

GABRIELA CAROLINA GUIMARÃES ANDRADE

***Quambalaria eucalypti*: CARACTERÍSTICAS CULTURAIS, INFECTIVIDADE E
QUANTIFICAÇÃO DA SEVERIDADE DA DOENÇA EM EUCALIPTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

GABRIELA CAROLINA GUIMARÃES ANDRADE

***Quambalaria eucalypti*: CARACTERÍSTICAS CULTURAIS, INFECTIVIDADE E
QUANTIFICAÇÃO DA SEVERIDADE DA DOENÇA EM EUCALIPTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2004

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Conselheiro)

Prof. Robert Weingart Barreto
(Conselheiro)

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

Dra. Sandra Kunieda de Alonso

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

***“TUDO VALE A PENA,
SE A ALMA NÃO É PEQUENA”.***

Fernando Pessoa

Aos meus pais Nirlei e Cidinha.

Aos meus avós Ernani e Maria.

Aos meus irmãos Dani e Juninho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e pelo suporte para realização do curso de Mestrado.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pelos ensinamentos transmitidos, inúmeros conselhos e grande amizade.

Aos professores Luiz Antônio Maffia e Robert W. Barreto pelas sugestões e críticas.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende pelo constante apoio.

Ao Tales pelo amor, compreensão e paciência em todos os momentos.

Às minhas queridas irmãszinhas Bianca e Dani, pela amizade e pelo exemplo de dedicação durante toda a nossa convivência e também à nossa querida Elídia que sempre esteve presente.

À Márcia, que além da amizade nunca mediu esforços para nos ajudar.

Aos amigos Reginaldo, Edival e Sandra, pelo convívio, amizade e grande ajuda nesta jornada.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial, ao Renildo, Luiz, Eneir, Alex e Denis, pela convivência e grande disposição para nos ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Florestal Kida, Michelle, Taly, Lili, Íris, Dani, Diogo, Rodrigo, Juliana, Leandro, Mário, Aderlan, Edgard, Jeane, Rafael e Ricardo, pela amizade, convívio e grande colaboração.

Ao Riva e ao Miguel, pelas sugestões e idéias.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos valiosos ensinamentos à minha formação.

A todos os colegas da turma de mestrado, pela convivência e amizade.

À Tia Vera e ao Tio Norberto, pelo apoio e pela amizade durante toda a minha passagem por Viçosa.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse concluído com êxito.

BIOGRAFIA

GABRIELA CAROLINA GUIMARÃES ANDRADE, filha de Nirlei Vilela de Andrade Junqueira e Maria Aparecida Guimarães Andrade, nasceu em Lavras, Minas Gerais, em 21 de setembro de 1978.

Em julho de 2001, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais.

Em abril de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nível de Mestrado, na área de Patologia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Prof. Acelino Couto Alfenas.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| Resumo..... | vii |
| Abstract..... | ix |
| Introdução Geral..... | 01 |
| Referências Bibliográficas..... | 03 |
| Artigo 1. Características culturais e infectividade de <i>Quambalaria eucalypti</i> sob diferentes regimes de temperatura, luz e período de molhamento foliar..... | 05 |
| 1.1. Resumo..... | 06 |
| 1.2. Abstract..... | 07 |
| 1.3. Introdução..... | 08 |
| 1.4. Material e Métodos..... | 09 |
| 1.5. Resultados..... | 12 |
| 1.6. Discussão..... | 14 |
| 1.7. Referências Bibliográficas..... | 22 |
| Artigo 2. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por <i>Quambalaria eucalypti</i> | 24 |
| 1.1. Resumo..... | 25 |
| 1.2. Abstract..... | 26 |
| 1.3. Introdução..... | 27 |
| 1.4. Material e Métodos..... | 29 |
| 1.5. Resultados..... | 31 |
| 1.6. Discussão..... | 33 |
| 1.7. Referências Bibliográficas..... | 43 |
| Conclusões Gerais..... | 47 |

RESUMO

ANDRADE, Gabriela Carolina Guimarães, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. ***Quambalaria eucalypti*: Características culturais, infectividade e quantificação da severidade da doença em eucalipto.** Orientador: Acelino Couto Alfenas. Conselheiros: Luiz Antônio Maffia e Robert W. Barreto.

Quambalaria eucalypti foi recentemente relatado como agente etiológico da mancha foliar e do anelamento da haste de *Eucalyptus* spp., no Brasil. Em vista do pouco conhecimento disponível sobre este patossistema, procurou-se, neste trabalho, avaliar o crescimento micelial e a esporulação do fungo em diferentes meios de cultura, determinar “in vitro” a temperatura ótima para o crescimento micelial, esporulação e a germinação de conídios, avaliar a influência do regime de luz sobre a germinação de conídios e determinar a influência do binômio temperatura – tempo de câmara úmida foliar sobre a infecção. As temperaturas de 25, 13 e 37 °C foram respectivamente, ótima, mínima e máxima, para o crescimento. A interação entre meios de cultura e isolados foi significativa, sendo que os meios de batata-dextrose-ágar (BDA), V8-ágar (V8) e caldo de vegetais-ágar foram os mais favoráveis ao crescimento micelial, seguidos de caseína hidrolizada ágar e ágar água. Todavia, para a esporulação, a interação entre meios de cultura e isolados não foi significativa e o meio de BDA foi o mais favorável à esporulação do patógeno. A temperatura e a luz não afetaram significativamente a germinação de conídios. A interação entre temperatura e tempo de permanência em câmara úmida não foi significativa. O modelo quadrático foi o que melhor representou a severidade em função da temperatura, com ponto ótimo estimado igual a 27 °C. O modelo exponencial foi o que melhor representou a severidade em função do tempo de câmara úmida. Subseqüentemente, elaborou-se uma escala diagramática contendo oito níveis de severidade (0,4; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 49%) para

quantificação da doença. Na sua validação, quatro avaliadores inexperientes e quatro experientes avaliaram folhas com diferentes níveis de severidade, inicialmente sem o uso da escala e posteriormente com o seu uso, sendo as estimativas comparadas quanto à acurácia e precisão. Com a utilização da escala, os avaliadores apresentaram melhores níveis de precisão e acurácia. Da mesma forma, após o treinamento, os níveis também foram melhorados, principalmente para os avaliadores inexperientes. Erros na quantificação da severidade da doença ocorreram com maior frequência entre 15 e 30% de severidade, independentemente da experiência dos avaliadores.

ABSTRACT

ANDRADE, Gabriela Carolina Guimarães, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2004. ***Quambalaria eucalypti*: Cultural characteristics, infectivity and quantification of disease severity on eucalyptus.** Adviser: Acelino Couto Alfenas. Committee members: Luiz Antônio Maffia and Robert W. Barreto.

Quambalaria eucalypti was recently reported as the causal agent of leaf spot and stem curl in *Eucalyptus* spp. in Brazil. Given the scarcity of knowledge available on this pathosystem our objectives were to evaluate the “in vitro” mycelial growth and sporulation of this fungus in different culture media, determine the optimum temperature of mycelial growth, sporulation and conidial germination, evaluate the influence of the lighting regime on conidial germination and determine the combined influence of time and temperature in a moisture chamber on infection. Temperatures of 25, 13 and 37 °C were found to be the optimum, minimum and maximum for growth, respectively. The interaction between growth medium and isolates was significant and potato dextrose-agar (PDA), V8-agar (V8) and vegetable broth-agar produced the most mycelial growth, followed by hydrolyzed casein-agar and water-agar. On the other hand, the interaction between culture medium and isolates was not significant for sporulation, though PDA appeared to favor spore production by this pathogen. Temperature and light did not significantly affect conidial germination. The interaction between temperature and time of exposition in a moisture chamber was not significant. Quadratic model best represented disease severity as a function the temperature, with estimateted optimum 27 °C. Exponential model best represented disease severity as a function of moisture chamber. Subsequently, diagrammatic scale, containing eight levels of severity (0.4; 1; 2; 4; 8; 16; 32 and 49%), was also developed for disease quantification. For the scale validation four unexperienced and four experts appraisers

scored leaves with different levels of severity, initially without the use of the scale and later on with its use. The estimates were compared for accuracy and precision. Using of the scale the appraisers were able to get better levels of precision and accuracy. After the training, the levels of precision and accuracy were also increased, mainly for the unexperienced appraisers. The greatest errors in the disease evaluations were observed between the levels 15 and 30% of severity.

INTRODUÇÃO GERAL

O *Eucalyptus*, originário da Austrália e ilhas vizinhas e, atualmente, a espécie florestal mais plantada no mundo, sendo o Brasil detentor da segunda maior área reflorestada com espécies deste gênero (FAO, 2000), especialmente com clones-élite resistentes a doenças e de elevada produtividade (Alfenas *et al.*, 2004). Com o avanço das técnicas de clonagem, na produção de mudas tem prevalecido o uso da técnica de miniestaquia (Alfenas *et al.*, 2004; Assis, 1992, 1996 e 2001). Dependendo das condições de manejo e da época do ano, tem-se registrado o aparecimento de algumas doenças seja na fase de produção de brotos, em minijardim clonal, ou de enraizamento de miniestacas em casa de vegetação sob nevoeiro intermitente (Alfenas *et al.*, 1999). Dentre esses, a mancha foliar de eucalipto e o anelamento da haste incitados por *Quambalaria eucalypti* (Wingfield, Crous & Swart) Simpson tem-se destacado como uma das mais severas para alguns materiais genéticos em determinadas regiões. A doença foi constatada no Brasil, pela primeira vez em 2000, na região de Barra do Ribeiro – RS e atribuída a *Sporothrix eucalypti* Wingfield, Crous & Swart (Alfenas *et al.*, 2001), com base nas características do fungo e na descrição de uma doença similar na África do Sul em 1993 (Wingfield *et al.*, 1993). Esta doença caracteriza-se eficiente pela abundante esporulação de coloração esbranquiçada sobre as lesões na face abaxial das folhas, nas inserções de ramos e nos cortes após a coleta de brotações para miniestaquia. A grande massa de esporos secos produzida é facilmente disseminada do patógeno pelo vento, por insetos ou pelo próprio homem no campo, em minijardins clonais tradicionais ou que disponham de corrente de ar forçado. Na maioria das vezes os órgãos afetados tornam-se retorcidos e as áreas necróticas escuras recobertas com pústula esbranquiçada. Quando cultivado em meio MEA (Malt Extract Agar) a 25 °C, suas colônias apresentam aspecto cotonoso ou aveludado com até um mm de altura, coloração branca, esporulantes, odor característico e ausência de exsudação. As hifas

aéreas são hialinas, lisas, livremente agregadas, irregulares com um a dois μm de largura com células conidiogênicas de forma e tamanho variáveis, normalmente uniformes ou com o ápice inflado, raramente afilado (Wingfield *et al.*, 1993). Os conídios produzidos em células conidiogênicas denticuladas, hialinas e diferenciadas da hifa vegetativa são hialinos, unicelulares, sendo primários (5-10 x 2,5-5 μm) e secundários (2,5-5 x 1-2,5 μm) em BDA (Batata-Dextrose-Ágar) (Alfenas *et al.*, 2001; Alfenas *et al.*, 2004). Atualmente, a doença encontra-se disseminada nas principais regiões eucaliptocultoras do país, podendo causar perdas significativas na produção de mudas clonais de eucalipto (Alfenas *et al.*, 2004). Para que se obter resultados confiáveis e precisos de controle, métodos de quantificação da doença precisam ser desenvolvidos. Uma análise criteriosa dos objetivos define os critérios para se escolher o método de avaliação da doença, o qual varia com o agente etiológico e a distribuição espacial da doença (Gaunt, 1995). No caso de doenças foliares, a determinação da severidade, expressa pela proporção de área foliar lesionada, é a variável mais utilizada, sendo normalmente avaliada subjetivamente por meio de análise visual e, por conseguinte, escalas diagramáticas tornaram-se ferramentas fundamentais para estes estudos (Godoy *et al.*, 1997).

Com o intuito de se aprimorar os conhecimentos a cerca do patossistema *Q. eucalypti* x eucalipto, este trabalho objetivou estudar a influência da temperatura, luz, umidade e de meios de cultura em algumas fases do desenvolvimento do fungo, além da elaboração de uma escala diagramática para avaliação da doença.

Esta tese encontra-se dividida em duas partes: na primeira (Artigo 1) estudou-se as características culturais e de infectividade do fungo e na segunda (Artigo 2) desenvolveu-se uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., SANFUENTES, E., TEIXEIRA, D.A., MILANI, D.M. Mofocinzeno, causado por *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries em estacas e microestacas de *Eucalyptus* sp., resistência a benomyl e erradicação de inóculo do patógeno com água quente. Revista *Árvore*, v.23, p.497-500. 1999.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., ROSA, O.P.P., ASSIS, T. F. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, p.221. 2001.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V, MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa: Editora UFV. 2004. 442p.
- ASSIS, T.F. Evolution of technology for cloning *Eucalyptus* in large scale. In: Simpósio Internacional IUFRO, 2001, Valdivia/Chile. Anais... (CD Room). 16p. 2001.
- ASSIS, T.F. Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. In: Congresso Florestal Estadual , 7, 1992, Nova Prata. Anais... Santa Maria: UFSM, p.824. 1992.
- ASSIS, T.F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: Conferência IUFRO sobre Silvicultura e Melhoramento de Eucaliptos. 1997, Salvador, Proceedings... Colombo: EMBRAPA/CNPQ 1:300-304. 1996.
- FAO. Global forest resources assessment 2000 – Main report. FAO Forestry paper. ISSN 0258-6150, 2000. 479p. Disponível em www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp.
- GAUNT, R.E. The relationship between plant disease and severity and yield. *Annual Review of Phytopathology*, v.33, p.119-144. 1995.
- GODOY, C.V., CARNEIRO, S.M.T.P., IAMAUTI, M.T., PRIA, M.D., AMORIM, L., BERGER, R.D., BERGAMIM FILHO, A. Diagrammatic scales for bean diseases: Development and validation. *Journal of Plant Disease and Protection*, v.104, p.336-345. 1997.

WINGFIELD, M.J., CROUS, P.W., WIJNAND, J.S. *Sporothrix eucalypti* (sp. nov.), a shoot and leaf pathogen of eucalyptus in South Africa. *Mycopathologia*, v.123, p.159-164. 1993.

Características Culturais e Infectividade de *Quambalaria eucalypti* Sob Diferentes Regimes de Temperatura, Luz e Período de Molhamento Foliar*

Gabriela C.G. Andrade, Acelino C. Alfenas, Reginaldo G. Mafia, Edival Â.V.

Zauza, Michelle M.F. Couto & Luiz A. Maffia

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000,

Viçosa – MG. E-mail: aalfenas@ufv.br

(Aceito para publicação em 00/00/2005)

Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas

ANDRADE, G.C.G., ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., ZAUZA, E.Â.V., COUTO, M. M.F. & MAFFIA, L.A. Características culturais e infectividade de *Quambalaria eucalypti* sob diferentes regimes de temperatura, luz e período de molhamento foliar. Fitopatologia Brasileira.

RESUMO

Quambalaria eucalypti foi recentemente relatado como agente etiológico da mancha foliar e do anelamento da haste de *Eucalyptus* spp., no Brasil. Em vista do pouco conhecimento disponível sobre este patossistema, procurou-se, neste trabalho, avaliar o crescimento micelial e a esporulação do fungo em diferentes meios de cultura, determinar “in vitro” a temperatura ótima para o crescimento micelial, esporulação e a germinação de conídios, avaliar a influência do regime de luz sobre a germinação de conídios e determinar a influência do binômio temperatura – tempo de câmara úmida foliar sobre a infecção. As temperaturas de 25, 13 e 37 °C foram respectivamente, ótima, mínima e máxima, para o crescimento. A interação entre meios de cultura e isolados foi significativa, sendo que os meios de batata-dextrose-ágar (BDA), V8-ágar (V8) e caldo de vegetais-ágar foram os mais favoráveis ao crescimento micelial, seguidos de caseína hidrolizada ágar e ágar água. Todavia, para a esporulação, a interação entre meios de cultura e isolados não foi significativa e o meio de BDA foi o mais favorável à esporulação do patógeno. A temperatura e a luz não afetaram significativamente a germinação de conídios. A interação entre temperatura e tempo de permanência em câmara úmida não foi significativa. O modelo quadrático foi o que melhor representou a severidade em função da temperatura, com ponto ótimo estimado igual a 27 °C. O modelo exponencial foi o que melhor representou a severidade em função do tempo de câmara úmida.

Palavras-chave adicionais: *Quambalaria eucalypti*, *Eucalyptus*, temperatura, luz, molhamento foliar.

ABSTRACT

Cultural characteristics and infectivity of *Quambalaria eucalypti* under different temperature, light and leaf wetness duration

Quambalaria eucalypti was recently reported as the causal agent of leaf spot and stem curl in *Eucalyptus* spp. in Brazil. Given the scarcity of knowledge available on this pathosystem our objectives were to evaluate the “in vitro” mycelial growth and sporulation of this fungus in different culture media, determine the optimum temperature of mycelial growth, sporulation and conidial germination, evaluate the influence of the lighting regime on conidial germination and determine the combined influence of time and temperature in a moisture chamber on infection. Temperatures of 25, 13 and 37 °C were found to be the optimum, minimum and maximum for growth, respectively. The interaction between growth medium and isolates was significant and potato dextrose-agar (PDA), V8-agar (V8) and vegetable broth-agar produced the most mycelial growth, followed by hydrolyzed casein-agar and water-agar. On the other hand, the interaction between culture medium and isolates was not significant for sporulation, though PDA appeared to favor spore production by this pathogen. Temperature and light did not significantly affect conidial germination. The interaction between temperature and time of exposition in a moisture chamber was not significant. Quadratic model best represented disease severity as a function the temperature, with estimateted optimum 27 °C. Exponential model best represented disease severity as a function of moisture chamber.

Additional Keywords: *Quambalaria eucalypti*, *Eucalyptus*, temperature, light, leaf wetness.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, *Quambalaria eucalypti* (Wingfield, Crous & Swart) Simpson (= *Sporothrix eucalypti* Wingfield, Crous & Swart) é um dos principais patógenos do eucalipto em viveiro. A enfermidade por ele incitada, recentemente relatada no Brasil (Alfenas *et al.*, 2001), caracteriza-se por manchas foliares e pelo anelamento da haste de mudas e de brotações de minicepas, o que pode reduzir conseqüentemente a produção de miniestacas para enraizamento. Sobre as lesões, de coloração marrom a marrom escuras, forma-se, na face abaxial, uma massa esbranquiçada de estruturas do fungo. A abundante esporulação seca o torna de fácil disseminação por vento (Alfenas *et al.*, 2004). No campo, além de manchas foliares, o fungo causa também cancro em materiais altamente suscetíveis, como *E. globulus* Labill., seus híbridos e espécies afins (Alfenas *et al.*, 2001). Há, contudo, ampla variabilidade genética intraespecífica, o que permite a seleção e a clonagem de genótipos-elite resistentes para plantio comercial.

Apesar da importância deste patógeno, pouco se conhece sobre os fatores ambientais que afetam a infecção em eucalipto. Para desenvolver estudos sobre este patossistema, há, contudo, necessidade de se efetuarem inoculações artificiais, o que requer a produção massal de inóculo do patógeno e a determinação prévia das condições favoráveis para o estabelecimento da doença.

O conhecimento das condições favoráveis à infecção é importante para o estabelecimento de medidas de controle, que visam, em última análise, desfavorecer o patógeno em quaisquer fases do estabelecimento da doença (Agrios, 1997). Os fatores do ambiente determinam a distribuição geográfica, a incidência e severidade da doença, sendo em muitos casos específicos para cada patógeno. Dentre esses fatores, a

temperatura é a mais freqüentemente correlacionada com epidemiologia da doença, seguida pela umidade e luz (Colhoun, 1973).

Em face de seu recente relato no Brasil e dos poucos conhecimentos sobre as características culturais e fatores do ambiente que afetam o estabelecimento de *Q. eucalypti* no hospedeiro, o presente trabalho objetivou determinar a influência do meio de cultura e da temperatura sobre o crescimento micelial e esporulação, bem como avaliar os principais fatores que afetam o estabelecimento da doença, a fim de embasar estudos epidemiológicos e de controle da enfermidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial e esporulação

Empregou-se o isolado S25 obtido de lesões de um clone híbrido de eucalipto (*Eucalyptus maidenii* F. Muell. x *E. urophylla* Blake). A partir da borda de colônias puras, crescidas em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por cinco dias, a 27 °C, e 12 h de fotoperíodo, retiraram-se discos de cultura de 10 mm de diâmetro, os quais foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. As placas foram mantidas a 7, 14, 21, 28, 35 ou 42 °C, sob fotoperíodo de 12 h (175 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$ fornecida por lâmpadas OSRAM[®] 20W) em câmara de germinação (FANEM[®], São Paulo, Mod. 347 CDG). O diâmetro das colônias nas diferentes temperaturas foi avaliado diariamente durante 10 dias, com o auxílio de uma régua milimétrica. Ao final deste período, a produção de esporos também foi determinada. Para isso, 10 ml de água destilada esterilizada foram adicionados em cada uma das

placas. A seguir, avaliou-se a concentração de esporos com o auxílio de um hemacitômetro. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e cada tratamento (temperatura) constituído de cinco repetições, sendo uma placa para cada repetição.

Crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura

Comparou-se o crescimento micelial radial de três isolados do fungo (S0, S8 e S25), nos seguintes meios: batata-dextrose-ágar (BDA), ágar-água (AA), V8-ágar (V8) (Dhingra & Sinclair, 1995), caldo de vegetais-ágar (CVA) Pereira *et al.* (2003) e caseína hidrolizada-ágar a 0,25% (CHA). Para tanto, um disco de cultura de 5 mm de diâmetro e com cinco dias de idade, foi transferido para o centro de uma placa de Petri, contendo 20 ml dos respectivos meios. As placas foram mantidas a 28 °C, sob 12 h de fotoperíodo (175 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$). Aos sete dias de incubação, mensurou-se o diâmetro das colônias nos diferentes meios, conforme descrito anteriormente. Após a mensuração, avaliou-se a esporulação em todos os meios de cultivo. Para isso, adicionaram-se 30 ml de água destilada e esterilizada em cada uma das placas obtendo-se uma suspensão de inóculo. Com auxílio de um hemacitômetro determinou-se o número de esporos/ml.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo uma placa para cada repetição.

Efeito da temperatura e do regime de luz sobre a germinação de conídios

Neste ensaio, empregaram-se alíquotas de 60 μl de uma suspensão aquosa a 10^5 conídios/ml, obtida a partir de uma cultura pura do fungo em meio V8-ágar, após cinco

dias de incubação a 27 °C sob 12 h de fotoperíodo ($175 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}$). A alíquota foi depositada em lâmina escavada, e mantida em câmara úmida, a 15, 18, 21, 24, 27 ou 30 °C e sob 12 h de fotoperíodo, conforme previamente descrito. Após 24 h, uma gota de lactofenol-azul de algodão foi depositada nas cavidades da lâmina para interromper a germinação dos conídios. A avaliação foi feita contando-se o número de esporos germinados em relação ao número total (200 esporos por cavidade da lâmina). O delineamento foi o inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de três repetições.

Alíquotas preparadas conforme descrito anteriormente foram mantidas a 28 °C sob os regimes de luz/ausência de luz de 4/20 h, 8/16 h, 12/12 h, 16/8 h, 20/4 h e 24/0 h. Após 24 h, uma gota de lactofenol-azul de algodão foi depositada nas cavidades da lâmina para interromper a germinação dos conídios. Determinou-se ao microscópio ótico o número de esporos germinados em um total de 200 esporos avaliados por cavidade. Cada regime de luz/ausência de luz constituiu um tratamento, o qual foi composto por três repetições.

Influência do binômio temperatura - tempo de câmara úmida sobre a infecção

Mudas de um clone de eucalipto (*E. maidenii* x *E. urophylla*) com 90 dias de idade foram inoculadas utilizando-se um atomizador do tipo De Vilbiss nº 5, com uma suspensão de 10^5 conídios/ml, obtida a partir de colônias do fungo com cinco dias de idade. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida a 18, 22, 26 e 30 °C por 0, 8, 16, 24, 32 ou 40 h, sob fotoperíodo de 12 h ($36 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Para cada binômio temperatura-tempo de câmara úmida, as plantas foram envolvidas com sacos plásticos sob armação de arame contendo no seu interior algodão umedecido e suas

paredes borrifadas com água. Esta armação foi retirada conforme os tempos de câmara úmida pré-determinados. A avaliação foi realizada aos 15 dias após a inoculação utilizando-se uma escala diagramática desenvolvida por Andrade (2004). O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial e com três repetições, sendo uma planta para cada repetição.

3. RESULTADOS

Efeito da temperatura sobre o crescimento micelial e esporulação

O crescimento micelial do fungo, determinado pelo diâmetro da colônia (DC), variou significativamente com a temperatura (T) e com o tempo de incubação (TI), sendo o modelo $DC \text{ (mm)} = -15,6299 + 1,6166 * T \text{ (}^\circ\text{C)} - 0,0324 * T^2 + 0,0461 * TI \text{ (h)}$ ($R^2 = 85\%$) o que melhor explicou a relação entre estas variáveis. O crescimento micelial foi linearmente proporcional com o tempo. As temperaturas estimadas, ótima, mínima e máxima, de crescimento foram de 25, 13 e 37 °C, respectivamente (Figura 1). Maior esporulação ocorreu a 28 °C. Baseado na equação de regressão, a temperatura ótima para esporulação foi estimada em 25 °C, com limites inferior e superior iguais a 7 e 42 °C, respectivamente (Figura 2).

Crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura

A interação entre meios de cultura e isolados foi significativa ($p < 0,05$). Todavia, os meios de BDA, V8 e CVA proporcionaram maior crescimento micelial após 12 dias

de incubação, não havendo diferença entre eles para os três isolados de *Q. eucalypti* testados (Figura 3). Para esporulação, a interação entre meios de cultura e isolados não foi significativa e o meio de BDA foi o mais favorável à produção de esporos do patógeno (Figura 4).

Efeito da temperatura e do regime de luz sobre a germinação de conídios

Não houve efeito significativo das temperaturas e dos regimes de luz testados sobre a germinação de conídios. Independentemente da temperatura e do regime de luz, a taxa média de germinação foi de 85%.

Influência do binômio temperatura - tempo de câmara úmida sobre a infecção

Não houve interação significativa ($p < 0,05$) entre temperatura e tempo de câmara úmida. Contudo, considerando as temperaturas testadas, observou-se maior severidade da doença a 26 °C. De acordo com o modelo quadrático obtido para explicar a variação da severidade da doença em função da temperatura, estimou-se que a temperatura ótima para infecção foi de 27 °C, com pontos de mínimo e máximo de 13 e 41 °C, respectivamente (Figura 5A). Quanto ao tempo de câmara úmida, observou-se uma resposta exponencial para a intensidade de doença, sendo que no maior tempo testado (40 h), constataram-se níveis de aproximadamente 40% de severidade da doença (Figura 5B).

4. DISCUSSÃO

A determinação da influência dos fatores do ambiente sobre o cultivo “in vitro” e a infecção de plantas é fundamental para embasar inoculações artificiais (Mueller & Buck, 2003). Neste estudo, foram caracterizadas, pela primeira vez, as condições adequadas para multiplicação de inóculo e para o estabelecimento da mancha foliar do eucalipto causada por *Q. eucalypti*.

O crescimento micelial e a esporulação do patógeno “in vitro” variaram com a temperatura de incubação e com o meio de cultura. Maior quantidade de esporos foi obtida em BDA a 25 °C. Contrariamente ao observado para *Q. eucalypti*, o meio V8 (Miller, 1955), que é rico em sua composição, estimula o crescimento micelial e produção de esporos (Krupinsky, 1982; Piana & Prestes, 1993; Fernandes & Santos, 1996), inclusive para fungos de difícil esporulação (González, 1999; Nagel, 1934). Assim como o meio V8, o CVA que engloba uma mistura de caldo de vegetais tem apresentado bons resultados para outros fungos (Pereira *et al.*, 2003). Para *Q. eucalypti*, o cultivo “in vitro” está de acordo com recomendações de Dhingra & Sinclair (1995), que preconizam a utilização de meios mais pobres para estimular a produção de esporos.

A luz, ao contrário do observado para outros patógenos, principalmente no grupo das ferrugens (Tapsoba & Wilson, 1997; Ruiz *et al.*, 1989), não teve influência sobre a infecção. Deste modo, as plantas inoculadas artificialmente com *Q. eucalypti* podem permanecer em condições de luminosidade requeridas para o seu pleno desenvolvimento e, conseqüentemente, para expressão máxima do seu nível de resistência.

Sob condições naturais, temperatura, luz e umidade oscilam diuturnamente, mas quando constantes, sob condições artificiais, permitem avaliar o efeito sobre a biologia

do patógeno. Os resultados deste trabalho permitem concluir que a infecção de *Q. eucalypti* é influenciada pela temperatura e pelo período de molhamento foliar. A temperatura ótima para infecção foi estimada em 27 °C. Considerando o sistema atual de produção de mudas de eucalipto por miniestaquia, no qual a condução de minicepas doadoras de propágulos vegetativos para enraizamento ocorre em minijardins clonais, dotados de cobertura e fertirrigação por gotejamento ou inundação temporária (Alfenas et al., 2004), acredita-se que apesar de não haver água livre sobre a superfície foliar, o microclima formado pelas constantes fertirrigações favorecem a infecção de *Q. eucalypti*. Assim, o aumento do espaçamento entre minicepas no minijardim pode constituir uma estratégia de controle da doença.

O aumento da severidade da doença em função do incremento do tempo de câmara úmida foliar já foi demonstrado para outros patossistemas (Melching, 1975; Hollier & King, 1985). Para *Q. eucalypti* este tipo de resposta pode estar relacionada com a necessidade do patógeno colonizar efetivamente a superfície foliar, conforme observado em um estudo prévio utilizando microscopia de varredura (dados não publicados), antes de iniciar as infecções. Para a ferrugem do milho, causada por *Puccinia polysora* Underw., maiores severidades da doença foram observadas com 24 h de molhamento para todas as temperaturas testadas (Godoy et al., 1999), ao passo que para o mal-de-sete-voltas da cebola, a duração do período de molhamento foliar não influenciou a severidade da doença (Carneiro & Amorim, 1999).

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que a multiplicação de inóculo de *Q. eucalypti* pode ser realizada em meio BDA, o qual é de baixo custo e fácil preparo. Além disso, a infecção em eucalipto é influenciada pela temperatura e período de câmara úmida. A temperatura ótima para o crescimento e infecção é 25 e 27 °C, respectivamente. A luz não afetou a germinação de conídios, mas observou-se

acrécimo exponencial da severidade da doença com o aumento do tempo de câmara úmida. Os resultados obtidos permitem embasar o desenvolvimento de um protocolo de inoculação de eucalipto que engloba a multiplicação de inóculo de *Q. eucalypti* e a manutenção das plantas inoculadas sob condições favoráveis à infecção. Fornece também subsídios para o manejo integrado da doença e para a análise de risco de epidemia em viveiros clonais de eucalipto.

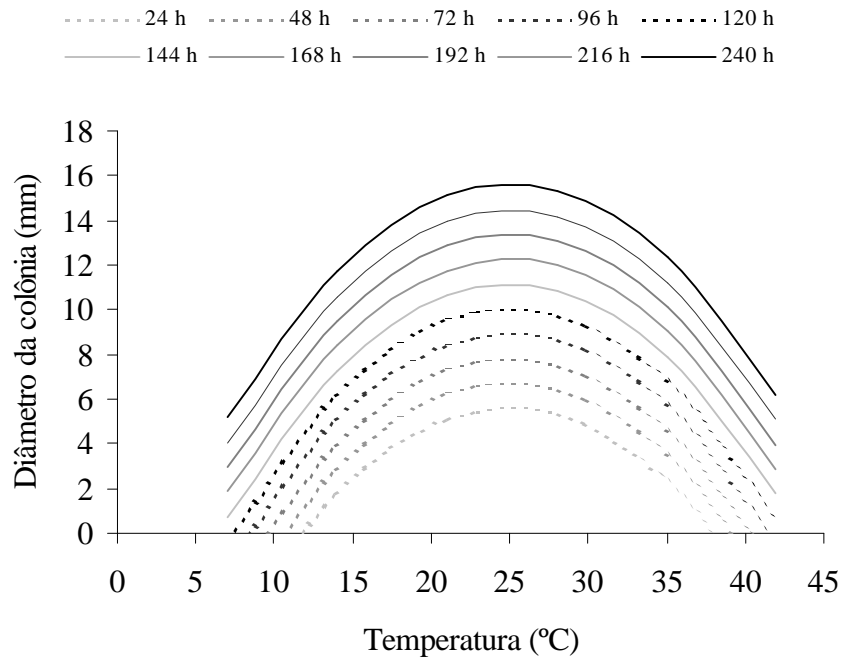


FIG. 1 - Crescimento micelial de *Quambalaria eucalypti* em BDA em função do tempo (h) e da temperatura (°C) de incubação.

$$E (x10^5) = -69,8080 + 12,0549 * T - 0,2540 * T^2$$

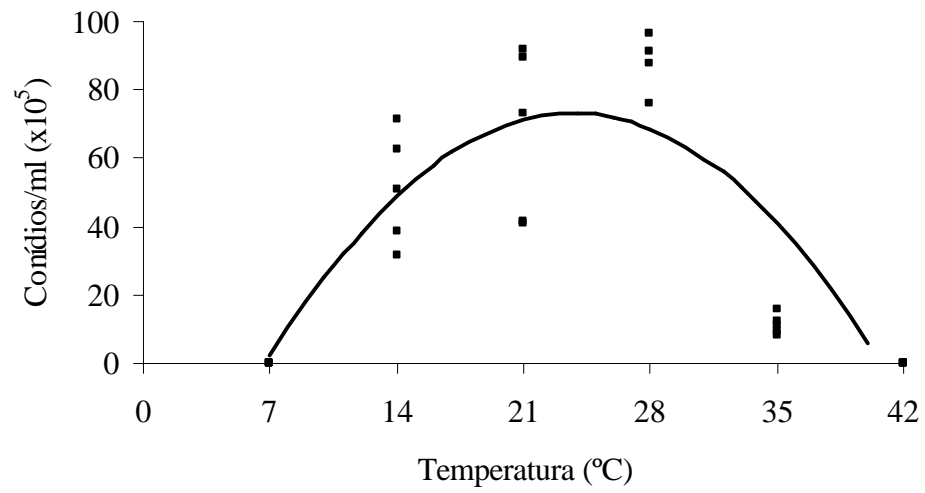


FIG. 2 – Esporulação (E) de *Quambalaria eucalypti* em BDA aos 10 dias de incubação em função da temperatura (T).

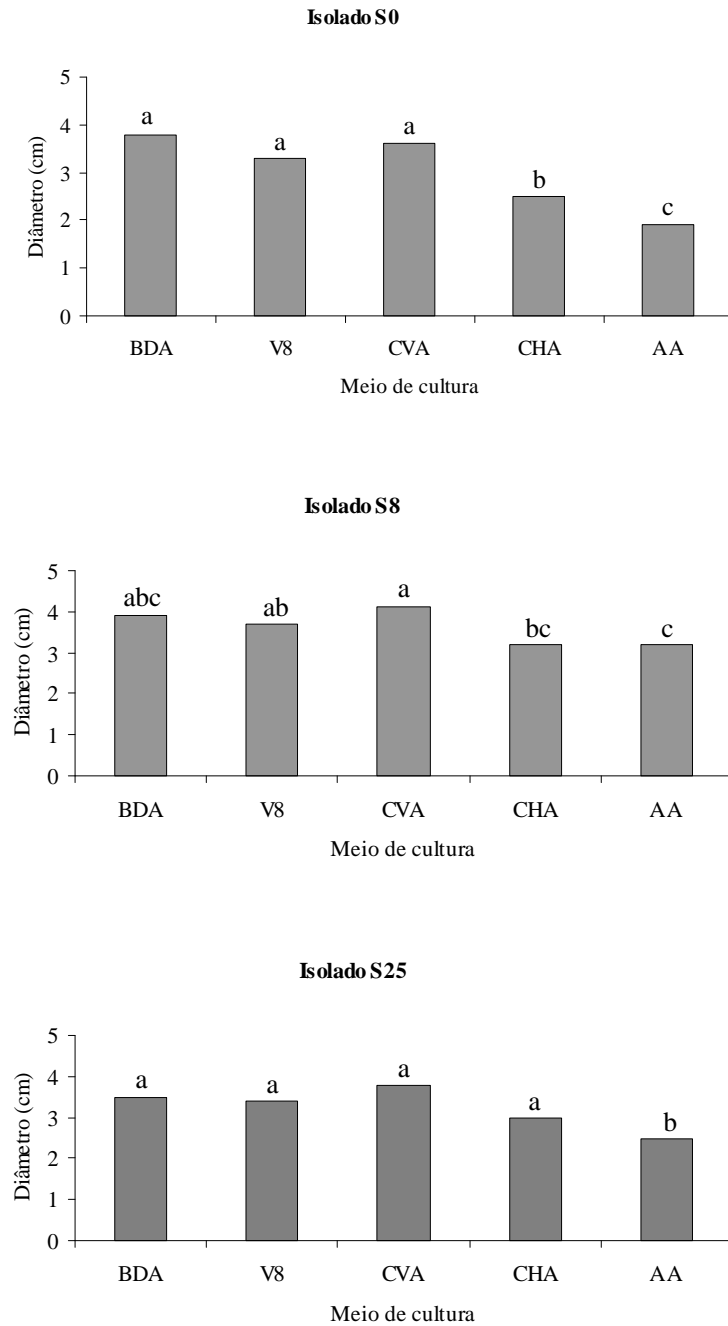


FIG. 3 - Crescimento micelial de três isolados (S0, S8 e S25) de *Quambalaria eucalypti*, expresso pelo diâmetro das colônias (cm) aos 12 dias de incubação e 28 °C, nos meios BDA, V8, CVA, CHA e AA. Colunas sob a mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = 18,6%

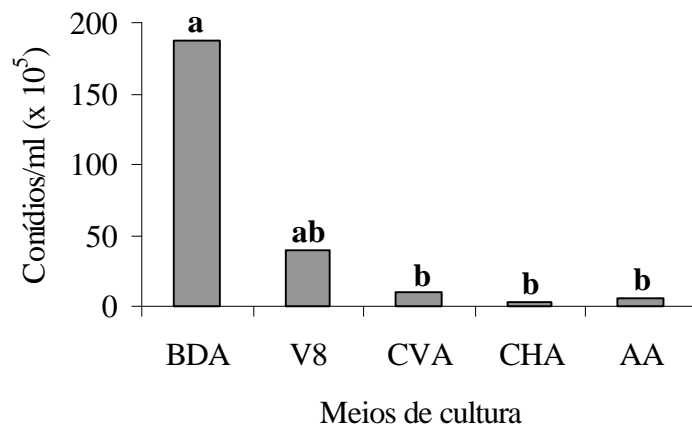


FIG. 4 – Esporulação de *Quambalaria eucalypti* em função do meio de cultura. Colunas sob a mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

CV = 23,8%

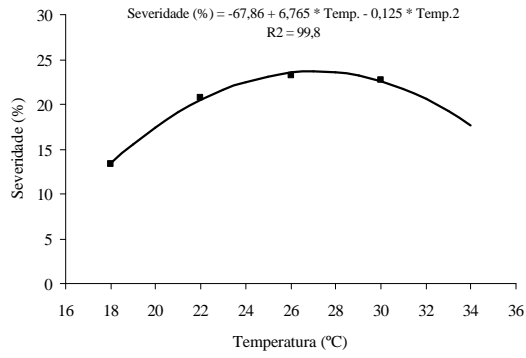
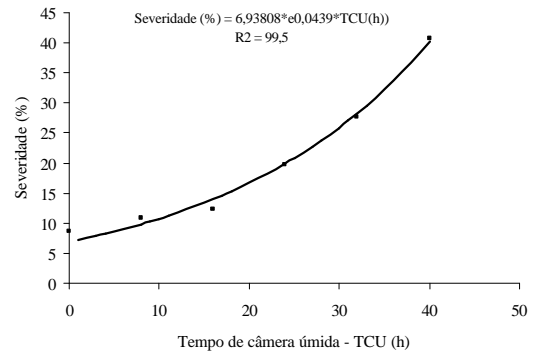
A**B**

FIG. 5 - Severidade, expressa em % da área foliar do eucalipto infectada por *Quambalaria eucalypti* em função da temperatura (A) e do tempo de câmara úmida (B) aos 15 dias de incubação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 4th ed. New York, Academic Press, 1997.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.Â.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Editora UFV, Viçosa, MG. 2004.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.Â.V., ROSA, O.P.P. & ASSIS, T.F. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira 26:221. 2001.
- ANDRADE, G.C.G. *Quambalaria eucalypti*: Características culturais, infectividade e quantificação da severidade da doença em eucalipto. (Tese de Mestrado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2004.
- CARNEIRO, L.C. & AMORIM, L. Influência da temperatura e do molhamento foliar no monociclo do “mal-de-sete-voltas” da cebola. Fitopatologia Brasileira 24:422-427. 1999.
- COLHOUN, J. Effects of environmental factors on plant disease. Annual Review Phytopathology 11:343-364. 1973.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Basic plant pathology methods. CRC Press, Boca Raton, FL. 1995.
- FERNANDES, M.C.A. & SANTOS, S.A. Cultivo de *Ampelomyces quisqualis* e interferência de fungicidas no seu crescimento *in vitro*. Fitopatologia Brasileira 21:26-29. 1996.
- GODOY, C.V., AMORIM, L. & BERGAMIM FILHO, A. Influência da duração do molhamento foliar e da temperatura no desenvolvimento da ferrugem do milho causada por *Puccinia polysora*. Fitopatologia Brasileira 24:160-165. 1999.
- GONZÁLES, M. Metodología para la manipulation y cultivo *in vitro* de *Micosphaerella fijiensis*. Manejo Integrado de Plagas 53:1-4. 1999.

- HOLLIER, C.A. & KING, S.B. Effect of dew period and temperature on infection of seedling maize plants by *Puccinia polysora*. *Plant Disease* 69:219-220. 1985.
- KRUPINSKY, J.M. Growth and sporulation of *Botryodiplodia hypodermia* in response to different Agar media and temperatures. *Plant Disease* 66:481-483. 1982.
- MELCHING, J.S. Corn rusts: types, races and destructive potential. Proceedings of the 30th Annual Corn and Sorghum Research Conference. Chicago. 1975. pp.90-115.
- MILLER, P.M. V8 juice agar as general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* 45:461. 1955.
- MUELLER, D.S. & BUCK, J.W. Effects of light, temperature, and leaf wetness duration on daylily rust. *Plant Disease* 87:442-445. 2003.
- NAGEL, C.M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. *Phytopathology* 24:1101-1110. 1934.
- PEREIRA, J.M, BARRETO, R.W., ELLISON, C.A. & MAFFIA, L.A. *Corynespora cassicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control* 26:21-31. 2003.
- PIANA, C.F.B. & PRESTES, A.M. Esporulação de *Stagnospora nodorum* em diferentes meios de cultura. *Fitopatologia Brasileira* 18:512-515. 1993.
- RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. & RIBEIRO DO VALE, F.X. Influência da temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 14:51-57. 1989.
- TAPSOBA, H. & WILSON, J.P. Effects of temperature and light on germination of urediniospores of the pearl millet rust pathogen, *Puccinia substriata* var. *indica*. *Plant Disease* 81:1049-1052. 1997.

**Escala Diagramática Para Avaliação da Severidade da Mancha Foliar do
Eucalipto Causada Por *Quambalaria eucalypti***

GABRIELA C. G. ANDRADE, ACELINO C. ALFENAS, REGINALDO G. MAFIA,
LUIZ A. MAFFIA & RIVADALVE C. GONÇALVES

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa – UFV, CEP 36570-
000, Viçosa – MG. E-mail: aalfenas@ufv.br

(Aceito para publicação em 00/00/2005)

Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas

ANDRADE, G.C.G., ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., MAFFIA, L.A. &
GONÇALVES, R.C. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha
foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*.

RESUMO

A mancha foliar, causada por *Quambalaria eucalypti*, é atualmente uma das principais doenças do eucalipto na fase de viveiro. Devido à sua recente constatação no Brasil, pouco se conhece sobre a epidemiologia e o controle dessa doença. Em função da necessidade de métodos padronizados e confiáveis para sua quantificação foi elaborada uma escala diagramática contendo oito níveis (0,4; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 49%) de severidade. Na sua validação, quatro avaliadores inexperientes e quatro experientes avaliaram folhas com diferentes níveis de severidade, inicialmente sem o uso da escala e posteriormente com o seu uso, sendo as estimativas comparadas quanto à acurácia e precisão. Com a utilização da escala, os avaliadores apresentaram melhores níveis de precisão e acurácia. Da mesma forma, após o treinamento, os níveis também foram melhorados, principalmente para os avaliadores inexperientes. Erros na quantificação da severidade da doença ocorreram com maior frequência entre 15 e 30% de severidade, independentemente da experiência dos avaliadores.

Palavras-chave adicionais: Patometria, escala diagramática, severidade, eucalipto, *Quambalaria eucalypti*.

ABSTRACT

Diagrammatic scale for assessment of eucalyptus leaf spot severity caused by *Quambalaria eucalypti*

The leaf spot, caused by *Quambalaria eucalypti*, is presently one of the most important diseases in eucalyptus nurseries in Brazil. Since the disease was only reported recently in Brazil, little is known about its epidemiology and control. As standardized and precise methods are needed for the disease severity evaluations, a diagrammatic scale containing eight levels (0,4; 1; 2; 4; 8; 16; 32 and 49%) of severity was developed in this study for the disease quantification. For the scale validation four unexperienced and four experts appraisers scored leaves with different levels of severity, initially without the use of the scale and later on with its use. The estimates were compared for accuracy and precision. Using of the scale the appraisers were able to get better levels of precision and accuracy. After the training, the levels of precision and accuracy were also increased, mainly for the unexperienced appraisers. The greatest errors in the disease evaluations were observed between the levels 15 and 30% of severity.

Additional Keywords: Patometry, diagrammatic scale, severity, eucalyptus, *Quambalaria eucalypti*.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Quambalaria eucalypti* (Wingfield, Crous & Swart) Simpson (sin. *Sporothrix eucalypti* Wingfield, Crous & Swart), foi constatado no Brasil, pela primeira vez em 2000, na região de Barra do Ribeiro – RS (Alfenas *et al.*, 2001). Atualmente, encontra-se disseminado nas principais regiões eucaliptocultoras do país, podendo causar perdas significativas na produção de mudas clonais de eucalipto (Alfenas *et al.*, 2004). O fungo provoca manchas foliares e anelamento de hastes e de brotações em mudas nas fases de crescimento e rustificação e em minecepas de *Eucalyptus* spp., em minijardim clonal, destinadas à produção de propágulos para enraizamento, especialmente nas épocas mais quentes do ano. Sobre as lesões de coloração marrom a marrom escuras, forma-se uma massa esbranquiçada de estruturas do fungo, lembrando pústulas de ferrugem branca. A abundante massa de esporos secos produzidos tornam o fungo de fácil disseminação pelo vento, seja no campo ou por correntes de ar forçado nas casas de enraizamento (Alfenas *et al.*, 2004). Embora *Q. eucalypti* seja atualmente um dos principais patógenos associados à propagação clonal do eucalipto, no Brasil, não existem métodos de quantificação da doença, essenciais nos estudos epidemiológicos e de controle.

Uma análise detalhada dos objetivos freqüentemente define os critérios para se escolher o método para avaliação da doença. Assim, métodos adequados devem ser escolhidos de forma criteriosa a fim de melhorar o grau de acurácia, precisão e repetibilidade das avaliações (Gaunt, 1987). Tais medidas são essenciais na quantificação da doença no espaço e no tempo (Zadoks, 1972). O método de avaliação varia com o agente etiológico e com a característica espacial da doença (Gaunt, 1995). No caso de doenças foliares, a severidade é a variável mais utilizada, sendo que sua avaliação é, normalmente, feita de forma subjetiva por meio de análises visuais e, por

consequente, as escalas diagramáticas tornam-se ferramentas fundamentais em tais estudos (Godoy *et al.*, 1997). Entre as características de uma boa escala diagramática estão: a facilidade de uso, a sua aplicabilidade sob ampla extensão de condições com resultados reproduzíveis e, a existência de intervalos que representem todos os estádios de desenvolvimento da doença (Berger, 1980). Assim, na construção de uma escala, alguns aspectos importantes devem ser considerados, como: a) os limites superiores e inferiores da escala devem corresponder, respectivamente, à máxima e mínima intensidade da doença observada no campo; b) os sintomas devem ser os mais próximos possíveis dos observados em plantas e; c) nos níveis intermediários de doença devem ser consideradas as limitações de acuidade do olho humano definidas pela lei de estímulos-resposta de Weber-Fechner, na qual a acuidade visual é proporcional ao logaritmo da intensidade do estímulo (Horsfall & Barrat, 1945; Horsfall & Cowling, 1978; Nutter & Schultz, 1995).

O sucesso na utilização de escalas diagramáticas depende da sua qualidade e da experiência e percepção visual de cada indivíduo. Os graus de precisão e acurácia variam com o avaliador e necessitam ser considerados no processo. No aprimoramento da habilidade do avaliador existem “softwares” que possibilitam treinamento prévio, minimizando assim a subjetividade das avaliações (James & Teng, 1979; Tomerlin & Howell, 1988; Newton & Hackett, 1994; Nutter & Schultz, 1995).

Existem escalas diagramáticas para avaliação da severidade de doenças em várias culturas agrônômicas, como feijão (Mora-Brenes, 1989; Sartorato, 1989; Stonehouse, 1994; Godoy *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2001), inhame (Michereff *et al.*, 2000), citrus (Amorim *et al.*, 1993; Rodrigues *et al.*, 2002), cana-de-açúcar (Amorim *et al.*, 1987), tomate (Boff *et al.*, 1991), abacaxi (Rohrbach & Schimitt, 1994), alface (O’ Brien & van Bruggen, 1992), cereais (James, 1971; Duveiller, 1994) entre outras.

Entretanto, para doenças florestais, especialmente para o eucalipto, ainda são escassos os trabalhos para elaboração de escalas, estando disponíveis apenas duas, uma para avaliação da severidade da bacteriose (Gonçalves, 2003) e a outra da ferrugem do eucalipto (Junghans *et al.*, 2003). Assim, o presente trabalho foi realizado objetivando a elaboração de uma escala diagramática para quantificação da intensidade da mancha foliar causada por *Q. eucalypti*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Definição dos níveis de severidade

Coletaram-se 200 folhas de eucalipto, aleatoriamente, em viveiros, apresentando grande variação da severidade da doença. As folhas, após a herborização, foram fotografadas individualmente utilizando-se uma câmera fotográfica digital, e as imagens com resolução de 300 dpi foram então transferidas para um microcomputador. Em seguida, cada folha foi analisada quanto à proporção de área lesionada, utilizando-se o programa Quant (Vale *et al.*, 2003), obtendo-se assim a severidade real da doença em termos percentuais. Os níveis intermediários de severidade da escala foram determinados de acordo com a lei de Weber-Fechner de acuidade visual. A partir dos valores obtidos, estabeleceu-se a escala diagramática.

Validação da escala

A validação da escala foi realizada por oito pessoas, sendo quatro experientes e quatro inexperientes. Cada grupo analisou 50 fotografias de folhas com diferentes níveis de severidade da doença. Através da análise de regressão linear, os dados estimados pelos avaliadores, com e sem o uso da escala, foram comparados com os dados reais de severidade obtidos com o auxílio do programa Quant. Assim, foi determinado o desempenho dos avaliadores quanto à precisão das estimativas obtidas pelo coeficiente de determinação (R^2) e pela acurácia e variância dos erros absolutos (severidade real vs. severidade estimada) (Godoy *et al.*, 1997; Nutter & Schultz, 1995).

Influência do treinamento na acurácia e precisão das avaliações

Uma terceira avaliação foi realizada, visando determinar a eficácia do treinamento dos avaliadores na acurácia e precisão das avaliações da severidade da mancha foliar com o uso da escala diagramática. Um dia após a primeira avaliação, os mesmos avaliadores foram submetidos a um treinamento de 30 min, no qual 60 folhas com diferentes níveis de severidade foram organizadas e apresentadas na forma de slides. Após o treinamento, os avaliadores também divididos em dois grupos, conforme estabelecido anteriormente, realizaram uma nova avaliação quanto à severidade em 50 folhas distintas. Após a avaliação, compararam-se os dados estimados pelos dois grupos com os dados reais obtidos com o auxílio do programa Quant, determinando-se assim o efeito do treinamento na acurácia e precisão dos avaliadores.

Ao final das avaliações, os dados foram analisados com o auxílio do programa STATISTICA for Windows 5.1 (StatSoft., Tulsa – OK, USA, 1996). Na determinação

da acurácia e precisão das estimativas visuais foi utilizada análise de regressão linear simples, determinando-se assim os modelos de regressão das avaliações efetuadas visualmente em relação às avaliações reais obtidas com o auxílio do programa Quant, para cada avaliador. Na comparação da acurácia dos dados estimados com os reais utilizaram-se os parâmetros interseção (a) e inclinação da reta (b), e na precisão o coeficiente de determinação (R^2). Consideraram-se com maior acurácia os avaliadores cujas estimativas resultaram em equações de regressão em que os parâmetros “a” e “b” não diferiram estatisticamente de 0 e 1, respectivamente, e com maior precisão os avaliadores cujas estimativas permitiram o ajuste do modelo linear com maiores valores do coeficiente de determinação (R^2).

3. RESULTADOS

Escala Diagramática

Os resultados obtidos através das análises com o programa Quant foram utilizados na construção de um gráfico representando a frequência da doença em diferentes intervalos de severidade (Figura 1). Observou-se maior frequência da doença no intervalo de severidade compreendido entre 0,46 e 2,89%. A severidade máxima encontrada nas 200 folhas avaliadas foi de 49%, enquanto que o valor mínimo apresentado foi de 0,4%. Os níveis intermediários, seguindo-se a lei de Weber-Fechener, foram ajustados para 1, 2, 4, 8, 16 e 32% de severidade (Figura 2).

Validação da escala

No teste de validação da escala, tanto o grupo de avaliadores inexperientes quanto o de experientes apresentaram maior precisão nas suas avaliações quando utilizaram a escala diagramática (Tabela 1). Entretanto, para os avaliadores experientes foi observado um menor acréscimo em termos de precisão quando se comparou aos inexperientes, os quais apresentaram maior precisão com o uso da escala. Todos os avaliadores apresentaram estimativas próximas aos valores reais de severidade, determinados com o programa Quant, quando foi utilizada a escala e uma boa acurácia (pontos bem distribuídos ao longo do eixo zero dos resíduos), indistintamente quanto utilizaram ou não a escala (Figuras 3 e 4). Desse modo, independentemente do avaliador, quando se utilizou a escala foi observada uma boa estimativa da severidade, com os resíduos concentrando-se na faixa inferior a 10%.

Influência do treinamento na acurácia e precisão das avaliações

Quando submetidos ao treinamento prévio, os avaliadores inexperientes tornaram-se mais precisos, independentemente do uso da escala, embora com a sua utilização foi observado um aumento na precisão, explicando em média, 86 % da variação da avaliação da doença. Para os avaliadores experientes, o treinamento prévio não influenciou o grau de precisão, provavelmente em função do alto nível já conseguido com o grupo antes do treinamento, sendo que em média 89,5 % das estimativas explicaram a variação da mensuração da doença (Tabela 2).

Quanto à acurácia das estimativas, os avaliadores submetidos ao treinamento não apresentaram diferença no desempenho (Tabela 2). Todos os avaliadores apresentaram

estimativas próximas aos valores reais de severidade, quando do uso da escala e uma boa acurácia independentemente do uso da escala (Figuras 5 e 6).

4. DISCUSSÃO

A máxima severidade da doença (49,1%) encontrada no presente trabalho diferiu-se das observações de Kranz (1988) para outros patossistemas, nos quais, a maioria das mensurações, em campo, apresentou níveis abaixo de 30%. Todavia, ficou claro pelo gráfico de freqüências que existe um decréscimo no número de plantas com severidade superior a 32%.

Para as avaliações visuais da mancha foliar do eucalipto causada por *Q. eucalypti*, realizadas com o auxílio da escala diagramática, obtiveram-se valores (R^2) de precisão inferiores a 95% considerados desejáveis por Kranz (1988), semelhantes ou superiores aos níveis verificados em outros estudos utilizando escalas diagramáticas (Nutter *et al.*, 1993; Michereff *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2002).

Os avaliadores foram mais precisos que acurados, analogamente ao observado na quantificação da severidade de doenças em *Agrostis palustris* Huds. (Nutter *et al.*, 1993), feijoeiro (Stonhouse, 1994) e inhame (Michereff *et al.*, 2000).

Em níveis mais baixos de severidade (<10%), os avaliadores apresentaram estimativas com maior acurácia e precisão, semelhante ao observado em avaliações de escalas em outros patossistemas (Stonehouse, 1994; Godoy *et al.*, 1997; Michereff *et al.*, 2000).

De acordo com Nutter (1989), para que um avaliador possa ser considerado excelente, o erro de suas estimativas deve estar dentro de um intervalo de $\pm 5\%$ do valor real, e bom quando não ultrapassar a $\pm 10\%$ (Nutter, 1989). Nesse sentido, tanto os

avaliadores experientes quanto os inexperientes foram considerados bons na avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Q. eucalypti*. É importante ressaltar que a presença de certo nível de erro absoluto nas mensurações pode ser compensada pela rapidez e padronização quando se utiliza escala diagramática (Stonehouse, 1994).

Avaiadores experientes foram mais precisos e acurados que avaliadores inexperientes, principalmente antes do treinamento, conforme já mencionado por Campbell & Madden (1990). O treinamento teve influência principalmente sobre a precisão das estimativas, confirmando assim observações realizadas em outros estudos (Nutter & Shultz, 1995; Parker *et al.*, 1995), mas este não é suficiente para eliminar totalmente os erros (Kranz, 1988; Parker *et al.*, 1995).

Os resultados deste estudo permitem concluir que a quantificação da mancha foliar do eucalipto causada por *Q. eucalypti* através da escala diagramática proposta tornou-se rápida, fácil, de boa precisão e acurácia, independentemente da experiência do avaliador, tornando-se uma ferramenta útil na quantificação da doença.

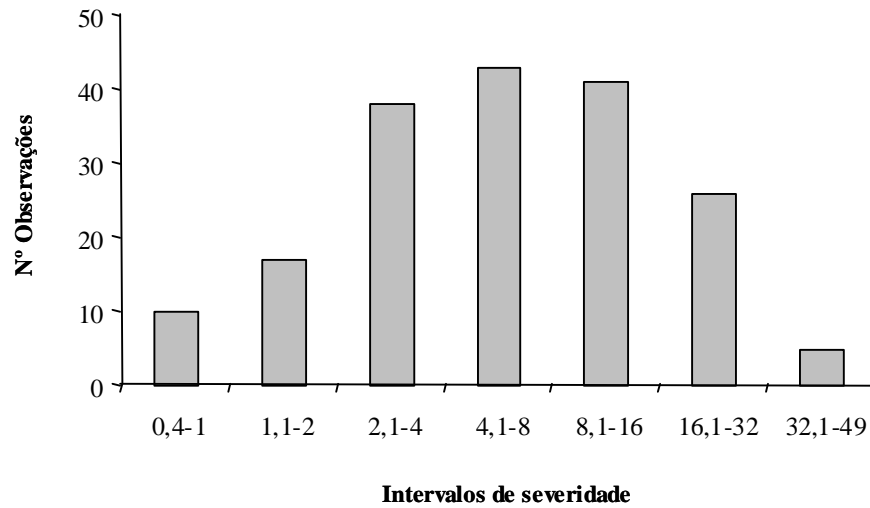


FIG. 1 - Frequência observada de severidade da mancha foliar causada por *Quambalaria eucalypti* em diferentes intervalos.

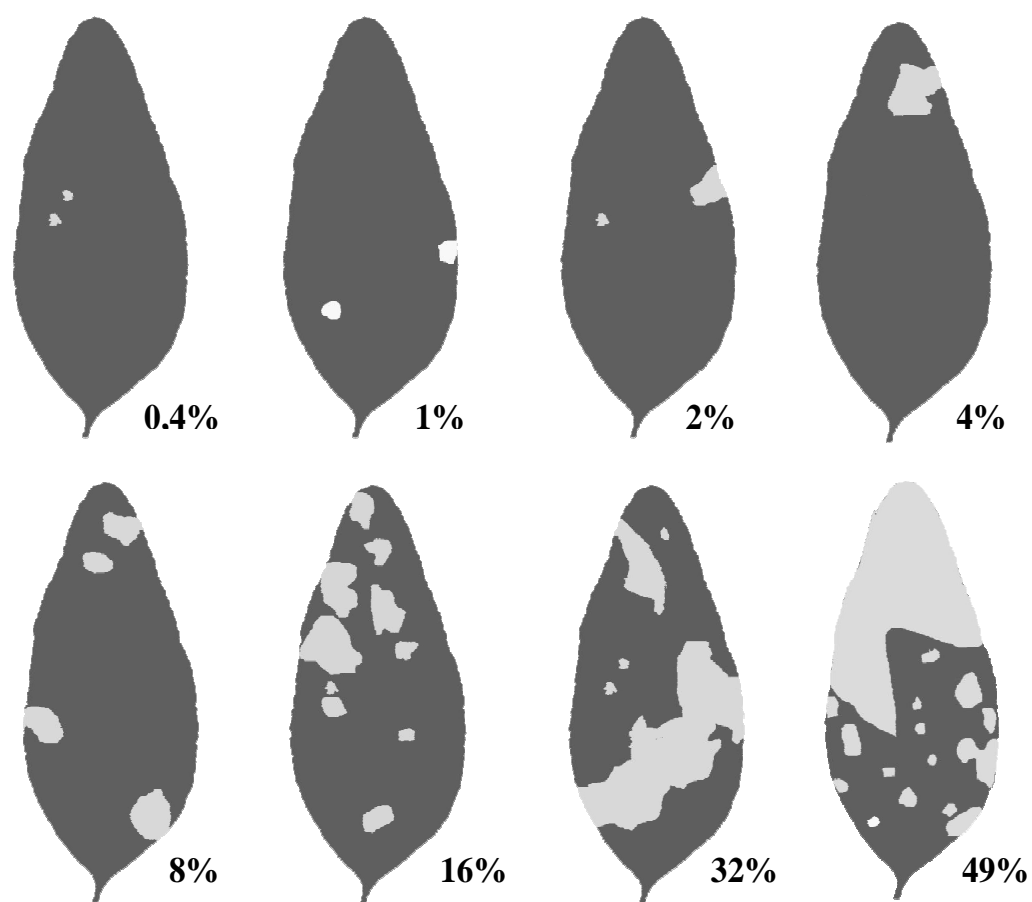


Fig. 2 - Escala diagramática de severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*.

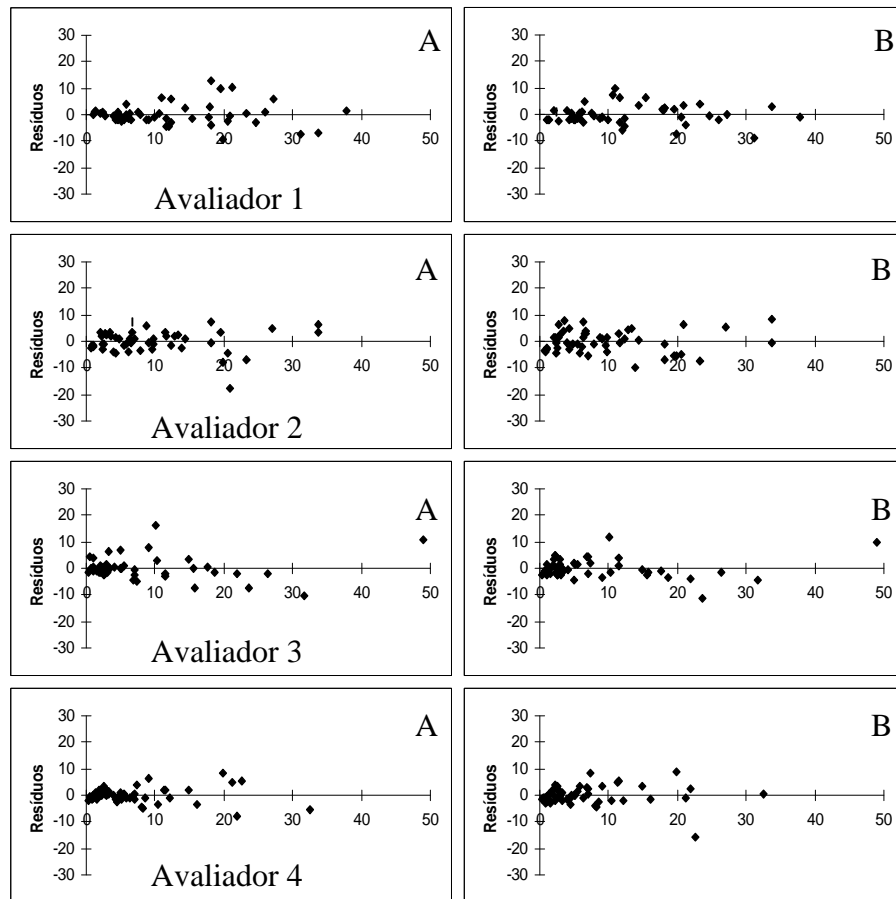


FIG. 3 - Erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) sem (A) e com (B) o uso da escala diagramática para avaliadores inexperientes.

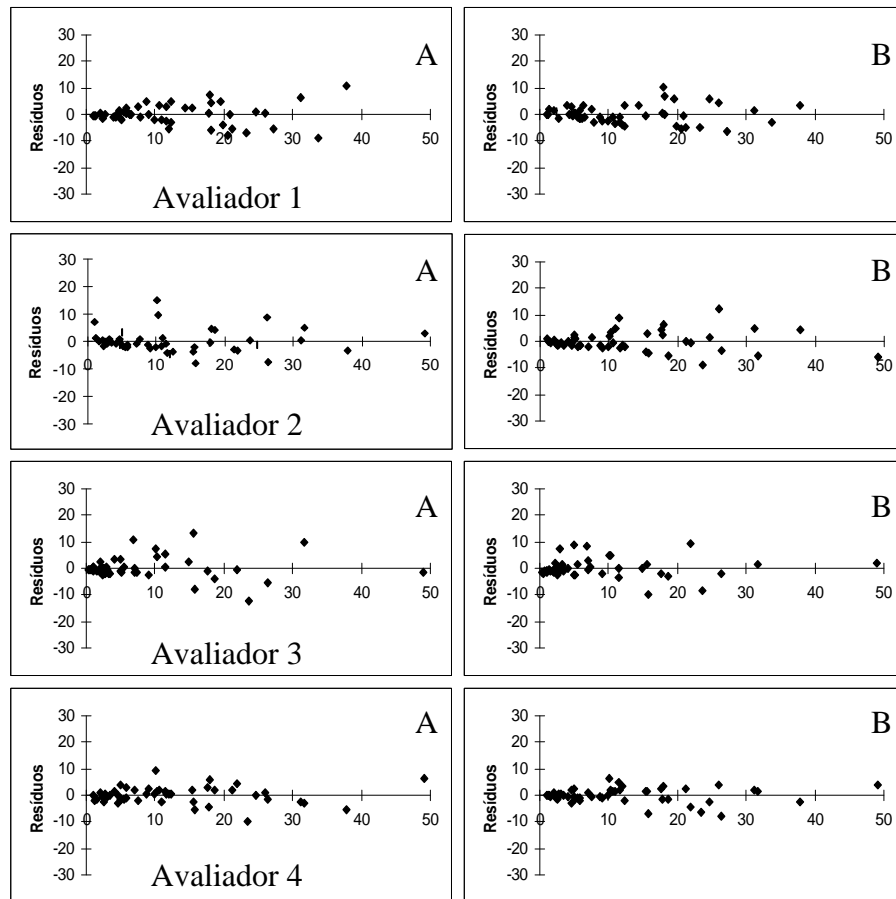


FIG. 4 - Erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) sem (A) e com (B) o uso da escala diagramática para avaliadores experientes.

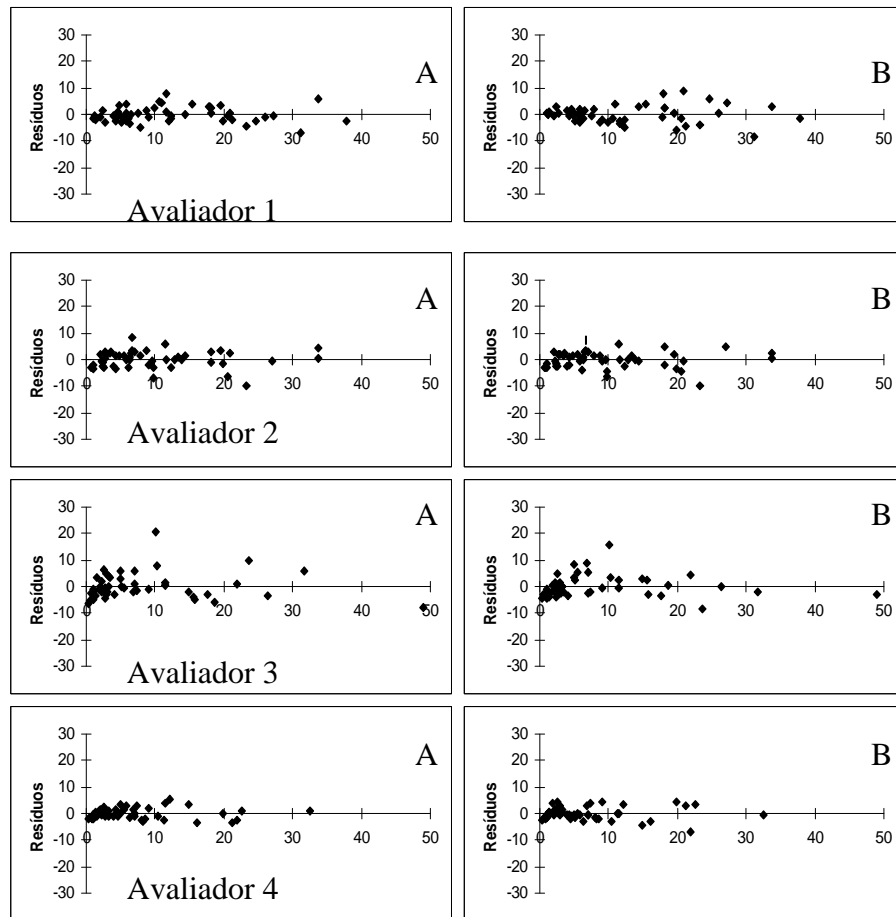


FIG. 5 - Erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) sem (A) e com (B) o uso da escala diagramática para avaliadores inexperientes, após treinamento.

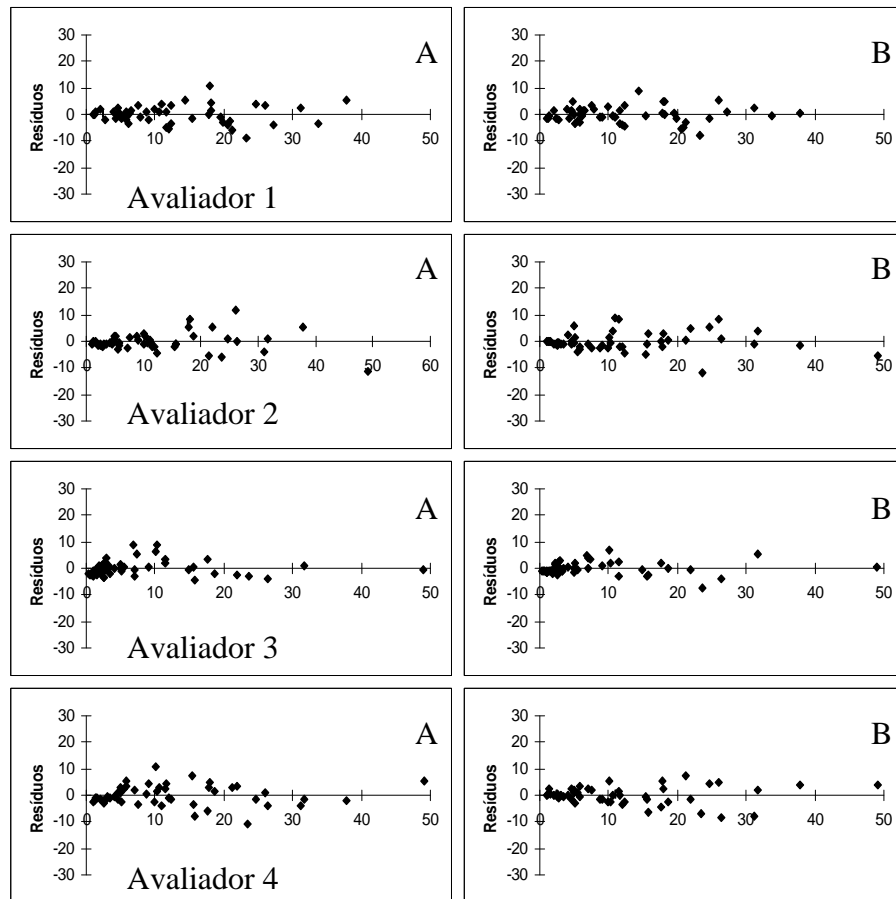


FIG. 6 - Erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) sem (A) e com (B) o uso da escala diagramática para avaliadores experientes, após treinamento.

TABELA 1 - Acurácia e precisão representadas pela interseção (*a*), inclinação (*b*) e coeficiente de determinação (R^2) nas avaliações da severidade da mancha foliar do eucalipto, causada por *Quambalaria eucalypti*, por avaliadores inexperientes e experientes, sem e com o auxílio da escala diagramática

| Avaliador | Sem escala | | | Com escala | | |
|---------------|------------|------|-----------|------------|------|-----------|
| | a | b | R^2 (%) | a | b | R^2 (%) |
| Inexperientes | | | | | | |
| 01 | 0,11 | 0,88 | 79 | 1,49 | 1,05 | 88 |
| 02 | 2,83* | 0,86 | 73 | 4,12* | 0,88 | 74 |
| 03 | 1,39 | 0,75 | 74 | 2,49* | 0,75 | 80 |
| 04 | 2,70 | 0,67 | 61 | 1,79* | 1,10 | 87 |
| Experientes | | | | | | |
| 05 | 2,50 | 0,84 | 79 | 0,76 | 0,95 | 87 |
| 06 | 3,05* | 0,7 | 77 | 1,17 | 0,7 | 80 |
| 07 | 0,40 | 1,02 | 84 | 1,87 | 0,91 | 86 |
| 08 | 2,03 | 0,85 | 89 | 0,99 | 0,88 | 92 |

*Parâmetros do modelo linear significativamente diferentes de 0 e 1 para interseção (*a*) e inclinação (*b*), respectivamente.

TABELA 2 - Acurácia e precisão representadas pela interseção (*a*), inclinação (*b*) e coeficiente de determinação (R^2) nas avaliações da severidade da mancha foliar do eucalipto (*Quambalaria eucalypti*), sem e com o auxílio da escala diagramática, após treinamento prévio dos avaliadores

| Avaliador | Sem escala | | | Com escala | | |
|---------------|------------|------|-----------|------------|------|-----------|
| | a | b | R^2 (%) | a | b | R^2 (%) |
| Inexperientes | | | | | | |
| 01 | 1,51 | 0,81 | 86 | 0,69 | 0,92 | 86 |
| 02 | 3,42* | 0,92 | 84 | 3,26* | 0,92 | 85 |
| 03 | 6,93* | 1,01 | 79 | 4,63* | 0,96 | 83 |
| 04 | 2,89* | 0,72 | 86 | 2,29* | 1,02 | 90 |
| Experientes | | | | | | |
| 05 | 0,92 | 1,02 | 88 | 2,26* | 0,98 | 89 |
| 06 | 1,23 | 0,57 | 73 | 0,21 | 0,82 | 85 |
| 07 | 2,61* | 0,97 | 91 | 1,60* | 0,97 | 94 |
| 08 | 2,81* | 0,85 | 84 | 1,20 | 0,92 | 90 |

*Parâmetros do modelo linear significativamente diferentes de 0 e 1 para interseção (*a*) e inclinação (*b*), respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., ROSA, O.P.P. & ASSIS, T.F. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 26:221. 2001.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V, MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. *Clonagem e Doenças do Eucalipto*. Viçosa, MG. Editora UFV. 2004. 442p.
- AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., SANGUINI, A., CARDOSO, C.O., MORAES, V.A. & FERNANDES, C.R. Metodologia de avaliação da ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). *Boletim Técnico Copersucar* 39:13-16. 1987.
- AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., PALAZZO, D., BASSANEZI, R.B., GODOY, C.V. & TORRES, G.A.M. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. *Fitopatologia Brasileira* 18:174-180. 1993.
- BERGER, R.D. Measuring disease intensity. In: Teng, P.S. & Krupa, S.V. (eds.). *Crop Loss Assessment which Constrain Production and Crop Improvement in Agriculture and Forestry*. St. Paul. University of Minnesota, pp. 28-31. 1980.
- BOFF, P., ZAMBOLIM, L. & VALE, F.X.R. Escalas para avaliação de severidade de mancha de estenfílio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 16:280-283. 1991.
- CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York. John Wiley & Sons. 1990. 532p.
- DÍAZ, C.G., BASSANEZI, R.B. & BERGAMIN FILHO, A. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. *Summa Phytopathologica* 27:35-39. 2001.

- DUVEILLER, E. A pictorial series of disease assessment keys for bacterial leaf streak of cereals. *Plant Disease* 78:137-141. 1994.
- GAUNT, R.E. Measurement of disease and pathogens. In: Teng, P.S. ed. *Crop Loss Assessment and Pest Management*. St. Paul, APS Press, 1987. p.6-18.
- GAUNT, R.E. The relationship between plant disease and severity and yield. *Annual Review of Phytopathology* 33:119-144. 1995.
- GODOY, C.V., CARNEIRO, S.M.T.P., IAMAUTI, M.T., PRIA, M.D., AMORIM, L., BERGER, R.D. & BERGAMIN FILHO, A. Diagrammatic scales for bean diseases: Development and validation. *Journal of Plant Disease and Protection* 104:336-345. 1997.
- GONÇALVES, R.C. Etiologia da mancha bacteriana de *Eucalyptus* spp. no Brasil. (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2003.
- HORSFALL, J.G. & BARRAT, R.W. An a improved grading system for measuring plant disease. *Phytopathology* 35:655. 1945.
- HORSFALL, J.G. & COWLLING, E.B. Pathometry: The measurement of plant disease. In: HORSFALL, J.G. & COWLLING, E.B. (eds.) *Plant Disease: An Advanced Treatise – How Disease Develops in Populations*. New York, Academic Press. 2:119-136. 1978. 432p.
- JAMES, W.C. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. *Canadian Plant Disease Survey* 51:39-65. 1971.
- JAMES, W.C. & TENG, P.S. The quantification of production constrains associated with plant diseases. *Applied Biology* 4:210-267. 1979.
- JUNGHANS, D.T., ALFENAS, A.C. & MAFFIA, L.A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. *Fitopatologia Brasileira* 28:184-188. 2003.

- KRANZ, J. Measuring Plant Disease. In: KRANZ, J. & ROTEM, J. (Ed.) Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology. Berlin, Springer Verlag. 1988. p.35-50.
- MICHEREFF, S.J., MAFFIA, L.A. & NORONHA, M.A. Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. Fitopatologia Brasileira 25:612-619. 2000.
- MORA-BRENES, B. Estimativa de perdas no rendimento de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) causada pela mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.). (Tese de Mestrado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1989.
- NEWTON, A.C. & HACKETT, C.A. Subjective components of mildew assessment on spring barley. European Journal of Plant Pathology 100:395-412. 1994.
- NUTTER JR., F.W. Disease Pro: a computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. Phytopathology 29:1135. 1989.
- NUTTER JR., F.W., GLEASON, M.L., JENCO, J.H. & CHRISTIANS, N.C. Assessing the accuracy, intra-rater repetibility of disease assessment systems. Phytopathology 83:806-812. 1993.
- NUTTER JR., F.W. & SCHULTZ, P.M. Improving the accuracy and precision of disease assessment: Selection of methods and use of computer-aided training programs. Canadian Journal of Plant Pathology 17:174-178. 1995.
- O'BRIEN, R.D. & VAN BRUGGEN, A.H.C. Accuracy, precision, and correlation to yield of disease severity scales for corky root of lettuce. Phytopathology 82:91-96. 1992.
- PARKER, S.R., WHELAN, M.J. & ROYLE, D.J. Reliable measurement of disease severity. Aspects of Applied Biology 43:205-214. 1995.

- RODRIGUES, J.C.V., NOGUEIRA, N.L. & MACHADO, M.A. Elaboração e validação de uma escala diagramática para leprose dos citros. *Summa Phytopathologica* 28:192-196. 2002.
- RORHBACH, K.G. & SCHMITT. Pineapple. In: Ploetz, R.C., Zentmyer, G.A. Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G. & Ohr, H.D. (eds). *Compendium of tropical fruit diseases*, p. 45-55. APS Press, St. Paul, 1994.
- SARTORATO, A. Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum a *Isariopsis griseola* Sacc. (Tese de Doutorado). Piracicaba. Universidade de São Paulo. 1989.
- STONEHOUSE, J. Assessment of Andean bean disease using visual keys. *Plant Pathology* 43:519-527. 1994.
- TOMERLIN, J.R. & HOWELL, T.A. Distrain: A computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. *Plant Disease* 72:455-459. 1988.
- VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I. & LIBERATO, J.R. QUANT. A software plant disease severity assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, p.105, 2003.
- ZADOKS, J.C. Methodology of epidemiological research. *Annual Review of Phytopathology* 10:253-276. 1972.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

- Os meios de cultura BDA, V8 e Caldo de Vegetais Agar (CVA), dentre os testados, foram os que apresentaram maior suporte ao crescimento micelial do fungo. Em meio BDA o fungo apresentou maior produção de esporos, mesmo este não tendo se diferido estatisticamente de V8;
- A temperatura de 28 °C foi ótima o crescimento micelial do patógeno.
- O desenvolvimento do tubo germinativo foi maior a 27 °C;
- A temperatura ótima para infecção, onde as plantas apresentaram maior severidade da doença, foi a 27 °C;
- O tempo de molhamento foliar apresentou efeito significativo sobre a infecção do patógeno, quanto mais tempo a planta ficou sob câmara úmida (40 h), maior foi a severidade da doença;
- A escala diagramática elaborada para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Q. eucalypti* aumentou a precisão e acurácia das avaliações, tornando-se assim, uma ferramenta extremamente útil e de fácil uso;
e
- O treinamento prévio dos avaliadores aumentou a acurácia e precisão das avaliações mais expressivamente para avaliadores inexperientes em avaliar doenças de plantas, quando comparado aos avaliadores experientes.