



UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO
DE PLANTAS



CECA

JANE CLÉA GOMES MOREIRA

**EFEITO DA TEMPERATURA E PERÍODO DE PERMANÊNCIA EM CÂMARA
ÚMIDA NA INTENSIDADE DAS MANCHAS DOS CLADÓDIOS DA PALMA-
FORRAGEIRA (*Nopalea cochenillifera*) E AVALIAÇÕES DE CULTIVAR EM
RELAÇÃO ÀS DOENÇAS**

RioLargo

2015

JANE CLÉA GOMES MOREIRA

**EFEITO DA TEMPERATURA E PERÍODO DE PERMANÊNCIA EM CÂMARA
ÚMIDA NA INTENSIDADE DAS MANCHAS DOS CLADÓDIOS DA PALMA-
FORRAGEIRA (*Nopalea cochenilifera*) E AVALIAÇÕES DE CULTIVAR EM
RELAÇÃO ÀS DOENÇAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Proteção de Plantas,
da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Gaus
Silvestre de Andrade Lima

Co-orientador: Profa. Dra. Iraildes
Pereira Assunção

RioLargo

2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

M838e	Moreira, Jane Cléa Gomes. Efeito da temperatura e período de permanência em câmara úmida na intensidade das manchas dos cladódios da palma-forrageira (<i>Nopalea cochenillifera</i>) e avaliações de cultivar em relação às doenças / Jane Cléa Gomes Moreira. – 2015. 44 f. : il. Orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima. Coorientadora: Iraídes Pereira Assunção. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2015. Bibliografia: f. 38-44. 1. <i>Nopalea Spp.</i> 2. Epidemiologia. 3. Cladódio - Doença. 4. Doença – Avaliação. 5. Palma forrageira – Doenças. I. Título. CDU: 632.2:632.4
-------	--

Dedico à Deus primeiramente por ter me capacitado e me dado oportunidade de vencer mais uma etapa importante em minha vida.

Aos meus pais Mauricio Moreira e Benilda Gomes pelo incentivo portarem confiado e apostado em mim durante esses anos, estando ao meu lado em todas as etapas de minha vida.

A minha irmã Angélica Aline pelo amor, carinho e incentivo aos meus estudos.

Ao meu noivo Anderson Salles, por ter sido meu amigo e companheiro durante todos os momentos dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

As minhas tias Benilta Gomes e Cícera Januária, por acreditarem na minha capacidade e estarem sempre presente em minha vida. A querida Amiga Laudjane pelo incentivo e carinho.

Aos meus Compadres Aline Rubenstaine e Evi Araujo, pela confiança e incentivo, a minha Afilhada Evillyn pelo seu amor e carinho.

À Universidade Federal de Alagoas – UFAL, ao Centro de Ciências Agrárias–CECA, juntamente com o Laboratório de Fitopatologia Molecular e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade da realização e concretização do meu curso de Mestrado e pela concessão da minha bolsa de estudo.

Aos meus Professores Iraíldes Pereira Assunção, Gaus Silvestre de Andrade Lima, pela confiança, orientações, muita paciência e dedicação durante todaa minha permanência no programa de Pós – Graduação em Proteção de plantas (OBRIGADA!).

Agradeço ao doutorando Frederico Monteiro Feijó por sua disponibilidade que foi de suma importância para realização de todo o trabalho, dedicando seu tempo para me auxiliar em todas as etapas do trabalho.

Aos meus amigos Jean Phillipe, Renato Nascimento, Lurdes Regina que contribuíram para a concretização deste trabalho e pela Amizade.

A todos os colegas (Mayra, Lucas, Aline, Juçara, Luiz, Maria Eugênia, Janaíne, Jackeline, Leonardo, Roberto) do Laboratório de Fitopatologia Molecular que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

RESUMO

A palma-forrageira é uma cultura de importância socioeconômica no semiárido nordestino, constituindo uma das principais alternativas para alimentar os rebanhos na época da estiagem. Em Alagoas a palma-forrageira é a segunda cultura mais plantada, sendo superada apenas pela cana-de-açúcar. A cultura também alcança relevância nos estados de Pernambuco, Paraíba e Ceará. Apesar de rústica, a palma-forrageira pode ser hospedeira de uma série de patógenos, os quais em determinadas condições podem comprometer a produção. Dentre as doenças se destaca a mancha dos cladódios, que causa lesões circulares, inicialmente amareladas e posteriormente necróticas que comumente atravessam toda a espessura do cladódio. A doença foi relatada em vários estados brasileiros, tendo sido associada a diferentes fungos fitopatogênicos. Os aspectos epidemiológicos da doença ainda não foram investigados, bem como a interação planta-patógeno. Dessa forma o presente trabalho teve como objetivos verificar o efeito da temperatura e permanência em câmara umidade na intensidade das manchas dos cladódios causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp. e avaliar a resposta de cultivar em relação aos mesmos patógenos. Para os experimentos que investigaram os efeitos da temperatura e da umidade no desenvolvimento da doença foram inoculados cladódios da variedade “miúda” com um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* e um de *Fusarium* sp. Para testar o efeito da temperatura, após as inoculações os cladódios foram incubados em BOD ajustadas para 22, 26, 30 ou 34⁰C. No experimento para determinar o efeito da umidade os cladódios foram mantidos, após as inoculações, em câmara úmida por períodos de 12, 24, 36 e 48 horas. Em ambos os experimentos se determinou o diâmetro das lesões aos sete dias após a inoculação. Para testar a resposta das cultivar em relação aos dois patógenos, cladódios de “Miúda”, “Texas Nopalera”, “Palma Alagoas”, “Negro Michoacan” e “Tamazunchale” foram inoculados e mantidos em BOD a 22⁰C durante sete dias, quando os diâmetros das lesões foram determinados. De um modo geral temperaturas mais amenas e períodos de umidade mais prolongados favoreceram o desenvolvimento da doença, sendo 22⁰C e 48 horas de permanência na câmara úmida as condições que proporcionaram as lesões mais extensas, seja para *C.gloeosporioides*, seja para *Fusarium* sp. Com relação ao comportamento das cultivar verificou-se que “Texas Nopalera” e “Tamazunchale” desenvolveram lesões significativamente menores que as demais cultivar quando inoculadas com *Fusarium* sp. Em relação a *C. gloeosporioides* se destacaram “Negro Michoacan” e “Tamazunchale” como as mais resistentes.

Palavras Chaves: *Nopalea* spp., Epidemiologia, Doença da palma-forrageira.

ABSTRACT

The sweet cactus is a culture of socioeconomic importance in the semi-arid northeastern, constitute one of the main alternatives to feed the flocks in the season of the drought. In Alagoas the sweet cactus is the second crop more planted, being surpassed only by the sugarcane. Culture also reaches relevance in the states of Pernambuco, Paraíba and Ceará. Although rustic, sweet cactus can be a host for a series of pathogens, which under certain conditions may compromise the production. Among the diseases that highlights the stain of cladodes, which causes lesions circulars, initially yellowish and subsequently necrotic that commonly cross the whole thickness of the cladode (pad). The disease was reported in several Brazilian states, having been associated to different phytopathogenic fungi. The epidemiological aspects of the disease has not yet been investigated, as well as plant-pathogen interaction will be. In this way the present work had as objective to verify the effect of temperature and moisture chamber permanence in the intensity of the spots of cladodes caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. and assess response to cultivate in relation to the same pathogens. For the experiments that have investigated the effects of the temperature and humidity in the development of the disease were inoculated cladodes variety "Streetwise" with one isolate of *Colletotrichum gloeosporioides* and one of *Fusarium* sp. To test the effect of temperature, after the inoculations the cladodes were incubated in BOD adjusted for 22, 26, 30 or 34°C. In experiment to determine the effect of moisture the cladodes were kept, after inoculations, in a humid chamber for periods of 12, 24, 36 and 48 hours. In both experiments if determined the diameter of lesions to seven days after inoculation. To test the response of the cultivar in relation to two pathogens, cladodes of "Streetwise", "Texas Nopalera", "Palma Alagoas", "Negro Michoacan" and "Tamazunchale" were inoculated and kept in BOD at 22 °C for seven days, when the diameters of the lesions were determined. Generally milder temperatures and humidity more prolonged periods favored the development of the disease, being 22°C and 48 hours of permanence in the wet chamber conditions that have provided more extensive lesions, whether for *C. gloeosporioides*, either for *Fusarium* sp. With regard to the behavior of the cultivar was found that "Texas Nopalera" and "Tamazunchale" developed lesions significantly lower than the other cultivar when inoculated with *Fusarium* sp. In relation to *C. gloeosporioides* stood out, "Negro Michoacán" and "Tamazuchale" as the most resistant.

Key words: *Nopalea* spp., Epidemiology, Sweet cactus disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura – 1 Origem e obtenção dos isolados.....	19
Figura – 2 Preservação dos isolados C14 e F43.....	20
Figura – 3 Teste de patogenicidade com e sem ferimento.....	25
Figura – 4 Caracterização morfológica dos isolados C14 e F43.....	26
Figura – 5 Aspecto das colônias dos isolados C14 e F45 aos sete dias de Idade.....	27
Figura – 6 Efeito da temperatura (22, 26, 30 e 34 °C) sobre o tamanho médio das lesões Causadas por <i>C. gloeosporioides</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	30
Figura – 7 Efeito de período de permanência em câmara úmida sobre tamanho Médio das lesões causadas por <i>C. gloeosporioides</i> e <i>Fusarium</i> sp. Em Cladódios de palma – forrageira	33
Figura – 8 Comportamento de cultivares de palma – forrageira á <i>C. gloeosporioides</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico - 1 Efeito de diferentes temperaturas sobre o tamanho médio das Lesões causadas por <i>C. gloeosporioides</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	29
Gráfico – 2 Efeito de períodos de permanência em câmara úmida sobre o o tamanho médio das lesões causada por <i>C. gloeosporioides</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	32
Gráfico – 3 Resposta de cultivares depalma-forrageira miúda à mancha Dos cladódios causadas por <i>C. gloeosporioides</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1 Quadro da análise de regressão para o efeito da temperatura sobre a severidade das machas de cadódios ocasionada pela antracnose.....	28
Tabela - 2 Quadro da análise de regressão para o efeito da temperatura sobre a severidade das machas de cadódios ocasionapela fusariose.....	30
Tabela – 3 Quadro da análise de regressão para o período de permanência em câmara Úmida para antracnose.....	31
Tabela - 4 Quadro da análise de regressão para o período de permanência em câmara úmida para fusariose.....	32
Tabela – 5 Quadro de análise de variância da resposta de cultivaresde palma forrageira miúda a <i>C. gloesporioides</i> aos 7 dias após inoculação (DAI).....	34
Tabela - 6 Quadro de análise de variância da resposta de cultivares de palma forrageira miúda a <i>Fusarium</i> spaos 7 dias após inoculação (DAI).....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2. 1 Aspectos botânicos da cultura da palma-forrageira.....	15
2. 2 Importância econômica-social da palma-forrageira.....	15
2. 3 Doenças da palma-forrageira.....	15
2. 4 Efeito da temperatura e tem em câmara úmida sob a severidade das doenças.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3. 1 Origem e obtenção dos isolados.....	18
3. 2 Cultura monospórica.....	18
3. 3 Preservação dos isolados.....	19
3. 4 Teste de patogenicidade.....	20
3. 5 Identificação e caracterização dos isolados.....	20
3. 5. 1 Caracterização cultural.....	21
3. 5. 2 Caracterização morfológica.....	21
3. 6 Caracterização molecular.....	22
3. 6. 1 Extração de DNA.....	22
3. 6. 2 Amplificação do DNA e sequenciamento dos produtos de PCR.....	23
3. 7 Efeito da temperatura na severidade da doença.....	23
3. 8 Efeito da umidade na severidade da doença.....	24
3. 9 Respostas de diferentes cultivar de palma-forrageira miúda (<i>Nopalea cochenillifera</i>) a <i>Colletotrichum gloesporioides</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4. 1 Obtenção dos isolados e teste de patogenicidade.....	25
4. 2 Caracterização morfocultural e molecular.....	26
4. 3 Efeito da temperatura na severidade da mancha dos cladódios.....	28
4. 4 Efeito de período de permanência em câmara úmida na severidade das manchas dos cladódios da palma forrageira.....	31
4. 5 Resposta de cultivares de palma-forrageira miúda (<i>Nopalea cochenillifera</i>) às manchas dos cladódios ocasionadas por <i>Colletotrichum gloesporioides</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	34
CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Água Destilada
ADE	Água Destilada Esterilizada
ASSISTAT	Assistência Estatística
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BLAST (NCBI)	Basic Local Alignment Search Tool (National Center for Biotechnology Information)
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CAM	Metabolismo do ácido crassuláceo
CECA	Centro de Ciências Agrárias
CTAB	Cetil Trimetil Brometo de Amônio DNA
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
IPA	Empresa pernambucana de pesquisa Agropecuária
ITS	Internal transcribed spacer
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rDNA	DNA ribossômico
TMLC	Tamanho médio das lesões de <i>Colletotrichum</i>
TMLF	Tamanho médio das lesões de <i>Fusarium</i>
UFAL	Universidade Federal de Alagoas

1 INTRODUÇÃO

Palma-forrageira (*Nopalea cochinillifera*, Salm Dyck) é o nome popular que determinadas espécies da família *Cactaceae* recebem. Algumas dessas espécies apresentam importância econômica, sendo utilizadas na alimentação animal e como criatório para a cochonilha do carmim (*Dactylopius coccus*, Costa), a qual é empregada como fonte de um corante muito utilizado na indústria de cosméticos e na indústria alimentícia (Santos et al., 2006).

Nos últimos anos, a área cultivada com palma-forrageira no Brasil vem crescendo, chegando a aproximadamente 500 mil hectares, concentrados principalmente nos municípios das bacias leiteiras de Alagoas, Pernambuco, Ceará e Paraíba. O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de palma-forrageira seguido por África do Sul, México e Peru (Santos et al., 2006).

De acordo com Santos (2001) outra vantagem importante da palma-forrageira, é que diferentemente de outras forragens, apresenta alta taxa de digestão ruminal, sendo a matéria seca degradada rapidamente, favorecendo maior taxa de passagem e, conseqüentemente, consumo semelhante ao dos concentrados.

Segundo Santos et al. (1990), no Brasil são exploradas comercialmente três variedades. A Graúda ou Gigante e a Redonda pertencem à espécie *Opuntia ficus-indica*, e a Miúda ou Doce, à espécie *Nopalea cochenillifera* sendo que as duas primeiras têm se mostrado mais rústicas que a miúda. Em Pernambuco e na Paraíba predominam as cultivares Gigante e Redonda, enquanto que em Alagoas a palma-forrageira Miúda é mais plantada.

A empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA tem sido referência no melhoramento genético da palma-forrageira no Brasil, bem como no desenvolvimento de sistemas de produção mais eficientes para a cultura. O IPA detém um banco de germoplasma na Estação Experimental de Arcoverde, (PE), com cerca de 1.400 entradas de diferentes variedades, sendo 200 destas introduzidas do México, EUA, África do Sul, Argélia, Chile entre outros (Silva et al., 2006).

De acordo com Santos et al. (2006) a utilização de culturas anuais como milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum Bicolor* L. Moench), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), jerimum (*Cucurbita pepo* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

etc.,intercaladas com a palma forrageira tem sido uma prática adotada pelos produtores com o objetivo de viabilizar o cultivo em termos econômicos e de tratos culturais desta forrageira.

No Brasil poucos estudos foram conduzidos com foco nas doenças da palma-forrageira, dentre as doenças descritas no Nordeste, destacam-se as podridões dos cladódios, as podridões de raízes e raquetes da base e as manchas dos cladódios (Santos et al, 2002).

Contudo, a mancha de *Alternaria*, pelo menos para a palma-forrageira variedade miúda, parece ser a doença mais importante, pela freqüente observação no campo. Os sintomas caracterizam-se por manchas de coloração preta nas raquetes, nas formas circulares ou elípticas, medindo 1,0-3,0 cm de diâmetro com abundante esporulação na superfície da lesão. Frequentemente as lesões são secas e se estendem de uma face à outra da raquete, exibindo perfurações devido à queda do tecido infectado. As manchas podem coalescer, formando grandes áreas necrosadas e causando queda das raquetes. (Santos et al, 2002)

Dependendo da região considerada, diferentes patógenos tem sido relatados como agentes etiológicos das manchas dos cladódios, sendo os fungos *Altenaria* sp., *C. gloeosporioides* e *Cercosporidium* sp. os mais frequentes (Santos et al., 2006; Quezada-Salinas et al., 2006; Rosa et al.2008;Lima et al.2011).

Apesar da importância das manchas dos cladódios da palma-forrageira nenhum trabalho foi desenvolvido com o intuito de se verificar o efeito de fatores ambientais como a temperatura e o período de permanência em câmara úmida na incidência porcentagem (freqüência) da planta doente ou órgãos doentes e na severidade das doenças porcentagem da área de tecido doente (sintomas e/ou sinais visíveis). De acordo com Santos et al.(2006 a expansão da cultura da palma-forrageira e o plantio adensado podem contribuir para o aumento da incidência dessa e de outras doenças,justificando estudos mais detalhados, principalmente no que se refere ao efeito dos fatores ambientais e às medidas de controle, pois até o momento tais informações não estão disponíveis.

Também não se encontrou estudos sobre a reação de diferentes cultivares de palma-forrageira em relação às doenças, pois dadas as características da cultura, notadamente ao fato de ser praticada por pequenos agricultores/criadores, a resistência genética seria a medida de manejo mais indicada.Visto que além do alto potencial de rendimento, boa resistência às doenças, garantem a estabilidade da produção e aceitação dos agricultores.

Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivos investigar o efeito da temperatura e permanência em câmara umidade na severidade das manchas dos cladódios da palma-forrageira e avaliar a resposta de cinco cultivar de palma-forrageira miúda (*Nopalea*

cochonillifera) em relação à doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos botânicos da cultura da palma-forrageira

As espécies de palma-forrageira estão inseridas na Classe Angiospermae, Família Cactaceae; Subfamília Puntioideae, Gênero *Opuntia*; subgênero *Opuntia* e *Nopalea* (Chiacchio et al. 2006). As espécies são consideradas xerófilas, apresentando adaptações às condições edafoclimáticas adversas do semiárido. A sua fisiologia é caracterizada pelo processo fotossintético denominado metabolismo do ácido crassuláceo (CAM) (Farias et al., 2000).

De acordo com Fabricantes et al., (2014) algumas características morfológicas das palma forrageiras incluem caules suculentos, ramificados, clorofilados, achatados, de coloração verde-acinzentada, mais compridos, variando de densamente espinhosos até desprovidos de espinhos, porte arbustivo, com altura entre 1,5 e 3 m. As folhas são excepcionalmente pequenas, decíduas e precoces. As flores são vistosas, amarelas ou laranjas brilhantes e possuem numerosos estames. Os frutos são amarelos- avermelhados, suculentos, com aproximadamente 8 cm de comprimento, com tufo de diminutos espinhos.

2.2 Importância econômica-social da palma-forrageira

As espécies *Opuntia ficus-indica* e *Nopalea cochenillifera* se destacam como as mais plantadas e de acordo com Broglio-Micheletti et al. (2008), provavelmente são originárias das Ilhas Canárias, tendo sido introduzidas no Brasil pelos portugueses no século XIX, para se iniciar a multiplicação da cochonilha (*Dactylopius coccus* Costa), que produz o corante carmim, de grande valor comercial à época.

Segundo a literatura, atualmente a cochonilha do carmim não sobrevive em condições de campo aberto e o seu “cultivo” tem sido realizado sob condições especiais de temperatura e luminosidade, o que provavelmente causou o insucesso da produção da cochonilha, as cactáceas introduzidas passaram a ter valor como planta ornamental e posteriormente como forrageira.

A palma-forrageira possui caracteres que atornam importante para a pecuária tanto pela capacidade de adaptação, rusticidade e longevidade no semiárido como pela boa palatabilidade pelo gado (Silva et al.,2010).

Atualmente, a palma-forrageira é cultivada visando principalmente à subsistência das famílias pecuarista do Nordeste do Brasil, onde são cultivadas entre as espécies de palma-forrageira a Cv. “gigante” (*Opuntia ficus-indica*), Cv. “redonda” (*Opuntiasp*), e Cv. “miúda” (*Nopalea cochenillifera* SalmDick).

A palma-forrageira miúda apresenta maior palatabilidade ao gado, entretanto, menor resistência à seca Silva et al.,2010).

A palma-forrageira possui aspecto fisiológico especial quanto à absorção, aproveitamento e perda de água, sendo bem adaptada às condições adversas do semiárido, suportando prolongados períodos de estiagem (Silvae Santos 2006). Além de fornecer nutrientes aos ruminantes no período de seca a palma-forrageira ajuda os animais suprirem grande parte da água necessária ao corpo (Wanderley et al.,2002).

Para o nordeste Brasileiro, a palma-forrageira, é uma cultura considerada como uma das melhores alternativas de suporte forrageiro, que pode atender, durante o período seco, boa parte das necessidades dos bovinos e caprinos.

Para o estado de Alagoas a cultura da palma-forrageira é de suma importância, visto que é a segunda cultura econômica mais plantada no estado para suprir as necessidades da pecuária, perdendo apenas para a cultura da cana de açúcar.

2.3 Doenças da palma-forrageira

Pesquisas que abordam doenças da palma-forrageira são escassas no Brasil e, de um modo geral, se limitam a registros de ocorrência e descrição de sintomas. Os fungos são os patógenos mais observados sobre a cultura e infectam preferencialmente as raquetes, ricas em umidade (Benna,1991;Granatae Sidoti,2000).

Diversos fungos têm sido relatados como agente das podridões dos cladódios e das raízes e raquetes da base da palma-forrageira, podendo-se cita *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff & Maubl., *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Scytalidium lignicola* Pes., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc e *Rhizoctonia solani* Kuhn. A podridão de raquetes da base também pode ter como agente etiológico a bactéria *Pectobacterium carotovora* (Santos et al., 2006). Por sua vez, as manchas dos cladódios são provocadas principalmente por *Alternaria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e pó *Pseudocercospora* sp. (Quezada- salinas et al., 2006,

Rosa et al., 2008; Hernández-Peres et al., 2009).

No caso da palma-forrageira miúda a mancha dos cladódios parece ser uma das doenças mais importantes, pela frequente observação no campo, visto que seus sintomas são bem característicos.

De acordo com Santos et al. (2006) uma mancha dos cladódios, atribuída a *Alternaria* sp. foi assinalada no município de São Bento – PE, ocorrendo epidemia com 70% de incidência em palma-forrageira Cv. miúda e causando intensa queda de raquetes. Lima et al. (2011) também verificaram alta incidência da mancha dos cladódios nos municípios de Batalha - AL e São João - PE. Em ambas as situações os autores observaram que *Alternaria* sp. era o agente etiológico da doença.

No México, a partir de raquetes com sintomas semelhantes aos da mancha de *Alternaria*, foram isolados os fungos *C. gloeosporioides* e *Cercosporidium* sp. (Quezada-Salinas et al., 2006). Os autores verificaram que a inoculação de conídios de *Cercosporidium* apenas ou misturados a conídios de *C.gloeosporioides* resultava em lesões semelhantes às observadas em campo, no entanto nenhum sintoma foi observado quando a inoculação se fez apenas com conídios de *C.gloeosporioides*.

Por outro lado, Rosa et al. (2008) relataram que as manchas dos cladódios observadas em Pernambuco e na Paraíba foram ocasionadas por *C.gloeosporioides*. Segundo esses autores as lesões geralmente são marrons claras, ligeiramente deprimidas e com aspecto úmido, medindo de 0,5 a 2,0 cm de diâmetro, as quais também podiam atravessar toda a espessura dos cladódios.

Todavia, no caso de *Alternaria* sp. A identificação foi baseada apenas em caracteres morfológicos não sendo possível chegar à espécie e, *C. gloeosporioides*, a identificação foi feita com base no sequenciamento da região ITS, o que tem se mostrado insuficiente para identificação precisa do patógeno (DAMM et al., 2012). Também é possível que outros patógenos possam causar sintomas semelhantes em cladódios de palma-forrageira.

De acordo com Freire, (2009) a Antracnose foi detectada em poucas plantas da cultura da palma-forrageira, especialmente em período chuvoso. Causada pelo fungo *Colletotrichum* sp., a enfermidade foi observada afetando a parte terminal da planta, provocando uma extensa lesão decoloração azulada, às vezes com linhas concêntricas.

Colletotrichum é um gênero que pertence à classe dos ascomicetos, abrangendo várias espécies que causam antracnose em diversas culturas (BAYLEY, JEGER, 1992). O gênero *Colletotrichum* foi recentemente apontado por fitopatologistas de todo o mundo como o oitavo gênero de fungos fitopatogênicos mais importante (DEAN, et al., 2012).

2.4 Efeito da temperatura e tempo em câmara umidade sob a severidade das doenças

Segundo Agrios (1997) a temperatura e a umidade na superfície da planta são os fatores ambientais que mais afetam o início e o progresso de doenças infecciosas em plantas. Os patógenos diferenciam-se desenvolvendo por alta ou baixa temperatura, uma vez que a mesma afeta a germinação de esporos e o número de esporos formados. Existem quatro combinações de temperatura e umidade que favorecem um grande número de doenças e seus agentes causais: quente e seco, quente e úmido, frio e seco, frio e úmido (Kenaga,1974).

A umidade é indispensável para a germinação da maioria dos esporos fúngicos e para a penetração do tubo germinativo no hospedeiro, além de aumentar a suscetibilidade a certos patógenos, afetando a incidência e a severidade permitindo a ocorrência de doenças (Arinze,1986).

Menezes (2006) relata que condições particulares do ambiente, do patógeno e do hospedeiro determinam a ocorrência de uma doença, sua incidência e severidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), localizado no município de Rio Largo, no período de abril de 2013 à março de 2015.

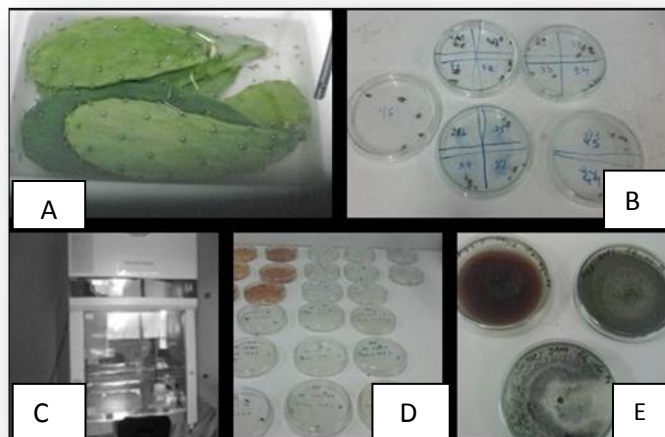
3.1 Origem e obtenção dos isolados

Para a condução do experimento, foram obtidos cladódios de Cv. miúda apresentando sintomas de manchas necróticas circulares em sua superfície. Os cladódios foram coletados em áreas produtoras localizadas no município de São João-PE. No Laboratório, os cladódios foram lavados e secos naturalmente. Foi realizada a técnica de isolamento indireto onde foram retirados fragmentos da área de transição entre o tecido sadio e o doente, os quais foram desinfestados com soluções de álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por um minuto, lavados em água destilada esterilizada (ADE), postos para secar em papel de filtro e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Após a formação das colônias, pequenos discos de meio de cultura contendo

o crescimento do patógeno, foram retirados das bordas das colônias e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e mantidos em temperatura ambiente por 10 dias, até o surgimento das estruturas de reprodução do patógeno (Figura 1).

Figura 1: Origem e obtenção dos isolados

Lavagem dos cladódios (A); fragmentos de tecido lesionado (B) Cabine de fluxo laminar (C); isolamento do patógeno (D), e Crescimento do patógeno após isolamento (E).



Fonte; MOREIRA, 2015.

3.2 Cultura monospórica

Apartir dos isolamentos realizados procedeu-se a metodologia para a obtenção de culturas monospóricas para garantir a pureza genética dos isolados. A suspensão de esporos foi obtida através de uma raspagem superficial sobre a colônia e colocada em um recipiente contendo 1mL de ADE. Em seguida, foram realizadas contagens de esporos em câmara de Neubauer de forma a ajustar a suspensão para 10^5 esporos/mL. Após a diluição foram colocados 40µl desta solução em uma placa de petri contendo BDA e espalhada uniformemente com auxílio de uma alça de Drigalski.

As placas de Petri contendo os esporos foram examinadas no microscópio óptico e os esporos individuais e germinados foram transferidos para placas contendo BDA, onde foram mantidas à temperatura ambiente.

3.3 Preservação dos isolados

Foram aplicados dois métodos para preservação dos isolados da cultura monospórica. Para o primeiro método foram utilizados tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, inoculados com disco de micélio do fungo 5mm. O segundo método utilizado foi o de Castellani, onde cinco discos de 5mm contendo o micélio foram armazenados em frascos de vidro (10 mL) contendo 5mL de ADE (figura 2).

Figura 2 - Preservação dos isolados

Método de Castellani e tubos de ensaio com meio BDA.



Fonte; MOREIRA, 2015.

3.4 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado em cladódios sadios destacados da palma forrageira miuda. Os cladódios foram tratados com solução de hipoclorito de sódio a1% por cinco minutos, lavados em água destilada (AD) e secos com a temperatura ambiente. Foram utilizados dois métodos para o teste de patogenicidade. O primeiro a inoculação foi feita através da deposição de quatro gotas de 40µL de uma suspensão de esporos (10^6 conídios/mL) sobre a superfície dos cladódios (com ou sem ferimentos) os ferimentos foram feitos com o auxílio de uma agulha previamente esterilizada na chama. Na testemunha foi utilizada apenas água destilada esterilizada (ADE). No segundo método discos demicélio (5mm) retirados da cultura monospórica contendo estruturas do patógeno, foram depositados sobre cladódios (com ou sem ferimentos) com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada. Na testemunha foi utilizada apenas discos de BDA. Após a

inoculação cada cladódio foi acondicionado separadamente em bandejas plásticas contendo papel filtro umedecido com água destilada autoclavada. O experimento foi mantido em incubadora BOD a $25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas durante 10 dias.

3.5 Identificação e caracterização dos isolamentos

Isolados fúngicos que tiveram sua patogenicidade confirmada foram caracterizados quanto aos aspectos morfológicos, culturais e moleculares.

3.5.1 Caracterização cultural

Foram utilizados os 2 isolados monospóricos C14 e F43. Para a condução deste ensaio, discos de 5mm contendo micélio foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sendo 4 repetições por isolado. As placas contendo os discos foram incubadas em B.O.D. a $25\pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas de luz, por sete dias.

Foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial dos isolados em duas direções diametralmente opostas no fundo externo das placas, com auxílio de régua milimetrada, por um período de sete dias. As médias obtidas foram utilizadas para calcular o índice de crescimento micelial – ICM (mm/dia) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{ICM} = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} \dots + \frac{C_n}{N_n}$$

Onde:

ICM= índice de crescimento micelial

C_1 = crescimento micelial no primeiro dia

N_1 = número de dias

Também foram observadas a coloração das colônias e o aspecto do micélio para cada patógeno.

3.5.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica baseou-se no tamanho e forma dos conídios e apressórios de cada isolado observados com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 40 vezes. A produção de esporos dos isolados foi obtida por meio do cultivo em meio BDA em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias e fotoperíodo de 12 horas. Imagens da morfologia dos conídios foram capturadas e posteriormente cinquenta conídios de cada isolado tiveram largura e comprimento medidos por meio da mensuração projetadas em monitor de computador, através do *software Cellsenses Standard*.

Foi utilizado o método de microcultivo em ágar-água para avaliação do formato dos apressórios. As lâminas foram observadas em microscópio óptico e a mensuração dos apressórios feita como descrito para os conídios. O formato dos conídios e apressórios foi avaliado de acordo com chave de identificação proposta por Sutton (1980; 1992).

3.6 Caracterização molecular

3.6.1 Extração de DNA

Para a obtenção do DNA dos isolamentos foi utilizado o protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998), onde o micélio dos isolados crescidos em BDA durante sete dias foram lavados com ADE e em seguida, macerados com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo. Em seguida adicionou-se 2000 μL de tampão de extração CTAB4% (CTAB4%, NaCl 1,4/M, EDTA 20/mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%) e 4 μL de β -mercaptoetanol, onde apenas 500 μL do micélio triturado foi transferido para tubos de micro centrífuga com capacidade de 1,5 mL. Os tubos foram mantidos em banho Maria a 65°C por 30 minutos.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 600 μL de CIA (clorofórmio: álcoolisso- amílico - 24:1) e 40 μL de CTAB 10% aquecido a 65°C . Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi acrescentando 400 μL de etanol absoluto. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspendido com 40 μL de TE (Tris- HCl 10mM, EDTA 1 mM) (10mL) + RNase (50 μL) ,na proporção de 1:49. O DNA obtido foi armazenado sob

temperatura de -20°C até sua utilização para amplificação.

3.6.2 Amplificação do DNA e sequenciamento dos produtos de PCR

Inicialmente representantes de todos os isolamentos obtidos tiveram a região ITS (espaçador transcrito interno) do DNA ribossomal (rDNA) amplificada e sequenciada. Para amplificação foram utilizados os oligonucleotídeos universais, ITS1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (Bonants *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2006). O volume final da reação foi ajustado para 60µL com água Milli-Q. As condições de termociclagem da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 38 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio e observados sob luz UV, posteriormente, purificados utilizando o Kit illustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

As sequências obtidas foram utilizadas para análises filogenéticas para determinação do gênero. Dependendo do gênero considerado outras regiões genômicas foram amplificadas e sequenciadas para se chegar à espécie. As composições das reações de amplificação e as condições em que ocorreram variaram conforme a região genômica alvo e podem ser consultadas em Carbone & Kohn (1999).

Todas as reações de sequenciamento foram realizadas na Empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul).

3.7 Efeito da temperatura na severidade da doença

O efeito da temperatura sobre o tamanho médio das lesões causadas por *C. gloeosporioides* e *Fusarium* sp. foi avaliado em incubadoras B.O.D. ajustadas para as temperaturas de 22, 26, 30 e 34°C. Cada cladódio foi inoculado com três discos de micélio de cada patógeno depositado sobre um ferimento de 0,8 tamanho médio das lesões realizado com uma agulha hipodérmica flambada. Após a inoculação os cladódios foram mantidos em câmara úmida, formada por um saco plástico contendo um chumaço de algodão umedecido

com ADE por 48 horas. Na testemunha discos contendo de meio de cultura BDA foram utilizados em substituição aos discos contendo estruturas do patógeno.

A severidade d doença foi mensurada por meio da determinação do diâmetro das lesões, realizada sete dias após as inoculações. O experimento foi mantido em BOD com fotoperíodo de 12 horas e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, cada repetição representada por uma raquete. Foram realizadas análises de regressão entre a variável temperatura e o diâmetro médio das lesões de cada patógeno e os valores médios foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software ASSISTAT 7.7beta.

3.8 Efeito da umidade na severidade da doença

Os experimentos para determinação do efeito de períodos de permanência em câmara úmida também foram conduzidos em incubadoras BOD, ajustadas para 22 °C e fotoperíodo de 12/h, variando-se o tempo de permanência dos cladódios em câmara úmida após inoculação com *C.gloeosporioides* ou *Fusarium* sp. As inoculações, avaliações da severidade e análise estatística dos dados seguiram os mesmos procedimentos dos ensaios para determinação do efeito da temperatura na severidade da doença, ou seja, realizadas análises de regressão entre a variável tempo em câmara úmida e o tamanho médio das lesões de cada patógeno e os valores médios foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software ASSISTAT 7.7beta.

3.9 Resposta de diferentes cultivar de palma-forrageira miúda (*Nopalea cochenillifera*) a *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp.

Para a condução desse experimento foram avaliadas cinco cultivar de palma-forrageira miúda (*Nopalea* sp.): “Palma-forrageira Miúda”, “Negro Michoacan”, “Palma-forrageira Alagoas”, “Texas Nopalera” e “Tamuzunchale”. Cinco cladódios de cada variedade foram inoculados com *C. gloeosporioides* e cinco com *Fusarium* sp. Após as inoculações os cladódios foram mantidos em câmara úmida em BODs ajustadas para 22 °C. Sete dias após as inoculações a severidade da doença foi determinada, medindo-se o

diâmetro das lesões. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado e a média do diâmetro médio das lesões foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software ASSISTAT7.7 beta.

4. Resultados e discussão

4.1 Obtenção de isolados e testes de patogenicidade

Dos sete isolados obtidos nesse estudo, apenas dois (C14 e F43) foram patogênicos aos cladódios de palma-forrageira miúda (*Nopalea* sp.) Para ambos os patógenos os sintomas foram observados a partir do sétimo dia após a inoculação, inicialmente como manchas circulares e necróticas que posteriormente chegou a ser observada na outra face do cladódio (Figura 3). Provavelmente o processo patogênico dos dois isolados está relacionado a produção de enzimas pectolíticas, responsáveis pela dissolução do tecido colonizado, que se expressa por meio dos orifícios visualizados dos cladódios. Esse mesmo tipo de lesão foi relatado por Lima et al. (2011), porém o patógeno envolvido era *Alternaria* sp.

Os sintomas foram observados apenas quando se realizou fermentos nas raquetes, o que de certa forma corrobora com as observações de Varvaro, et al.,(1993) que afirmam que a maior severidade da doença está sempre associada a fermentos nas raquetes e excesso de umidade.

Figura 3. Teste de patogenicidade com e sem fermento.



Fonte: MOREIRA, 2015.

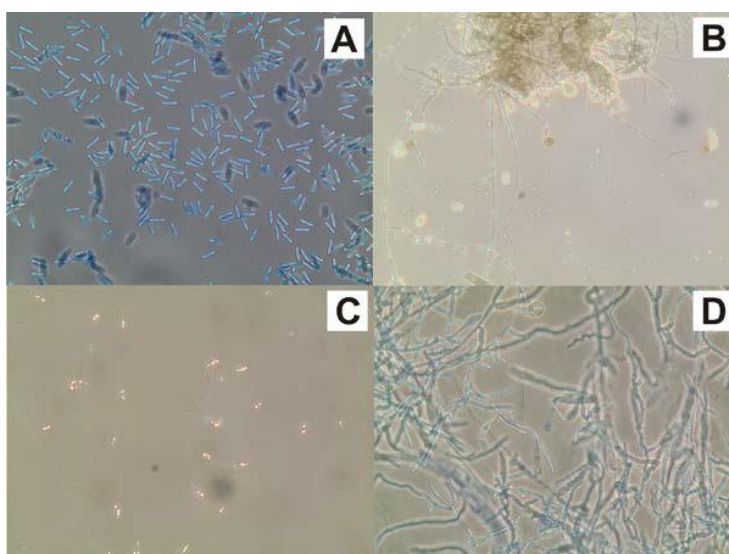
4.2 Caracterização morfocultural e molecular

Para a caracterização morfológica, o isolado C14 apresentou conídios retos com um dos lados afilados, hialinos e unicelulares. O tamanho dos conídios variou de 6,20 – 14,47 μm para o comprimento e 2,02 – 6,15 μm para a largura. Não foram observadas setas nos acérvulos. Os apressórios apresentaram-se de cor escura (melanizado) e forma ovalada e clavada com suas dimensões variando de 2,51 - 5,04 μm de comprimento 2,30 - 4,93 μm de largura (Figura 4). Portanto os dados de morfologia indicam que o patógeno em questão pode ser considerado como pertencente ao gênero *Colletotrichum*, possivelmente do complexo *C.gloeosporioides* Vinnere (2004), Serraetal. (2011).

O isolado F43, produziu apenas microconídios hialinos de forma cilíndrica a oval sem presença de septos e com tamanho variando de 3,88- 8,82 μm de comprimento e 1,64 2,48 μm de largura. Na microcultura foi observado conídios formados em cadeia nas extremidades dos conidióforos e em meio de cultura SNA esse isolado produziu clamidósporos abundantemente, mas não produziu peritécio (Figura4). Tais características permitem posicionar o referido isolado no gênero *Fusarium*, sendo necessários testes adicionais para determinação específica.

Figura 4. Caracterização morfológica dos isolados C14 e F43.

* **A** – Conídios do isolado C14; **B** – apressórios do isolado C14; **C** – microconídios doisolado F43 e **D** – clamidósporo do isolado F43.



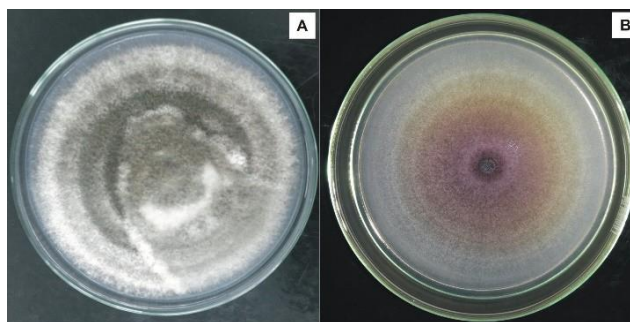
Fonte; MOREIRA, 2015.

Na caracterização cultural, o isolado C14 e F43 apresentaram os seguintes dados para o índice de crescimento micelial (ICM), que correspondeu a 10,41 e 10,27 mm/dia respectivamente. O isolado C14 exibiu micélio moderadamente abundante (colônias com micélio aéreo de até 3 mm de altura) de coloração branco acinzentado, característica de *C.gloesporioides* (Figura 5).

O isolado F43 apresentou micélio aéreo reduzido (colônias com o micélio crescendo ao meio de cultura), apresentando coloração arroxeada no centro da colônia e formação de arcos concêntricos de coloração alaranjada/amarelada e branco leitosa nas bordas aos 7 dias e coloração arroxeada em toda a colônia aos 14 dias de inoculação (Figura 5).

Figura 5. Aspecto das colônias dos isolados C14 e F43 aos sete dias de idade.

A – colônia do isolado C14 e **B** – colônia do isolado F43



Fonte; MOREIRA, 2015.

As características culturais observadas para os isolados C14 e F43 são compatíveis com características de *C. gloesporioides* e *Fusarium* sp., respectivamente. O fato de o um isolado de *Fusarium* não ter produzido macroconídios, apesar de não usual já foi relatados por outras fontes. Conforme proposto por Nelson et al. (1983), a taxonomia de espécies do gênero *Fusarium* é bastante controversa, sendo de fundamental importância a caracterização filogenética.

O seqüenciamento da região ITS e a análise filogenética realizada a partir desses dados suportam a hipótese de que o isolado C14 pertence ao gênero *Colletotrichum* enquanto que o isolado F43 ao gênero *Fusarium*, sendo que outras regiões genômicas estão em processo de seqüenciamento para determinação específica desses patógenos.

4.3 Efeito da temperatura na severidade da mancha dos cladódios

Nos testes para determinar o efeito da temperatura no desenvolvimento das lesões da mancha dos cladódios, os maiores tamanhos médios das lesões (TML) foram observados no tratamento a 22°C para antracnose, apresentando diferença significativa dos demais tratamentos e a análise de regressão (tabela 1) ajustou para uma equação linear $y = -0,0222x + 1,8605$ e coeficiente de determinação 96,37% (Gráfico1).

Tabela 1. Quadro da análise de regressão para o efeito da temperatura sobre a severidade das machas de cladódios ocasionada pela antracnose.

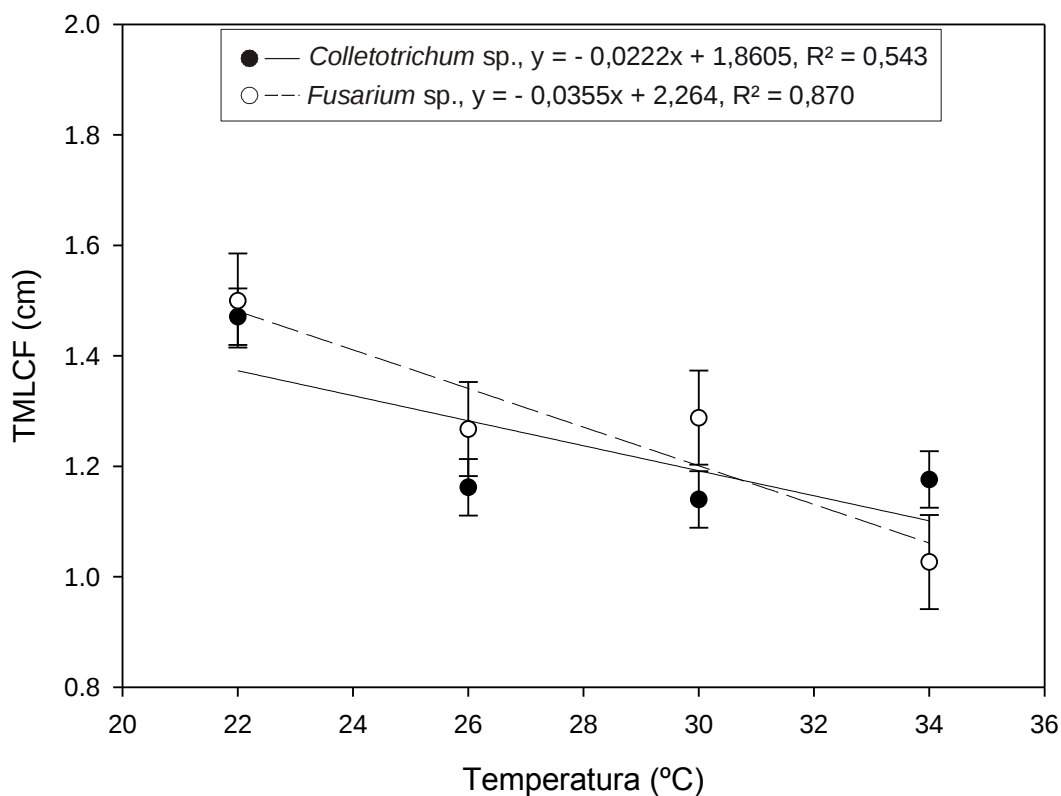
FONTE DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
REG. LINEAR	1	0.20250	0.20250	22.4377 *
REG. QUADRÁTICA	1	0.14792	0.14792	16.3900 *
TRATAMENTOS	3	0.36252	0.20250	13.3895 --
RESÍDUO	16	0.14440	0.14792	
TOTAL	19	0.50692	0.01210	
CV (%)	7,67			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$), ns não significativo ($p \geq .05$). Fonte: MOREIRA, 2015.

De acordo com Menezes et al., (2004), a faixa ótima de temperatura para a maioria das espécies do gênero *Colletotrichum* varia de 20-30°C, mostrando que o isolado utilizado nesse estudo está dentro da faixa de temperatura encontrada na literatura (Figura 6). Dias et al., 2005, enfatizaram que a temperatura é uma das principais variáveis climáticas responsáveis pela infecção e posterior colonização de patógenos do gênero *Colletotrichum*.

Gráfico 1. Efeito de diferentes temperaturas sobre o tamanho médio das lesões causada por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp.

TMLCF – Tamanho médio das lesões de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp.



Em trabalho recente, Soares-Collettie Lourenço (2014) relatam que a maior incidência da antracnose em frutos de goiabeira (100%) ocorreu a 25 e 30°C e 6h de duração do molhamento para ambas as espécies de *Colletotrichum* (*C.acutatum* e *C.gloeosporioides*) cerca de 10 dias após a inoculação. No trabalho de Lima (2013) é relatado que temperaturas acima de 10°C proporcionaram o desenvolvimento de lesões em frutos de manga inoculadas com as espécies de *Colletotrichum*.

Temperaturas mais baixas também favoreceram o desenvolvimento das lesões ocasionadas por *Fusarium* sp., em cladódios de palma-forrageira, como pode ser observado no Gráfico 1. A temperatura de 22°C proporcionou as maiores lesões, diferindo significativamente das demais temperaturas avaliadas. A análise de regressão (Tabela 2) ajustou para uma equação linear $y = -0,0355x + 2,264$ como coeficiente de determinação 87,06%.

Tabela 2. Quadro da análise de regressão para o efeito da temperatura sobre a severidade das machas de cladódios ocasionada pela fusariose.

FONTE DE VARIACÃO	DE GL	SQ	QM	F
REG. LINEAR	1	0.49562	0.49562	133.5892 *
REG. QUADRÁTICA	1	0.00098	0.00098	0.2642 ns
TRATAMENTOS	3	0.56842	0.18947	51.0710 --
RESÍDUO	16	0.05936	0.00371	
TOTAL	19	0.62778		
CV (%)	4,79			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$), ns não significativo ($p \geq .05$). Fonte: MOREIRA, 2015.

Figura 6. Efeito da temperatura (22, 26, 30 e 34 °C) sobre o tamanho médio das lesões causadas por *C. gloeosporioides* e *Fusarium* sp.



Fonte: MOREIRA, 2015.

Segundo Doohan et al. (2003) temperatura e luz são fatores que influenciam a reprodução do *Fusarium*. Agrios (2004) relata que alguns fungos, como, por exemplo, o *Fusarium* sp., crescem mais rápido em temperaturas que variam de 18 – 30/°C, isso pode ser comprovado nesse estudo, onde a temperatura de 22°C mostrou o maior desenvolvimento do patógeno (Figura 6).

De acordo com Nobel (1995) as temperaturas diurna/noturna do semiárido

Pernambucano variam de 25 a 15/0C, o que abrange afaixa ótima para as manchas dos cladódios da palma-forrageira, conforme abordado nesse trabalho.

4.4 Efeito de periodo de permanencia em câmara úmida na severidade das manchas dos cladódios da palma-forrageira

Com relação ao periodo de tempo em câmara umidade houve comportamentos diferentes de acordo com o patógeno considerado. Para *C. gloeosporioides* as maiores severidades foram observadas com os maiores períodos de permanência da câmara úmida, ou seja, 48 e 60h, como pode ser observado no Gráfico 2, com a análise de regressão (Tabela 3) significativamente ajustada para a equação linear $y = 0,0066x + 0,8393$ com o coeficiente de determinação 78,83%.

Tabela 3. Quadro da análise de regressão para o período de permanência em câmara úmida para antracnose.

FONTE DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
REG. LINEAR	1	0.31363	0.31363	32.5750 *
REG. QUADRÁTICA	1	0.02881	0.02881	2.9919 ns
TRATAMENTOS	4	0.39666	0.09917	10.2998 --
RESÍDUO	20	0.19256	0.00963	
TOTAL	24	0.58922		
CV (%)	9,13			

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$), ns não significativo ($p \geq .05$). Fonte: MOREIRA, 2015.

Enquanto que para a mancha dos cladódios ocasionada por *Fusarium* sp. os períodos de permanência na câmara úmida utilizados não interferiram na severidade da doença (Gráfico 2). A análise de regressão (Tabela 4) foi ajustada para a fórmula $y = 0,0149x + 1,8557$ apresentando um coeficiente de determinação 86,62%.

Tabela 4. Quadro da análise de regressão para o período de permanência em câmara úmida para fusariose.

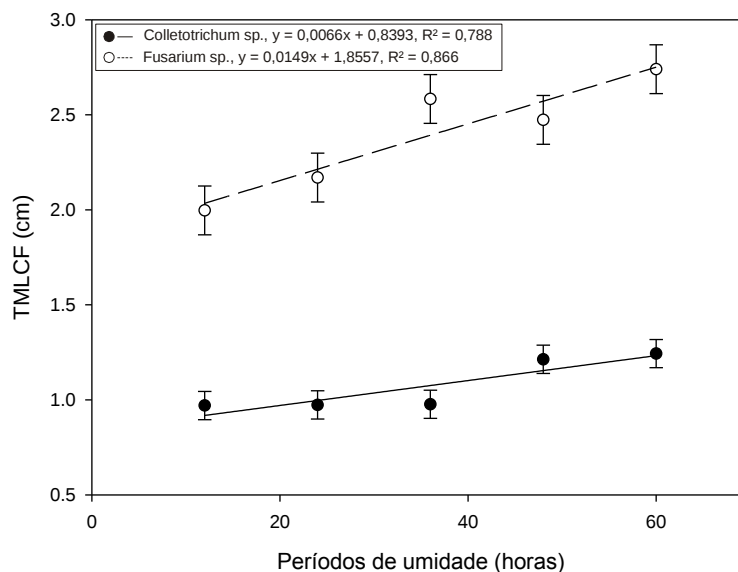
FONTE DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	F
REG. LINEAR	1	1,59847	1,59857	10.3949 *
REG. QUADRÁTICA	1	0,03937	0.03937	0.2560 ns
TRATAMENTOS	4	1.84222	0.46056	2.9950 --
RESÍDUO	20	3.07548	0.15377	
TOTAL	24	4.91770		
CV (%)	16,39			

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$), ns não significativo ($p \geq .05$). Fonte: MOREIRA, 2015.

Contudo, ao se comparar as severidades das doenças constata-se que as lesões ocasionadas por *Fusarium* sp. Foram mais extensas que aquelas ocasionadas por *C. gloeosporioides* independentemente do período de permanência na câmara úmida.

Gráfico 2. Efeito de períodos de permanência em câmara úmida sobre o tamanho médio das lesões causadas por *C. gloeosporioides* e *Fusarium* sp.

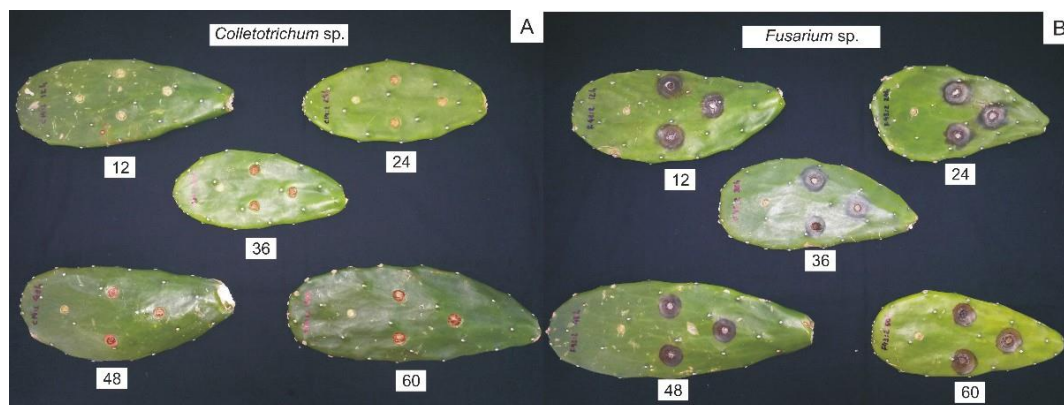
Tamanho médio das lesões (TML, em cm) ocasionadas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp.



Como pode ser observado na (Figura 7), o tamanho médio das lesões dos cladódios foi crescente para ambos os patógenos à medida que o período de permanência na câmara úmida aumentou.

Figura 7. Efeito de períodos de permanência em câmara úmida sobre o tamanho médio das lesões causadas por *C. gloesporioides* e *Fusarium sp.* Em cladódios de palma-forrageira.

A raquetes inoculadas com *Colletotrichum gloesporioides* e B raquetes inoculadas com *Fusarium sp.* 12, 24, 36, 48 e 60 (tempo em horas)



Fonte: MOREIRA, 2015.

Esses resultados corroboram com o relato de Silva et. al. (2001) onde a umidade em termos de quantidade e duração, é essencial no processo infeccioso para vários fitopatógenos, inclusive *Colletotrichum sp.* e *Fusarium sp.*

Agrios (1997) descreve que o teor de umidade do ambiente é outro fator considerado indispensável para germinação de esporos da maioria dos fungos, além de influenciar na penetração do tubo germinativo, a umidade pode aumentar a suscetibilidade a certos patógenos afetando a incidência e severidade das doenças.

4.5 Resposta de cultivares de palma-forrageira miúda (*Nopalea cochenillifera*) às manchas dos cladódios ocasionadas por *Colletotrichum gloesporioides* e *Fusarium* sp.

O quadro de análise de variância (TABELA 5 e 6), demonstrou que houve diferença significativa entre as variedades avaliadas em relação ao tamanho médio das lesões causadas por *C. gloesporioides* e *Fusarium* sp. pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade aos sete dias após a inoculação.

Tabela 5. Quadro de análise de variância da resposta de cultivares de palma-forrageira miúda a *C. gloesporioides* aos 7 dias após inoculação (DAI).

FONTE VARIAÇÃO	DE	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS		4	0.30866	0.07716	6.3135 *
RESÍDUO		20	0.24444	0.01222	
TOTAL		24	0.55310		
CV (%)		8,70			

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$).

Tabela 6. Quadro de análise de variância da resposta de cultivares de palma-forrageira miúda a *Fusarium* sp. aos 7 dias após inoculação (DAI).

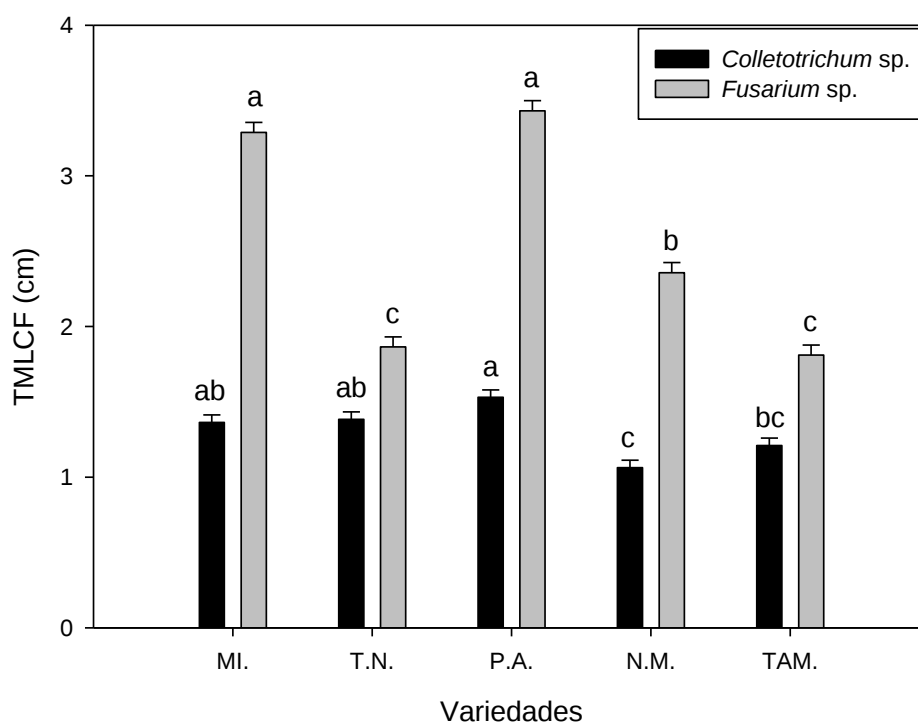
FONTE VARIAÇÃO	DE	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS		4	11.90194	2.97549	131.4725 *
RESÍDUO		20	0.45264	0.02263	
TOTAL		24	12.35458		
CV (%)		5,90			

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$), ns não significativo ($p \geq .05$). Fonte: MOREIRA, 2015.

As cultivar Negro Michoacan e Tamazunchale mostraram uma maior resistência a *C.gloesporioides*, diferindo das cultivar Palma-forrageira miúda, Texas Nopalera e Alagoas, que mostram menor resistência e não diferiram entre si (Gráfico 3, Figura 8).

Gráfico 3. Resposta de cultivares de palma-forrageira miúda à mancha dos cladódios causadas por *Colletotrichum gloesporioides* e *Fusarium* sp.

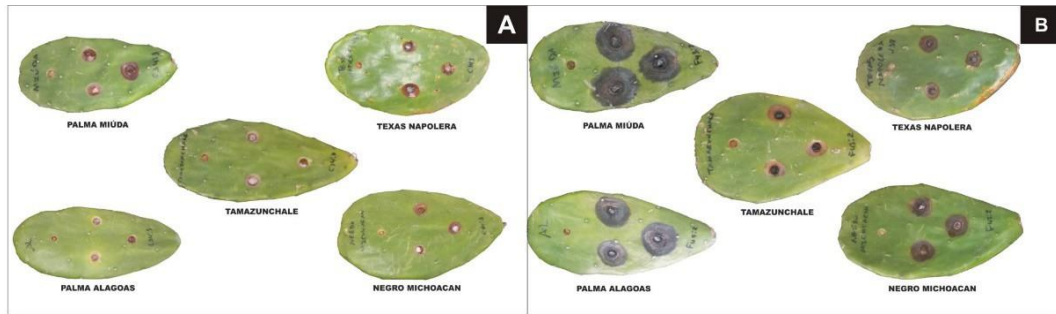
Variedades: MI – Miúda; T.N. – Texas nopalera; P.A. – Palma- alagoas; N.M. – Negro michoacan e TAM – Tamazunchal. TML CF – Tamanho médio das lesões (em cm) ocasionadas por *C. gloesporioides* e *Fusarium* sp.



Nopalera e Tamazunchale mostraram-se maior resistência a *Fusarium* sp., diferindo das cultivares Palma-forrageira Miúda, Negro Michoacan e Palma - Alagoas, que mostraram-se mais susceptíveis ao patógeno (Gráfico 3, Figura 8).

FIGURA 8. Comportamento de cultivar e palma-forrageira a *C.gloesporioides* e *Fusarium* sp.

A – Raquetes inoculadas com *C. gloesporioides* e **B** – raquetes inoculadas com *Fusarium* sp.



Fonte: MOREIRA, 2015.

Durante o levantamento bibliográfico realizado não se encontrou qualquer referência sobre a resposta de diferentes cultivares de palma-forrageira em relação às doenças, sendo esse, provavelmente, o primeiro estudo abordando esse tema. O fato de terem sido constatadas diferenças nas reações das cultivares em relação a ambas as doenças e cultivares com lesões significativamente menores abre as perspectivas de que essas variedades, sobretudo Negro Michoacan, Texas Nopalera e Tamazunchale, por mostraram boa resposta às duas doenças, possam ser mais plantadas no semiárido nordestino. Evidentemente um número maior de genótipos deve ser avaliado em busca de cultivares ainda mais promissoras e que aliem não só resistência às manchas dos cladódios, mas outras características agronômicas interessantes.

CONCLUSÕES

O isolado C14 pertence ao gênero *Colletotrichum*, e provavelmente dentro do complexo gloesporioides e o isolado F43 pertence ao gênero *Fusarium*.

A temperatura que apresentou maior severidade para *C. gloesporioides* e *Fusarium* sp foi a de 22°C. Para

C. gloesporioides os maiores severidades foram observadas com os maiores períodos de permanência da câmara úmida (48 e 60h). No caso de *Fusarium* sp. os períodos de permanência na câmara umidade não interferiram na severidade das manchas.

As variedades Negro Michoacan e Tamazunchale para *C. gloesporioides* e Texas nopalera e Tamazunchale para *Fusarium* sp. apresentaram as menores severidades.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S. FERREIRA, J. B. MARTINS, F. G. **Mancha manteigosa no contexto do complexo *Colletotrichum* em cafeeiros**. In: SIMPÓSIO DE MANEJO DE PLANTAS: MANEJO FITOSANITÁRIO DO CAFEIERO, 8, 2008.
- AGRIOS, G. N. Control of plant diseases. In: AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, p. 171-221, 1997.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4 ed. San Diego. Academic Press. 1997.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Califórnia: Elsevier Academic Press. 5. ed, p. 952, 2005.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**, 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, p. 1463 2004..
- ARINZE, A.E. Post - harvest diseases of tomato fruits in Southern Nigeria.
- BAAYEN, R. P. et al. Nonpathogenic Strains of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *Guignardia mangiferae*, *Phyllosticta capitalensis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 464-477, 2002.
- BAHIA AGRÍCOLA, v. 7, n. 3, p. 39-49, 2006.
- BAILEY, J.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, p. 388 1992.
- BENNA, A. **As cactáceas forrageiras nas terras secas do Nordeste**. Brasil Agrícola, v. 2 n. 6, p. 173-176, 1991.
- BONANTS, P. J. M. et al. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 109, p. 503-513, 2003.
- BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; et al. **Laboratory manual for Fusarium research, Sydney; University of Sydney**, 1994.
- CHIACCHIO, F. P. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. dos. Palma-forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology** v. 73, p. 37– 113.
- DAMM U, CANNON PF, WOUDEMBERG JHC, CROUS PW (2012). The
- DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology
- DHINGRA, O. D; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 1995

DIAS, M. D.; POZZA, E. A.; ABREU, M. S.; OROSCO-MIRANDA, E.; DOOHAN, F. M.; BRENNAN, J.; COOKE, B. M. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 109, p. 755-768, 2003.

Fitopatologia Brasileira v.11, p. 637-645, 1986.

Lavras. Anais...Lavras: UFLA, 2008. P. 105-126. AGRIOS, G. N.; **Plant Pathology**, Ed. 5, London, 2004.

Manejo integrado da cochonilha-da-palma-forrageira-, *Diaspis echinocacti* (Bouché, 1833 (Hemiptera: Diaspididae). **Ciência Agrícola** (UFAL),v.9, p.127-133, 2008.

Molecular Plant Pathology, London, v. 13, p. 414 – 430, 2012.

Temperatura no cresciment micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. Isolados de *Coffea arabica* L. **Ciênc.agrotec.**,Lavras,v. 29, n. 3, p. 545-552.2005.

FABRICANTES, J. R; FEITOSA, S. DOS S. et al Flora nordestina: Palma-Forrageira.Disponívelem

<<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=430>> Acesso em 20 de Nov.2014.

FARIAS, I, et al. Manejo de colheita e espaçamento da palma-forrageira-,em consórcio com sorgo granífero, no agreste de Pernambuco. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.35, n.2,2000.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª Ed. Brasília: Embrapa - CENARGEN, p. 220, 1998.

FRAVEL, D.; OLIVIAN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist**, v. 157, p. 493-502, 2003.

FREIRE, F, DAS CHAGAS, O. **Patógenos Associados ao Mandacaru (*Cereus jamaru* Dc.) no Estado do Ceará**.Comunicado Técnico online, Embrapa - Fortaleza, 2009. Disponível em

<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/697423/1/cot148.pdf>>Acesso: 17 de set2014.

GRANATA, G; SIDOTI, A. Survey of diseases discovered on *Opuntia ficus-indica* in producer countries. Proceedings of the Fourth International Congress on cactus pear and Cochineal. **Acta Horticulturae** v.51, p. 231-237, 2000.

Hadden, J. F.; Black, L. L. **Antracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp.** Tomato and pepper production in theTropics.Taiwan: AVRDC, p.189-199. 1989.

HERNÁNDEZ, P. T. et al. Biochemical and nutritional characterization of three prickly pear species with different ripening behavior.**Plant Foods Hum. Nutr.** v,60, p.195–200. 2005.

HYDE, K. D; et al. *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity*, v,39, p.147 – 183.2009.

INDEX FUNGORUM, banco de dados para consulta de táxons fúngicos. Disponível em www.indexfungorum.org, acessado em dezembro de 2011.

IVEY, M. L. L.; NAVA-DIAZ, C.; MILLER, S. A. et al. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. **Plant Disease, Wooster**, v. 88, n. 11, p. 1198-1204, 2004.

KENAGA, C. B. **Principles of phytopathology**. 2nd Ed., Balt Publishers, Indiana.1974.

KHACHATOURIANS, G. G. Production and use of biological pest control agents. **Trends in Biothechnology**, Cambridge, v.4, p.120-124, 1986.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B.A. The Fusarium laboratory manual. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. p. 388, 2006.

LIMA, G. S. A; ASSUNÇÃO, I. P.; MICHEREFF, S. J. Development and

Validation of a standard area diagram set for assesement of *Alternaria Spot* on cladodes of the prickly pear cactus. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p.691- 695, 2011.

LIMA, N. B. Etiologia e epidemiologia das espécies de *Colletotrichum* relacionadas com a antracnose em frutos de mangueira no Nordeste brasileiro. 2013 70f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE. 2013.

MENEZES, M.; **ASPECTOS BIOLÓGICOS E TAXONÔMICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Colletotrichum***. Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, Pernambuco, vol. 3, p.170-179 2006.

MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. ed. 2ª, Recife. UFRPE. p. 183, 2004.

NELSON, R.R. **Interspecific hybridization in the fungi**. *Mycologia* v.5, p.104 – 123, 1963.

NOBEL, P. S. Environmental biology. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA-BARROS E.; Agro-ecology, cultivation and uses of cactuspear. Rome: FAO, p.36-48, 1995.

O'CONNELL, R. J; BAILEY, J. A; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* infected by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v.27, p.75-98, 1985.

PHOULIVONG, S. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. *Current Research in Environmental e Applied Mycology*, v.1, p.53-73.2011.

PANDEY, A. K.; REDDY, M. S.; SURYANARAYANAN, T. S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.439-444, 2003.

PIANZZOL, M. J.; MOSCATELLI, M.; VERO, S. Characterization of *penicillium* isolates associated with blue mold on Apple in Uruguay. **Plant Disease**, v.88, p.23-38, 2004.

Portal patologia de sementes disponivel em:

<<http://faem.ufpel.edu.br/dfs/patologiasementes/cgi-bin/sementes/detalhes.cgi/pa>> Acesso novembro 2011.

PUTZKE, J; LOPES, M. T. **Os Reinos dos Fungos**. 2. ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc, p. 491 2002.

QUEZADA-SALINAS, A. et al. Etiología de lamancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. **Agrociencia**, v.40, n.5, p.641-653, 2006.

ROBERTS. P. D; PERNEZNY. K. L; KUCHARSK. T. A. **Anthracoze on Pepper in Florida**. Departamento de Fitopatologia da Florida. Disponível em<<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/PP/PP10400.pdf>> Acesso 20 de Nov 2014.

RODRIGUES, R. F. O.; OLIVEIRA F ; FONSECA, A. M. As folhas de Palma-forrageira Christi – *Ricinus communis* L. Euphorbiaceae Jussieu. Revisão de conhecimentos, **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v.20, n.2, p.183-194, 2002.

SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.33, p.37-67, 1995.

SANTOS, D. et al. A. Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivar de palma-forrageira (*Opuntia e Nopalea*). **Rev. Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 1, 2001.

SANTOS, D. C. et al. **Manejo utilização da palma-forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco**. Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco, p.48, 2006.

SANTOS, M. et al. Estudo comparativo das cultivar de palma-forrageira gigante, redonda (*Opuntia ficus indica* Mill) e miúda (*Nopalia cochonillifera* Salm Dyck) na produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.19, n.6, p.504-511, 1990.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; FERRAZ, G. M. G.; MONTARROYOS, A.V.V. e SILVA, D. S. Diversidade fenotípica e patogênica d *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.37, p.42-51, 2011.

SILVA, C. C. F. da SANTOS, L. C. Palma-forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**®, ISSN 1695-7504, v. VII, n. 10, 2006.

SILVA, D. S.; ANDRADE, A. P.; LEITE, M. L. M. XIMENES, L. J. F.; MARTINS, G. A.; MORAIS, O. R. et al. Palma - forrageira e sustentabilidade do semiárido brasileiro. In: (Orgs.) Ciência e tecnologia na pecuária de caprinose ovinos. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, BNB **Ciência e Tecnologia**, n.5, p.71-103, 2010.

SILVA, S. R.; RIOS, G.P.; SILVA, S. C. Influência da resistência e do período de molhamento na infecção e desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.4, p.726-731, 2001.

STRINGARI, D.; GLIENKE, C.; FIGURA, G. Variabilidade genética e morfológica de isolados do fungo *Guignardia* spp. procedentes de diversas regiões e hospedeiros. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, **Anais...** Gramado, v.24, p.218, 2004.

SOARES-COLLETTI, A. R.; LOURENÇO, S. A.; Efeito da temperatura, molhamento e cultivar sobre o desenvolvimento da antracnose em goiaba. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.40, n.4 p.307-312, 2014.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.) **Colletotrichum – Biology, Pathology, and Control**. Wallingford: CAB International. p.1-26, 1992.

TOZZE JÚNIOR, H. J; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

UNBEN, A. F.; MENDES, M. A. S.; VENTURA, J. A.; PAZLIMA, M. L. **Curso Taxonomia de Fusarium**, Embrapa, Brasília-DF, 2009.

VARVARO, L.; FANIGLIULO, R.; BABELEGOTO, N. L., Transmission electron microscopy of susceptible and resistant tomato leaves following infection with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Journal of Phytopathology**. v.138, p.265-273, 1993.

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: A study on two extreme cases. **Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology**, Uppsala, v.917, p.72, 2004. Disponível em: <http://publications.uu.se/uu/fulltext/nbn_se_uu_diva-3902.pdf>.

WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In BAILEY, J.A.; JEGGER, M. J. Ed **Colletotrichum: biology, pathology and control** england. Wallingford: CAB International, p.167 –185, 1992.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. PCR Protocols: a guide to methods and applications. **New York: Academic**, p.315-322, 1990.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, v.18, p.6531–6535.1990.