada, quebra-ventos e irrigação são indicados como medidas gerais para o controle da antracnose nos plantios de pupunheira do norte e do noroeste paranaenses. Para os viveiros, recomenda-se a remoção e a queima das folhas doentes;
- Os fungicidas tiofanato metílico e a mistura de tiofanato metílico + chlorothalonil foram eficientes no controle da antracnose.

Referências

- ALAHAKOON, P. W.; BROWN, A. E.; SREENIVASAPRASAD, S. Genetic characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates obtained from mango. **International Journal of Pest Management**, v. 42, n. 2, p. 225-229. 1994.
- BALARDIN, R. S.; SMITH, J. J.; KELLY, J. D. Ribosomal DNA polymorphism in *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycological Research**, v. 103, p. 841-848. 1999.
- BAILEY, J. A.; 'O CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. **Infection Strategies of Colletotrichum Species**. IN: BAILEY, J. A. & JEGER, M. J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. C.A.B. International. 1992, p.88-120.
- BETTIOL, W. **Isolamento seletivo de Bacillus**. In: MELO, I. S. de, SANHUEZA, R. M. V. (Coords.) Métodos de seleção de microorganismos antagonísticos a fitopatógenos. Jaguariúna: Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente – EMBRAPA, 1995, p. 35
- 36. (Manual técnico).

BOVI, M. L. A. **Palmito pupunha: informações básicas para cultivo**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1998. 50p. (IAC. Boletim Técnico, 173).

BOVI, M. L. A. **O Agronegócio Palmito de Pupunha**. In: O Agrônomo, Campinas, v. 52, n. 1, p. 10-12, 2000.

BUDDIE, A. G.; MARTINEZ-CILEBRAS, P.; BRIDGE, P. D.; GARCIA, M. D.; QUEROL, A.; CANNON, P. F.; MONTE, E. Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry. **Mycological Research**, v. 103, p. 385-394, 1999.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York: John Wiley and Sons, 1990. 532 p.

CANNON, P.; BRIDGE, P. D. **Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics**. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.D. *Colletotrichum – Host specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. St. Paul: APS Press. 2000. p.1-20.

CASTRO, N. R.; COELHO, R. S. B. Caracterização fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 4, p. 466-471, 2000.

CHAKRABORTY, S.; MERVYN, R. T.; ELLIS, N. A multivariate analysis of pathogenic variation in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting the tropical pasture, *Stylosanthes scabra*. **Phytopathology**, v. 86, p. 283-289, 1998.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Lewis Publisher, Boca Raton, Florida. 1995.

FEITOSA, M. I.; PIMENTEL, C. P. V.; OLIVEIRA, V. P.; FARIA, B.; CHIBA, S. Estudo comparativo de diversas culturas de *Colletotrichum* isoladas de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) no estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 54, n. 1/4, p. 17-25, 1987.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M., SHABI, E. Molecular analysis of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. **Phytopathology**, v. 90, n. 6, p. 608-614, 2000.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2 ed. New York: Wiley- Liss, 428p. 1984.

JONES, D. G. **The epidemiology of plant diseases**. Dordrecht: Kluwer, 1998. 460 p.

HANLIN, R.T. **Illustrated Genera of Ascomycetes**. St. Paul: APS Press, 1990, 263p.

KULCHETSCHI, L.; CHAIMSOHN, F. P.; GARDINGO, J. R. **Palmito Pupunha (*Bactris gasipaes*)**. Ponta Grossa, UEPG, 2001. 148 p.

KUPPER, K. C. FERNANDES, N. G. Isolamento e seleção de *Bacillus spp.* para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 3, p. 292 – 295, jul./set. 2002.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p. 291-338, 2001.

MAFACIOLI, R. **Caracterização morfo-fisiológica e patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira (*Bactris gasipaes*)**. Maringá, 2002. 79p. Dissertação – Mestrado.

MARTIN, M. P.; GARCIA-FIGUERES, F. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, n. 8, p. 733-741, 1999.

MARTINEZ-CULEBRAS, P. V.; BARRIO, E.; GARCIA, E.; QUEROL, A. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, n. 1, p. 97-101, 2000.

MENEZES, M.; HANLIN, R. T. Estudos comparativos sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. II variações em isolados da antracnose da mangueira, em diferentes áreas do Nordeste Brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, v.13 (Suplemento), p. 110, 1988a.

MENEZES, M.; HANLIN, R. T. Estudos comparativos sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. III, Variações em isolados da antracnose do cajueiro, em diferentes áreas do Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13 (Suplemento), p. 128, 1988b.

MUNIZ, M. de F. S.; dos SANTOS, C. R.; BARBOSA, G.V. de S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, v. 24, n. 2, p. 177-179, 1998.

SANTOS, A. F.; TESSMANN, D. J.; NUNES, W. M. C.; VIDA, J. B.; JACCOUD FILHO, D. S. Doenças foliares da pupunheira (*Bactris gasipaes*) no estado do Paraná. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 42, p. 125-130, 2001a.

SANTOS, A. F.; TESSMANN, D. J.; JACCOUD FILHO, D. S.; VIDA, J. B. **Doenças da pupunheira**. In: KULCHETSCHI, L.; CHAIMSOHN, F.P.; GARDINGO, J.R. Palmito pupunha (*Bactris gasipaes*). Ponta Grossa, UEPG, 2001b. 148 p.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; LAFAY, J. F.; BRYGOO, Y.; BAILEY, J. A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, v. 18, n. 2, p. 121-138, 1994.

SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A. E., MILLS, P. R. Coffee berry disease pathogen in Africa - genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycological Research**, v. 97, p. 995-1000, 1993.

SREENIVASAPRASAD, S., MILLS, P. R.; BROWN, A. E. Nucleotide sequence of the rDNA spacer-1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. **Mycological Research**, n. 98, p. 186-188, 1994.

SUTTON, B. C. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum***. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK: CAB International. 1992, p. 1-26.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Kew, Inglaterra: Commonwealth Mycological Institute. 1980. 696p.

TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A. Caracterização cultural e morfo-fisiológica de isolados de *Colletotrichum* causadores de antracnose do morangueiro em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 145-151, 1998.

TUITE, J. **Plant Pathology Methods; Fungi and Bacteria**. Mineapolis: Burgess Publishing, 239p. 1969.

VAILLANCOURT, L.; WANG, J.; HANAU, R. **Genetic regulation of sexual compatibility in *Glomerella graminicola***. In: PROUSKI, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. *Colletotrichum – Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. St. Paul: APS Press, 2000. cap. 3, p.29-44.

VERAS, S. M.; GASPAROTTO, L.; MENEZES, M. Variabilidade físió-morfológica de *Colletotrichum graminicola* em diferentes substratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 2, p. 297-305, 1997.