

SILVINO INTRA MOREIRA

**FUNGOS E BACTÉRIAS ASSOCIADOS ÀS PODRIDÕES PÓS-
COLHEITA DE RIZOMAS DE GENGIBRE NO ESPÍRITO
SANTO**

Dissertação 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
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M838f
2010

Moreira, Silvino Intra, 1982-

Fungos e bactérias associados às podridões pós-colheita de rizomas de gengibre no Espírito Santo / Silvino Intra Moreira.

– Viçosa, MG, 2010.

x, 54f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Olinto Liparini Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 44-54.

1. Fitopatologia. 2. Fungos. 3. Fungos fitopatogênicos.
4. Bactérias. 5. Bactérias fitopatogênicas. 6. Gengibre.
7. Perdas durante a colheita. 8. *Zingiber officinale*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

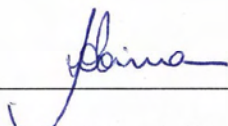
CDD 22. ed. 571.92

SILVINO INTRA MOREIRA

FUNGOS E BACTÉRIAS ASSOCIADOS ÀS PODRIDÕES PÓS-COLHEITA DE RIZOMAS DE GENGIBRE NO ESPÍRITO SANTO

Dissertação 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: 26 de fevereiro de 2010.



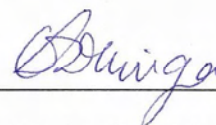
Prof^{da}. Rosângela D'Arc de Lima Oliveira



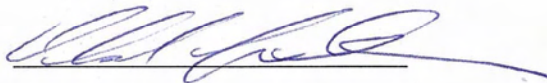
Pesq. Robson José Nascimento



Prof. José Rogério de Oliveira
(Coorientador)



Prof. Onkar Dev Dhingra
(Coorientador)



Prof. Olinto Liparini Pereira
(Orientador)

Ao Deus presente, zeloso e maravilhoso, e aos meus pais, presentes, zelosos e maravilhosos, dedico.

“Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.” (Rm8:28)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu grande amigo, por seu eterno cuidado, concedendo-me a graça de realizar mais este sonho.

Aos meus pais Silvino e Suely, pelo o amor e o carinho. Melhores pais do mundo.

À Samira e Sabrina, minhas irmãs e amigas. Amo muito vocês.

Ao Prof. Olinto Liparini Pereira, pelo incentivo, pelo crédito dado ao nosso projeto, pela paciência e, sobretudo, pelos valiosos conselhos e ensinamentos.

Aos grandes amigos da IBNV, pelo convívio e amizade.

Aos professores José Rogério de Oliveira e Onkar Dev Dhingra, pelo apoio e sugestões no decorrer do trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, responsáveis por minha formação acadêmica e crescimento profissional.

Aos demais membros da banca examinadora desta dissertação, Prof^a. Rosângela D´arc de Lima Oliveira e Dr. Robson José Nascimento, pela participação e valiosa contribuição.

À Deiziane, pela amizade, paciência e dedicação, e a todos os amigos do Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-colheita, Rafaela, Danilo, Larissa, Rafael, Meiriele e André.

À Dra. Ivanete Tonole, ao prof. Marcos Totola, e aos funcionários Sueli, Ricardo, Renildo, Bruno, Camilo, Dagoberto e Fizim, importantes colaboradores no desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade em realizar a graduação e o mestrado.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro dado ao projeto.

BIOGRAFIA

SILVINO INTRA MOREIRA, filho de Silvino Moreira Filho e Suely Intra Moreira, nasceu em 11 de agosto de 1982, na cidade de Vitória, Espírito Santo.

Em 2002, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em março de 2007.

Em março de 2008, ingressou no programa de Pós-graduação em nível de mestrado, em Fitopatologia, na área de Patologia Pós-Colheita, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A cultura do gengibre.....	3
2.2. Podridão pós-colheita de rizomas de gengibre de etiologia fúngica e bacteriana.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. AMOSTRAGEM DE RIZOMAS DE GENGIBRE	12
3.1.1. Amostragem de rizomas com sintomas de podridões durante armazenamento refrigerado	12
3.1.2. Amostragem de rizomas com sintomas de podridões no campo.....	12
3.2. Isolamento de fungos.....	12
3.3. Identificação das espécies fúngicas associadas	13
3.4. Testes de patogenicidade dos fungos isolados	17
3.4.1. Capacidade de colonização da superfície cortada	17
3.4.2. Capacidade de colonização e de incitar podridão a partir da superfície perfurada.....	17
3.5. Isolamento de bactérias.....	18
3.6. Testes de patogenicidade de bactérias	18
3.7. Identificação de espécies bacterianas.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Fungos.....	20
4.1.1. Fungos associados.....	20
4.1.2. Caracterização molecular	22
4.1.3. Patogenicidade dos fungos associados	24
4.2. Bactérias	32
4.2.1. Bactérias isoladas de rizomas coletados no campo.....	32
4.2.2. Testes de patogenicidade de bactérias	32
4.2.3. Identificação de bactérias	35

5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

MOREIRA, Silvino Intra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Fungos e bactérias associados às podridões pós-colheita de rizomas de gengibre no Espírito Santo.** Orientador: Olinto Liparini Pereira. Co-orientadores: José Rogério de Oliveira e Onkar Dev Dhingra.

O rizoma de gengibre (*Zingiber officinale* R.) constitui uma das especiarias mais importantes do mundo devido ao uso como matéria-prima na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos. A exportação do gengibre brasileiro tem aumentado nos últimos anos apesar dos danos decorrentes das podridões de rizomas. Ainda são desconhecidos os principais agentes etiológicos associados às podridões pós-colheita de gengibre no Brasil, requisito para o desenvolvimento de um programa de manejo integrado de doenças. O presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento de fungos e bactérias associados às podridões pós-colheita de rizomas de gengibre. Rizomas com sintomas de podridões foram amostrados em 2006 e 2009, em Santa Leopoldina, ES e em Santa Maria de Jetibá, ES, em *packing-house*. Outra amostragem foi realizada em 2008, em Santa Leopoldina, ES, em cinco propriedades rurais, durante a colheita. As amostras foram encaminhadas ao departamento de Fitopatologia da UFV, para isolamento, identificação e testes de patogenicidade de fungos e bactérias. Em *packing-house*, constatou-se a presença de *Acremonium murorum*, *Acrostalagmus luteo-albus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Sclerotium rolfsii*, e todos estes foram capazes de causar podridão em rizomas. Na coleta em campo, verificou-se a incidência média nos rizomas de gengibre de 74% de *F. oxysporum*, 31% de *F. graminearum*, 21% de *Fusarium solani*, 5% de *Nigrospora oryzae*, 6% de *Fusarium semitectum* e de *Nigrospora sphaerica*, 4% de *Alternaria tenuissima*, 3% de *Penicillium commune*, *Verticillium* sp. (1) e *Verticillium* sp. (2), 2% de *A. luteo-albus*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium* sp. e *Epicoccum* sp., e 1% de *Curvularia geniculata* e *Mucor hiemalis*, para as cinco propriedades amostradas. Os fungos capazes de causar podridões em rizomas coletados em campo foram *A. luteo-albus*, *F. graminearum* e *F. oxysporum*. A ocorrência de *F. graminearum* foi considerada de grande importância, pois esta espécie é conhecidamente produtora de micotoxinas. Nesta amostragem, foram identificadas bactérias causadoras de podridão-mole em 5% dos rizomas de gengibre, 4 isolados identificados como

Enterobacter cloacae subsp. *cloacae* e 1 isolado identificado como *Pseudomonas fluorescens*. *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* indicou uma provável contaminação de origem fecal. Registra-se como a primeira ocorrência, no mundo, de *Fusarium graminearum* e de *Pseudomonas fluorescens* causando podridão em rizomas de gengibre, e a primeira ocorrência, no Brasil, de *Acremonium murorum*, *Acrostalagmus luteo-albus*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Sclerotium rolfsii* causando podridão em rizomas de gengibre.

ABSTRACT

MOREIRA, Silvino Intra, M.Sc., Universidade Federal de Vicosa, February, 2010. **Fungi and bacteria associated with post-harvest ginger rot rhizomes in Espirito Santo.** Adviser: Olinto Liparini Pereira. Co-advisers: Jose Rogerio de Oliveira and Onkar Dev Dhingra.

The rhizome of ginger (*Zingiber officinale* R.) is one of the most important spices in the world due to its use as feedstock in the food industry, pharmaceuticals and cosmetics. The Brazilian export of ginger has increased in recent years despite the damage caused by decay of rhizomes. Still unknown are the main etiological agents associated with postharvest rot of ginger in Brazil, a prerequisite for the development of an integrated management program for diseases. This study aimed to conduct a survey of fungi and bacteria associated with postharvest decay of ginger rhizomes. Rhizomes showing rot symptoms were sampled in 2006 and 2009, in Santa Leopoldina, ES, and in Santa Maria de Jetiba, ES, in packing-house. Another sample was selected in 2008 in Santa Leopoldina, ES, in five farms during the harvest. The samples were sent to the UFV Department of Plant Pathology, for isolation, identification and pathogenicity tests of fungi and bacteria. In the packing-house, it was found the presence of *Acremonium murorum*, *Acrostalagmus luteo-albus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii*, and all these were able to cause rot in the rhizomes. In the collection in the field, it was found the average incidence in ginger rhizomes 74 % of *F. oxysporum*, 31% of *F. graminearum*, 21% of *Fusarium solani*, 5% of *Nigrospora oryzae*, 6% of *Fusarium semitectum* and of *Nigrospora sphaerica*, 4% of *Alternaria tenuissima*, 3% of *Penicillium commune*, *Verticillium* sp. (1) and *Verticillium* sp. (2), 2% of *A. luteo-albus*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium* sp. and *Epicoccum* sp., and 1% of *Curvularia geniculata* and *Mucor hiemalis*, for the five properties. Fungi collected in the field capable of causing decay in rhizomes were *Acrostalagmus luteo-albus*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum*. The occurrence of *F. graminearum* was considered of great importance because this species is known to produce mycotoxins. In this sample, we identified bacteria that cause soft rot in 5% of the rhizomes of ginger, four isolates identified as *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* and one isolate identified as *Pseudomonas fluorescens*. *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* indicated a probable contamination of fecal origin. Join as the

first occurrence in the world of *Fusarium graminearum* and *Pseudomonas fluorescens* causing rot in ginger rhizomes, and the first occurrence in Brasil of *Acremonium murorum*, *Acrostalagmus luteo-albus*, *Lasiodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii* causing rhizome rot ginger.

1. INTRODUÇÃO

O rizoma de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) constitui uma das especiarias mais importantes do mundo, sendo utilizado como matéria-prima na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos. Apesar de não possuir uma produção comparável à da China, maior produtor e exportador mundial (Itc 2002), o Brasil tem o gengibre como uma das hortaliças mais exportadas, chegando a 9,1 mil toneladas em 2005 (Brasil 2008), e vem se destacando no mercado internacional por sua qualidade. A variedade ‘gigante’ possui alta aceitação no mercado internacional e é produzida principalmente por pequenos agricultores familiares no Estado do Espírito Santo (Souza e Rezende 2001). A cada safra é colhida uma média de 30 toneladas por hectare, chegando até a 60 toneladas por hectare, possuindo assim uma grande importância sócio-econômica. As principais cidades produtoras são Santa Leopoldina e Santa Maria de Jetibá. A cultura foi introduzida nesta região por meio de rizomas-semente originários do estado de São Paulo, que por sua vez iniciou seu plantio com material propagativo oriundo do Havaí.

Os produtos exportados são inspecionados pelos países importadores quanto à isenção de resíduos de agrotóxicos, brotações de gemas, contaminação por bactérias entéricas, e problemas fitossanitários, principalmente podridões. As perdas devido às podridões de origem fitopatológica se iniciam no campo e ocorrem no *packing-house*, como também em câmaras frias e nos *containers* refrigerados em navios, gerando grandes prejuízos ao agronegócio do gengibre brasileiro. Além disso, rizomas-semente contaminados utilizados no plantio, bem como aqueles doentes descartados próximos a campos de produção constituem fonte de inóculo primário, disseminando assim diversos patógenos potencialmente danosos à cultura. Os maiores causadores de perdas devido à podridão de rizomas de gengibre relatados são *Fusarium oxysporum* f.sp. *zingiberi* E.E. Trujilo, relatado no Havaí, na Austrália e na Coreia (Trujilo 1964; Stirling 2004; Farr e Rossman 2010), também causador de murcha vascular, doença chamada de ‘amarelo-de-fusarium’; diversas espécies de *Pythium*, causadores de ‘podridão mole’, como *Pythium myriotylum* Drechsler (Wang *et al.* 2003) e *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick (Kavita e Thomas 2008), relatados em vários países, como Taiwan, Malásia, Havaí, Japão (Farr e Rossman 2010), Índia (Ravindran e Nirmal Babu 2005) e Austrália (Stirling 2004); *Sclerotium rolfsii* Saccardo, causador de um tipo de ‘podridão cotonosa’

(Stirling 2004), já relatado em gengibre na Austrália, Flórida, África do Sul, Venezuela (Farr e Rossman 2010) e Brasil (Moreira *et al.* 2006); *Dickeya chrysanthemi* (Brenner *et al.*) Samson *et al.*, principal causador da ‘podridão-mole’ na Austrália (Stirling 2002; 2004), com ocorrência também no Brasil (Malavolta Jr. e Almeida 1998); e *Enterobacter cloacae* (Jordan) Hormaeche e Edwards, causador da ‘podridão aquosa’ (Nishijima *et al.* 2004), relatado em gengibre exclusivamente no Havaí.

Dificuldades são encontradas para adequar o manejo pós-colheita de rizomas de gengibre no Brasil, principalmente pelo desconhecimento dos principais agentes etiológicos associados às podridões. O presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento etiológico de fungos e bactérias causadores de podridões em pós-colheita de rizomas de gengibre.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura do gengibre

O gengibre pertence à família Zingiberaceae, composta de 1300 espécies distribuídas em 49 gêneros, conhecida por abranger diversas plantas ornamentais e plantas que acumulam metabólitos de importância farmacológica, como os gingeróis do gengibre, e os curcuminoides da cúrcuma (*Curcuma longa*) (Hamírez-Ahumada *et al.* 2006). Trata-se de uma planta herbácea de rizoma perene e de parte aérea anual, de rizomas ramificados, carnosos, geralmente de cor amarela, mas também apresentando coloração branca ou azulada (Souza e Rezende 2001).

As variedades utilizadas divergem entre si quanto ao aspecto, teor de óleo, aroma e rendimento de seus rizomas (Ravindran e Nirmal Babu 2005). No Brasil são cultivadas diversas variedades, como ‘havaiana’, ‘jamaicana’, ‘takahashi’, ‘gigante chinesa’ e ‘japonesa’ (Elpo *et al.* 2008), sendo ‘gigante’ a mais cultivada e a mais aceita no mercado internacional e entre os produtores, por seu aspecto e produtividade.

Os climas considerados ideais para o seu desenvolvimento são o Tropical e o Subtropical, quentes e úmidos, com precipitações de 1500 mm/ano, necessitando-se de irrigação em períodos de seca. Apresenta alta capacidade adaptativa, sendo produzido também em climas amenos, como na região serrana do Espírito Santo (Souza e Rezende 2001). O solo deve ser leve e solto, para permitir bom desenvolvimento dos rizomas, bem drenado, para evitar acúmulo excessivo de umidade e conseqüente favorecimento de podridões, e rico em matéria orgânica, com o pH numa faixa entre 6,0 e 6,5.

A reprodução é conduzida por meio de propagação vegetativa, e as mudas são segmentos de rizomas, os rizoma-sementes, com 5 a 10 cm, sendo necessários para o plantio cerca de 4 ton/ha.

A principal praga é a lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), que ataca as brotações (Souza e Rezende 2001). As espécies de nematóides formadores de galhas *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* são problemas na produção de gengibre na Austrália (Stirling e Nikulin 1998). A murcha de origem biótica é causada principalmente por *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi* (Trujilo 1964) e por *Ralstonia solanacearum* raça 4 (Ishii e Aragaki 1963; Yu *et al.* 2003) e *Phyllosticta*

zingiberis F. Stevens e R.W. Ryan está frequentemente associado a manchas foliares de gengibre (Bussaban *et al.* 2002).

A colheita é realizada cerca de 9 meses após o plantio, quando ocorre o amarelecimento e seca das folhas. Deve-se ter muito cuidado na ocasião da retirada dos rizomas do solo, pois quaisquer injúrias podem servir de portas de entrada para fitopatógenos.

O rizoma de gengibre constitui uma das especiarias mais importantes do mundo, pois é utilizado como matéria-prima na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos. Apesar do uso restrito no Brasil, os produtos ou subprodutos do gengibre são variados, e estão entre temperos, principalmente o ‘curry’, balas, pães, geléias, doces, biscoitos, cerveja, refrigerante, energéticos, óleos terapêuticos, remédios, hidratantes, perfumes e muitos outros. Também é utilizado na medicina popular, como estimulante da digestão, expectorante, anti-inflamatório, e auxiliar no combate de tosse, resfriados e rouquidão. Há muitos anos pesquisas têm mostrado a funcionalidade de potentes compostos antioxidantes presentes no gengibre, principalmente os compostos fenólicos gingeróis e shugaóis, além do zingibereno (Chrubasic *et al.* 2005; Hamírez-Ahumada *et al.* 2006). Atividades anti-inflamatória, antináusea, antiúlcera, antimutagênica, antitumorogênica, hipoglicêmica, antibacteriana, além de efeitos benéficos aos sistemas gastrointestinal e cardiovascular, são comprovadas por diversos trabalhos científicos (Chrubasic *et al.* 2005). Recentemente, estudos feitos no INPA (Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia) aperfeiçoaram um método de extração do composto zerumbona, presente no gengibre amargo (*Zingiber zerumbet* Awapuhi). A zerumbona é um fármaco bastante utilizado em estudos de combate ao câncer (Inpa 2010).

A produção de gengibre no Brasil começou a se tornar comercial nas últimas décadas, após a implantação de variedades gigantes por agricultores japoneses, nos Estados do Paraná e São Paulo (Elpo *et al.* 2008). No período entre 2000 e 2007, o valor exportado pelo Brasil aumentou de 5,6 para US\$ 6,5 milhões, ficando entre as sete hortaliças mais exportadas em valor e em quantidade (Embrapa 2009), concorrendo com rizomas da China e do Havaí. O Estado do Paraná já foi o maior exportador do rizoma no país, apresentando média de 1200 toneladas por ano (Elpo *et al.* 2008). No entanto, a produção do gengibre no Estado do Espírito Santo está ganhando destaque, e suas exportações chegaram 2000 toneladas por ano, produzindo um total de seis mil toneladas em 200 hectares (Incaper 2009). Em 2004,

as exportações representaram US\$ 3,5 milhões, sendo considerado o maior Estado exportador de gengibre do país (Ocbes 2009). Cerca de 80% do gengibre produzido neste Estado é exportado, e 60% dos rizomas comercializados são utilizados na culinária, 20% na produção de óleo e oleoresina, principalmente nas indústrias de fármacos, e os outros 20%, no setor de bebidas. As principais cidades produtoras são Santa Leopoldina e Santa Maria de Jetibá, e a introdução da cultura nesta região ocorreu por meio de rizoma-sementes originários do Estado de São Paulo, que por sua vez iniciou seu plantio com material propagativo oriundo do Havaí.

O maior produtor e exportador do mundo é a China (Itc 2002), que oferece ao mercado um produto barato e de baixa qualidade. O gengibre produzido no Brasil possui competitividade neste mercado pela sua qualidade, principalmente devido ao plantio da variedade ‘gigante’. Os pequenos agricultores familiares no Estado do Espírito Santo colhem a cada safra uma média de 30 toneladas por hectare, chegando até a 60 toneladas por hectare, representando assim uma importância sócio-econômica (Incaper 2009).

2.2. Podridão pós-colheita de rizomas de gengibre de etiologia fúngica e bacteriana

As podridões de rizomas estão entre as principais causas de perdas em vários países produtores de gengibre, incluindo o Brasil (Tabela 1).

Fungos e bactérias associados a doenças de tubérculos, raízes tuberosas e rizomas podem sobreviver no solo e necessitam de ferimentos nos rizomas para penetrar e iniciar a infecção, o que geralmente evolui para podridão. Os ferimentos podem ser devido a nematóides, insetos, manuseio inadequado durante tratamentos culturais, colheita e pós-colheita (Henz 2006; Lima *et al.* 2006).

As espécies fúngicas e bacterianas associadas a podridões de rizomas de gengibre estão listadas na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1: Relação dos principais fungos patogênicos associados à podridões pós-colheita de gengibre no mundo.

Patógeno	Sinonímia	Local de ocorrência	Referência
<i>Acremonium murorum</i> (Corda) W. Gams	<i>Torula cephalosporioides</i> J.F.H. Beyma, <i>Basitorula cephalosporioides</i> (J.F.H. Beyma) G. Arnaud, <i>Torula convoluta</i> Harz, <i>Gliomastix convoluta</i> (Harz) E.W. Mason	China (interceptado nos EUA)	Farr e Rossman 2010
<i>Acremonium stromaticum</i> W. Gams e R. H. Stover	-	Índia	Farr e Rossman 2010
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i> (Link) Zare, W. Gams e Schroers	<i>Verticillium cinnabarinum</i> (Corda) Reinke e Berthold, <i>cinnabarinus</i> Corda, <i>hippocastani</i> Corda, <i>Botrytis lateritia</i> (Ehremberg) Fries, <i>Sporotrichum lateritium</i> Ehremberg, <i>Verticillium lateritium</i> Ehremberg, <i>Botrytis tenera</i> (Nees) Persoon, <i>Verticillium tenerum</i> Nees, <i>Sporotrichum vile</i> P. Karten, <i>Verticillium vile</i> (P. Karten) S. Hughes	China (interceptado nos EUA); Brasil	Farr e Rossman 2010; Pereira <i>et al.</i> 2006
<i>Alternaria</i> sp.	-	China	Farr e Rossman 2010
<i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler	<i>Alternaria fasciculata</i> (Cooke e Ellis) L.R. Jones e Grout, <i>Alternaria rugosa</i> McAlpine, <i>Alternaria tenuis</i> Nees, <i>Macrosporium fasciculatum</i> Cooke e Ellis, <i>Torula alternata</i> Fries	Brasil, China	Mendes e Urben 2010; Farr e Rossman 2010
<i>Alternaria solani</i> (Ellis e G. Martin) L.R. Jones)	<i>Alternaria alli</i> Nolla, <i>Alternaria porri</i> (Ellis) Cif.	Brasil	Mendes e Urben 2010
<i>Alternaria tenuissima</i> (Ness) Wiltshire	-	África do Sul, Fiji, Mauritius, Taiwan, Austrália, EUA, Venezuela	Farr e Rossman 2010

<i>Cladosporium</i> sp.	-	Brasil	Ceresini e Nazareno 2005
<i>Cladosporium tenuissimum</i> Cooke	-	Índia	Dohoo e Sharma 1997
<i>Colletotrichum capsici</i> (Sydow) E.J. Butler e Bisby	-	Brasil, Brunei Darussalam, China, Índia	Farr e Rossman 2010
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penzig) Saccardo	<i>Gloeosporium affine</i> Sacc., <i>Gloeosporium alborubrum</i> Petch, <i>Gloeosporium fructigenum f. americana</i> Krüger, <i>Gloeosporium anthurii</i> Allesch., <i>Colletotrichum anthurii</i> , <i>Phyllosticta araliae</i> Ellis e Everh., <i>Ramularia arisaematis</i> Ellis e Dearn., <i>Phyllosticta asclepiadearum</i> Westend., <i>Gloeosporium begoniae</i> Magnaghi, <i>Colletotrichum chardonianum</i> Nolla, <i>Colletotrichum derridis</i> Hoof, <i>Colletotrichum dracanae</i> Allesch., <i>Gloeosporium epicarpi</i> Thüm., <i>Phyllosticta everhartii</i> Sacc. e P. Syd., <i>Gnomoniopsis fructigena</i> (Berk.) G.P. Clinton, <i>Glomerella fructigenum</i> Berk., <i>Glomerella fructigenum f. germanica</i> Krüger, <i>Glomerella fructigenum f. hollandica</i> H.R.A. Muller, <i>Gloeosporium kaki</i> Hori, <i>Gloeosporium limetticola</i> R.E. Clausen, <i>Gloeosporium fructigenum f. limetticola</i> (R.E. Clausen) G.J.M. Gorter, <i>Gloeosporium mangiferae</i> Henn., <i>Gloeosporium olivarum</i> J.V. Almeida, <i>Gloeosporium fructigenum f. olivarum</i> (J.V. Almeida) J.G.M. Gorter, <i>Protocoronospora phoradendri</i> Darling, <i>Kabatiella phoradendri</i> (Darling) Harv., <i>Microstroma harposporum var. phoradendri</i> (Darling) W.B. Cooke, <i>Colletotrichum tabaci</i> Böning	China, EUA	Farr e Rossman 2010

<i>Colletotrichum graminicola</i> (Cesati) G.W. Wilson	<i>Steirochaete graminicola</i> (Ces.) Sacc., <i>Colletotrichopsis graminicola</i> (Ces.) Munt.-Cvetk.	Brasil	Mendes e Urben 2010
<i>Curvularia</i> sp.	-	Papua Nova Guiné	Farr e Rossman 2010
<i>Curvularia geniculata</i> (Tracy e Earle) Boedijin	-	China	Farr e Rossman 2010
<i>Fusarium</i> sp.	-	Brasil, Austrália, EUA, Malásia	Farr e Rossman 2010
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>zingiberi</i> Trujillo E.E.	-	Austrália, Coréia, Índia, Brasil	Farr e Rossman 2010; Rao 1966; Stirling 2004; Trujillo 1963; Domingues 2006
<i>Fusarium solani</i> (Martius) Saccardo	-	Brasil, Coréia, EUA	Mendes e Urben 2010; Farr e Rossman 2010; Ceresini e Nazareno 2005
<i>Graphium album</i> (Corda) Saccardo	-	Índia	Dohoo e Sharma 1997
<i>Gliocladium roseum</i> Bainier G.	-	Índia	Dohoo e Sharma 1997
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Patouillard) Griffon e Maublanc	<i>Lasiodiplodia nigra</i> K.R. Appel e Laubert, <i>Lasiodiplodia tubericola</i> Ellis e Everh., <i>Diplodia tubericola</i> (Ellis e Everh.) Taubenh., <i>Botryodiplodia tubericola</i> (Ellis e Everh.) Petr., <i>Botryodiplodia theobromae</i> Patouillard	Índia	Farr e Rossman 2010
<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goidànich	<i>Rhizoctonia lamellifera</i> , <i>Macrophoma phaseoli</i> , <i>Dothiorella phaseoli</i> , <i>Macrophomina phaseoli</i> , <i>Botryodiplodia phaseoli</i> , <i>Tiarosporella phaseoli</i>	Índia	Vikram e Kushalappa 2006; Farr e Rossman 2010

<i>Memnoniella echinata</i> (Rivolta) Galloway	<i>Spinomyces japonicus</i> Saito	China	Farr e Rossman 2010
<i>Memnoniella zingiberis</i> Rao V.	-	Índia	Farr e Rossman 2010
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	-	Malásia	Farr e Rossman 2010
<i>Mucor racemosus</i> Fresenius	<i>Mucor racemosus</i> f. <i>brunneus</i> Morini, <i>Mucor christianensis</i> Hagem, <i>Mucor racemosus</i> var. <i>christianensis</i> (Hagem) Naumov, <i>Mucor dimorphosporus</i> Lendn., <i>Mucor pispékii</i> Naumov, <i>Circinomucor racemosus</i> (Fresen.) Arx, <i>Mucor varians</i> Povah	Índia	Dohoo 2005; Farr e Rossman 2010
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berkeley e Broome) Petch	<i>Basisporium gallarum</i> Molliard, <i>Nigrospora gallarum</i> (Molliard) Potl., <i>Nigrospora gorlenkoana</i> Novobr.	África do Sul	Farr e Rossman 2010
<i>Penicillium</i> sp.	-	Brasil	Ceresini e Nazareno 2005
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	<i>Penicillium biourgeianum</i> K.M. Zalessky, <i>Penicillium brunneostoloniferum</i> S. Abe, <i>Penicillium brunneostoloniferum</i> S. Abe ex C. Ramírez, <i>Penicillium griseobrunneum</i> Dierckx, <i>Penicillium hagemii</i> K.M. Zalessky, <i>Penicillium monstrosus</i> Sopp, <i>Penicillium patris-mei</i> K.M. Zalessky, <i>Penicillium stoloniferum</i> Thom, <i>Penicillium szaferi</i> KM Zalessky, <i>Penicillium tabescens</i> Westling	Dinamarca	Overy e Frisvad 2005
<i>Phytophthora nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> (Dastur) G. M. Waterhouse	<i>Phytophthora melongenae</i> var. <i>ananaphthoros</i> Sideris, <i>Phytophthora manoana</i> Sideris, <i>Phytophthora melongenae</i> Sawada, <i>Phytophthora nicotianae</i> (Breda de Haan) G.W. Wilson, <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> (Breda de Haan) Tucker, <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>rhei</i> G.H. Godfrey, <i>Phytophthora tabaci</i> Sawada, <i>Phytophthora terrestris</i> Sherb., <i>Blepharospora terrestris</i> (Sherb.)	Brasil	Mendes e Urben 2010

Peyronel					
<i>Pythium aphanidermatum</i> (Edson) Fitzpatrick	<i>Pythium butleri</i> Sideris, <i>Nematosporangium aphanidermatum</i> var. <i>hawaiiense</i> Sideris	Subraman, (Subraman)	EUA	Kavita e Thomas 2008; Farr e Rossman 2010	
<i>Pythium graminicola</i> Subramaniam	-		EUA	Farr e Rossman 2010	
<i>Pythium myriotylum</i> Drechsler	-		Coréia, Malásia, Taiwan	Farr e Rossman 2010; Wang <i>et al.</i> 2003	
<i>Pythium ultimum</i> Trow	<i>Pythium haplomitri</i> Lilienfeld		Brasil, Índia	Ceresini e Nazareno 2005; Dohoo 2005	
<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kuhn	<i>Moniliopsis aderholdii</i> Ruhland, <i>Rhizoctonia aderholdii</i> (Ruhland) Marchion, <i>Rhizoctonia gossypii</i> var. <i>aegyptiaca</i> Forsten, <i>Rhizoctonia solani</i> var. <i>ambigua</i> E. Bald. e Cabrini, <i>Rhizoctonia betae</i> Eidam, <i>Rhizoctonia borealis</i> J.T. Curtis, <i>Rhizoctonia dichotoma</i> H.K. Saksena e Vaartaja, <i>Rhizoctonia dimorpha</i> Matz, <i>Rhizoctonia ferruginea</i> Matz, <i>Rhizoctonia fusca</i> Rostr., <i>Rhizoctonia gossypii</i> , <i>Rhizoctonia grisea</i> (J.A. Stev) Matz, <i>Sclerotium griseum</i> J.A. Stev., <i>Rhizoctonia solani</i> var. <i>hortensis</i> Schultz, <i>Rhizoctonia solani</i> var. <i>lycopersici</i> Schultz, <i>Rhizoctonia macroesclerotia</i> Matz, <i>Rhizoctonia melongenae</i> Matz, <i>Rhizoctonia microesclerotia</i> Matz, <i>Pellicularia filamentosa</i> f. <i>microsclerotia</i> (Matz) Boidin, Mugnier e Canales, <i>Pellicularia filamentosa</i> f. <i>sp.microsclerotia</i> (Matz) Exner, <i>Corticium microsclerotium</i> (Matz) G.F. Weber, <i>Rhizoctonia mucoroides</i> G.E. Bernard, <i>Rhizoctonia napae</i> Westend, <i>Rhizoctonia napaeae</i> Westend e Wallays,	Ruhland, (Ruhland)	Austrália, Brasil, China, Coréia, EUA	Mendes e Urben 2010; Farr e Rossman 2010	

	<i>Rhizoctonia potomacensis</i> Wollenw., <i>Rhizoctonia solani</i> var. <i>typica</i> Sneh, Burpee e Ogoshi		
<i>Sclerotium rolfsii</i> - Saccardo		África do Sul, Austrália, Brasil, EUA, Venezuela	Farr e Rossman 2010; Stirling 2004; Moreira <i>et al.</i> 2006
<i>Stachybotrys</i> - <i>sansevieriae</i> G.P. Agarwal e N.D. Sharma		Índia	Dohoo e Sharma 1997
<i>Pochonia</i> <i>chlamydosporia</i> (Goddard) Zare e W. Gams	<i>Verticillium chlamydosporium</i> Goddard	Índia, Brasil	Dohoo e Sharma 1997; Ceresini e Nazareno 2005; Farr e Rossman 2010

Tabela 2: Relação das principais bactérias patogênicas associadas à podridões pós-colheita de gengibre no mundo.

Patógeno	Sinónímia	Local de ocorrência	Referência
<i>Enterobacter</i> sp.	-	Austrália	Stirling 2004
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> (Hormaeche e Edwards) Hoffmann <i>et al.</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> (Jordan) Hormaeche e Edwards	EUA	Nishijima <i>et al.</i> 2004
<i>Dickeya chrysanthemi</i> (Brenner, Steigerwalt, Miklos e Fanning) Samson, Legendre, Christen, Saux, Achouak e Gardan	<i>Erwinia chrysanthemi</i> Burkholder, McFadden e Dimock, <i>Pectobacterium chrysanthemi</i> (Burkholder, McFadden e Dimock) Brenner, Steigerwalt, Miklos e Fanning	Austrália, Brasil	Malavolta Jr. e Almeida 1998; Stirling 2002; 2004
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith E.F.) Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta e Nishiuchi, raça 4	<i>Pseudomonas solanacearum</i> Smith E.F., raça 4	EUA, Índia	Ishii e Aragaki 1963; Dake e Edison 1989

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem de rizomas de gengibre

3.1.1. Amostragem de rizomas com sintomas de podridões durante armazenamento refrigerado

Foram amostrados rizomas que apresentaram podridão fúngica durante o armazenamento refrigerado, para isolamento direto, identificação e testes de patogenicidade. A primeira amostragem foi realizada em novembro de 2006, após 15 dias a 13 ± 1 °C em câmara fria na Empresa Gaia Importação e Exportação Ltda, localizada no município de Santa Leopoldina, ES (latitude 20°06'04"S, longitude 40°31'47"W). Outra amostragem foi realizada em abril de 2009, após 90 dias a 13 ± 1 °C em câmara fria no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG. As propriedades de origem destes rizomas estão localizadas no município de Santa Maria de Jetibá, ES (latitude 20°01'28"S, longitude 40°44'08"W).

3.1.2. Amostragem de rizomas com sintomas de podridões no campo

Foram amostrados rizomas que apresentaram podridão durante a colheita, para isolamento direto e indireto de fungos e isolamento de bactérias, além de identificação e testes de patogenicidade dos organismos isolados. As coletas foram realizadas em cinco propriedades do município de Santa Leopoldina, ES, em setembro de 2008: 'Califórnia' (P1), 'Rio Bonito' (P2), 'Holanda' (P3), 'Caramurú' (P4) e 'Rio das Farinhas' (P5). Em cada propriedade, foram coletados 20 rizomas de tamanho 'médio' (entre 180 e 400g), apresentando algum tipo de podridão, num total de 100 rizomas. Os mesmos foram armazenados a 13 ± 1 °C em câmara fria durante um período de quatro meses, no Departamento de Fitopatologia/UFV.

3.2. Isolamento de fungos

Os isolamentos direto e indireto de fungos foram realizados de acordo com Alfenas *et al.* (2007), utilizando-se meio BDA acrescido de rifamicina a 0,004 g/L. Todos os rizomas amostrados foram avaliados.

3.3. Identificação das espécies fúngicas associadas

Os fungos isolados foram repicados para BDA e MEA (Extrato de Malte-Ágar) Zauza *et al.* (2007) a fim de induzir o crescimento micelial, e para o meio CVA (Caldo de Vegetais-Ágar) (Pereira *et al.* 2007), a fim de induzir a esporulação.

As estruturas reprodutivas foram montadas em lactofenol ou lactofuccina e observadas em microscópio de luz.

A identificação dos fungos foi baseada nas referências Genera of Hyphomycetes (Carmichael *et al.* 1980), Compendium of Soil Fungi (Domsch *et al.* 2007), Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes Vols. I e II (Hanlin 1998), Illustrated Genera of Ascomycetes Vol. I (Hanlin 1990), The Coelomycetes, fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata (Sutton 1980), *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification (Nelson *et al.* 1983), The *Fusarium* Laboratory Manual (Leslie e Summerell 2006), *Alternaria* – An Identification Manual (Simmons 2007).

Análise molecular

A identificação da espécie *Fusarium graminearum* Schwabe foi confirmada por meio de análise molecular. O isolado FNG001 foi avaliado quanto à sua seqüência de bases nitrogenadas na região ITS (Internal Transcribed Sequence) do DNA ribossomal, utilizando-se os oligonucleotídeos sintéticos específicos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.* 1990). A extração de DNA seguiu o método CTAB (Murray e Thompson 1980), utilizando-se colônias desenvolvidas em meio líquido BD por 14 dias a 27 °C. O DNA extraído foi purificado utilizando-se o kit GFX PCR DNA Life Science - GE Healthcare, quantificado por espectrofotometria em $\lambda=260$ nm, e verificado o número de pares de bases por meio de eletroforese em gel de agarose (g/L: 12,00) com brometo de etídeo ($\mu\text{L/L}$: 1,00), utilizando-se um marcador. A reação de PCR (Polimerase Chain Reaction) foi composta de: 3 μL de DNA purificado, 31,5 μL de água mili-Q autoclavada, 5 μL de Tampão 10X, 3 μL do primer ITS1, 3 μL do primer ITS4, 4 μL de dntp, 0,5 μL de Taq polimerase. Os fragmentos foram amplificados por PCR, seguindo a seguinte reação, em termociclador PTC-100 – Programmable Thermal Controller – MJ Research Inc.: passo1: 95 °C/ 5 minutos; passo2: 94 °C/ 1 minuto; passo3: 58 °C/ 1 minuto; passo4: 72 °C/ 1 minuto; passo5: passos 2 ao 4 são repetidos 38 vezes; passo6: 72 °C/ 5

minutos; término: 4 °C. As seqüências senso e anti-senso obtidas foram manualmente editadas para gerar a seqüência consenso, por meio do programa ‘The Staden Package’ vs.1.6.0 (Staden *et al.* 1999). Em seguida, foram alinhadas utilizando o programa Clustal W (Haggins *et al.* 1994) e ajustadas manualmente por meio do programa Mega 4.1 (Kumar *et al.* 2008). As espécies selecionadas para a análise de agrupamento estão listadas na Tabela 3. A análise de Neighbour Joining foi realizada, sendo o modelo utilizado Kimura-2-Parâmetros (Kimura 1980). Os valores do suporte bootstrap foram feitos com 1000 repetições.

Tabela 3: Relação de espécies de *Fusarium* e seus respectivos códigos correspondentes a seqüências de nucleotídeos da região ITS do rDNA disponíveis no GenBank/NCBI utilizadas para a análise de agrupamento com seqüência do isolado SIM001.

<i>Espécie</i>	<i>Sinonímia</i>	<i>Seção no gênero Fusarium</i>	<i>Código GenBank/ Sequências ITS</i>	<i>Referência</i>
¹ <i>Giberella zeae</i>	<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe; *Fg Group2	**Discolor	DQ459831.1 GQ221859.1 NRRL413 GQ466391.1 GQ221858.1	-
¹ <i>F. cortaderiae</i>	<i>F. graminearum</i> ; <i>G. zeae</i> ; *Fg Group2	**Discolor	DQ459858.1 DQ459857.1	O'Donnell <i>et al.</i> 2004
¹ <i>F. asiaticum</i>	<i>F. graminearum</i> ; <i>G. zeae</i> ; *Fg Group2	**Discolor	AB289550.1	O'Donnell <i>et al.</i> 2004
¹ <i>F. acaciae-mearnsii</i>	<i>F. graminearum</i> ; <i>G. zeae</i> ; *Fg Group2	**Discolor	DQ459852.1	O'Donnell <i>et al.</i> 2004
¹ <i>F. boothii</i>	<i>F. graminearum</i> ; <i>G. zeae</i> ; *Fg Group2	**Discolor	DQ459847.1	O'Donnell <i>et al.</i> 2004
¹ <i>F. meridionale</i>	<i>F. graminearum</i> ; <i>G. zeae</i> ; *Fg Group2	**Discolor	DQ459842.1	O'Donnell <i>et al.</i> 2004
¹ <i>F. austroamericanum</i>	<i>F. graminearum</i> ; <i>G. zeae</i> ; *Fg Group2	**Discolor	DQ459839.1	O'Donnell <i>et al.</i> 2004
¹ <i>F. brasiliicum</i>	<i>F. graminearum</i> ; <i>G. zeae</i> ; *Fg Group2	**Discolor	DQ459861.1	O'Donnell <i>et al.</i> 2004
¹ <i>F. pseudograminearum</i>	<i>Giberella coronicola</i> ; *Fg Group1	**Discolor	DQ459871.1	(Aoki e O'Donnell 1999)
¹ <i>F. vorosii</i>	-	-	FJ240315.1	-
¹ <i>F. culmorum</i>	-	**Discolor	FJ537074.1	-
¹ <i>F. crookwellense</i>	<i>F. cerealis</i> (Cooke) Saccardo	**Discolor	NBAIM784	-
¹ <i>F. lunulosporum</i>	-	-	FLU85537	-

*: Fg Groups: Grupos do complexo de espécies *Fusarium graminearum*; Fg Group1 = *F. pseudograminearum*; Fg Group2 = *F. graminearum* [Leslie e Summerell (2006) consideram as espécies deste grupo como *F. graminearum*];

** : Membros da Seção Discolor geralmente não apresentam microconídeos;

***: Membros da Seção Sporotrichiella produzem microconídeos.

¹: Indicado pelo BLAST/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>) quando a região ITS rDNA do isolado SIM001 foi avaliada.

²: Semelhanças morfológicas e de colônia com o isolado SIM001.

³: Utilizado como *outgroup*.

Tabela 3 (continuação): Relação de espécies de *Fusarium* e seus respectivos códigos correspondentes a seqüências de nucleotídeos da região ITS do rDNA disponíveis no GenBank/NCBI utilizadas para a análise de agrupamento com seqüência do isolado d-P1R7.

<i>Espécie</i>	<i>Sinonímia</i>	<i>Seção no gênero Fusarium</i>	<i>Código GenBank/ Seqüências ITS</i>	<i>Referência</i>
² <i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. sporotrichiella</i> var. <i>sporotrichioides</i>	***Sporotrichiella	FN386269.1	-
² <i>F. clamydosporum</i>	<i>F. sporotrichioides</i> var. <i>clamydosporum</i>	***Sporotrichiella	FJ545388.1 QG121289.1 GQ121312.1 FJ545396.1 FJ545407.1 FJ545398.1 FJ545389.1 FJ545405.1 FJ545400.1 FJ545392.1 FJ545399.1 FJ545394.1 FJ545395.1 FJ545402.1 FJ545393.1 GQ149773.1 GQ149770.1	-
² <i>F. tricinctum</i>	<i>G. tricincta</i> ; <i>F. sporotrichioides</i> var. <i>tricinctum</i>	***Sporotrichiella	AB470843.1 AB470855.1	-
³ <i>F. solani</i>	<i>N. haematococca</i>	Martiella & Ventricosum	ZMS2973	-

*: *Fg* Groups: Grupos do complexo de espécies *Fusarium graminearum*; *Fg* Group1 = *F. pseudograminearum*; *Fg* Group2 = *F. graminearum* [Leslie e Summerell (2006) consideram as espécies deste grupo como *F. graminearum*];

** : Membros da Seção *Discolor* geralmente não apresentam microconídeos;

***: Membros da Seção *Sporotrichiella* produzem microconídeos.

¹: Indicado pelo BLAST/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>) quando a região ITS rDNA do isolado SIM001 foi avaliada.

²: Semelhanças morfológicas e de colônia com o isolado SIM001.

³: Utilizado como *outgroup*.

3.4. Testes de patogenicidade dos fungos isolados

3.4.1. Capacidade de colonização da superfície cortada

Rizomas sadios foram lavados em água corrente e sanitizados com imersão em hipoclorito de sódio a 10^{-4} g/L por 5 minutos e cortados com faca previamente flambada em fatias de aproximadamente 3 mm de espessura. Um disco de micélio de 9 mm de diâmetro de colônias desenvolvidas em BDA por 14 dias, a 27 °C, em câmara de crescimento, foi disposto sobre cada fatia de rizoma de gengibre. Estes foram incubados por 14 dias a 27 °C, em câmara úmida previamente esterilizada, composta por placa de Petri, três camadas de papel filtro umedecidos com água destilada e um anteparo de vidro. Foram utilizados três isolados por espécie, com três repetições (fatias de rizoma) para cada isolado, num total de nove repetições por espécie fúngica. Como controle, foi utilizado discos de BDA. Somente para aqueles fungos que foram capazes de colonizar a superfície cortada, realizou-se o teste de capacidade de colonização a partir da superfície perfurada, com rizomas inteiros.

3.4.2. Capacidade de colonização e de incitar podridão a partir da superfície perfurada

Rizomas sadios foram sanitizados, como descrito no item 3.4.1., perfurados com haste metálica de 1 mm de diâmetro, previamente flambada. Foram feitos três conjuntos de furos em cada rizoma constituídos de cinco furos cada, sobre os quais colocaram-se discos de micélio de 9 mm de diâmetro de colônias desenvolvidas em BDA por 14 dias a 27 °C em câmara de crescimento, totalizando-se três discos de micélio para cada rizoma. O teste foi realizado utilizando-se três rizomas por espécie fúngica. Como controle, foi utilizado discos de BDA. Após o posicionamento dos discos de micélio sobre os furos, cobriram-se os mesmos com filme de PVC, e os rizomas foram acondicionados em câmara úmida composta por sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD) e pedaços de algodão umedecido, por 14 dias e temperatura em torno de 25°C. Os sacos foram abertos diariamente por 1 minuto, para extravasamento do excesso de CO₂. Após o período de incubação, os rizomas foram cortados transversalmente no local de inoculação para a observação dos sintomas.

3.5. Isolamento de bactérias

Adotou-se, com modificações, o isolamento proposto por Nishijima *et al.* (2004) para *E. cloacae* em rizomas de gengibre: imersão dos fragmentos de gengibre em álcool absoluto; flambagem; imersão em água destilada esterilizada por 2 minutos; imersão da alça de repicagem na água; riscagem de estrias compostas em placa de Petri com meio Nutriente-Ágar (NA); incubação a 27°C por 48 horas; repicagem de colônias isoladas.

Rizomas com podridão-mole, apresentando odor fétido, tecidos macerados e presença de pus bacteriano na superfície cortada foram utilizados para isolamento com o toque da alça de repicagem diretamente no pus bacteriano, seguindo-se da realização de estrias compostas em placa de Petri com NA. Após incubação a 27°C por 48 horas, as colônias isoladas foram repicadas.

3.6. Testes de patogenicidade de bactérias

Para determinar a patogenicidade dos isolados bacterianos, foram feitas inoculações em superfície cortada de rizomas, de acordo com Nishijima *et al.* (2004), com modificações, e seguindo-se os passos: imersão dos rizomas sadios em solução de hipoclorito de sódio a 10^{-4} g/L por 5 minutos; corte de fatias de aproximadamente 3 mm de espessura; disposição dos discos de rizoma em câmara úmida, formada por placa de Petri esterilizada e três camadas de papel-filtro esterilizadas umedecidas com água destilada esterilizada, com quatro discos de rizoma por placa por isolado. As fatias foram inoculadas utilizando-se bactérias crescidas por 48 horas em meio NA a 27°C, e os resultados foram avaliados após 6 dias de incubação a 27°C. Foi utilizado como controle discos de rizoma não inoculados, com três repetições. Os isolados que causaram algum tipo de sintoma nas fatias de rizoma, descoloração ou podridão, foram submetidos a novos testes. O '2º teste' foi realizado da mesma forma que o primeiro, mas diferindo pela presença de um anteparo de vidro para apoiar um disco de rizoma por placa, separando assim o segmento de gengibre do papel filtro umedecido. O '3º teste' foi feito semelhantemente ao primeiro, sem o anteparo de vidro. Os isolados que apresentaram repetibilidade em apresentar resultado positivo para sintomas de doenças foram selecionados para a identificação.

3.7. Identificação de espécies bacterianas

As identificações em nível de gênero e espécie dos isolados bacterianos patogênicos foram realizadas, principalmente, com base nas características bioquímicas descritas no Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Schaad *et al.* 2001) e no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (Brenner *et al.* 2005). Todos os testes foram repetidos pelo menos duas vezes. Também foi realizada a análise do perfil de ácidos graxos, utilizando-se as bibliotecas IR2A 1.0 e ITSA 1.0 do sistema Sherlock[®] Midi (Midi, Newark, DE).

Para a realização dos testes de identificação em nível de gênero, os isolados bacterianos foram previamente semeados em meio NA e incubados por 48 horas a 27 °C. Os testes realizados foram reação de Gram (Ryu 1940), crescimento anaeróbio (Hugh e Leifson 1953), fluorescência sob luz UV (King *et al.* 1954), oxidase e urease (Schaad *et al.* 2001).

Os testes feitos para identificação em nível de espécie foram realizados utilizando-se colônias previamente crescidas por 48 horas a 27°C em meio de Kado e Heskett líquido (1970). Os testes realizados foram desidrolase arginínica (Thornley 1960); formação de levana, utilização dos açúcares sacarose, D-manose, D-manitol, D-maltose, D-trealose, L-arabionose ou eritritol como única fonte de carbono, liquefação de gelatina (Schaad *et al.* 2001); podridão em tubérculos de batata (Schaad *et al.* 2001), redução de nitrato a N₂ (Fahy e Parsley 1983), lisina e ornitina descarboxilases (Moeller 1955) e análise do perfil de ácidos graxos.

RESULTADOS

4.1. Fungos

4.1.1. Fungos associados

As espécies fúngicas encontradas na primeira amostragem feita durante armazenamento refrigerado, em Santa Leopoldina, ES, foram *Acrostalagmus luteo-albus*, *Acremonium murorum*, *Fusarium graminearum* e *Lasiodiplodia theobromae*, *Sclerotium rolfsii*. Nesta amostragem, *S. rolfsii* apresentou ocorrência em rizomas muito superior que as demais espécies fúngicas (dados não mostrados). Na segunda amostragem feita durante armazenamento refrigerado, em Santa Maria de Jetibá, ES, *A. luteo-albus*, *F. graminearum* e *Fusarium oxysporum* foram encontrados nos rizomas.

A partir dos rizomas com podridão coletados em campo, foram obtidos cerca de 330 isolados fúngicos, somando-se os isolados dos isolamentos direto e indireto, com um total de 16 espécies, listadas na Tabela 4.

A maior média de ocorrência foi de *F. oxysporum*, com cerca de 74%, sendo maior ou igual a 60% em todas as propriedades. A maior incidência foi observada na propriedade 4, onde quase 86% dos rizomas amostrados apresentaram o fungo (Tabela 4). A segunda maior média de ocorrência, de aproximadamente 31%, foi de *F. graminearum*, chegando a 48%, na propriedade 1 (Tabela 4).

Encontrou-se 14 diferentes espécies por meio do método de isolamento direto, e 10 espécies por meio do isolamento indireto. A metade das espécies foi isolada por meio de ambos os métodos de isolamento utilizados (Tabela 5).

Muitas espécies apresentaram um número de isolados aproximado, ao comparar-se um método com o outro. No entanto, para *F. oxysporum*, verificou-se um número de isolados provenientes do isolamento direto duas vezes maior em relação ao isolamento indireto (Tabela 5).

Tabela 4: Porcentagem de ocorrência para espécies fúngicas encontradas nos rizomas coletados em campo, em cinco propriedades.

Fungo	Ocorrência (%)					Média
	P1	P2	P3	P4	P5	
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>	00,00	04,76	00,00	00,00	04,76	01,90
<i>Alternaria tenuissima</i>	14,28	04,76	00,00	00,00	00,00	03,81
<i>Aspergillus niger</i>	00,00	04,76	00,00	04,76	00,00	01,90
<i>Chaetomium</i> sp.	00,00	00,00	00,00	09,52	00,00	01,90
<i>Curvularia geniculata</i>	04,76	00,00	00,00	00,00	00,00	00,95
<i>Epicoccum</i> sp.	00,00	04,76	05,00	00,00	00,00	01,95
<i>Fusarium graminearum</i>	47,62	23,81	20,00	28,57	33,33	30,67
<i>Fusarium oxysporum</i>	66,66	76,19	60,00	85,71	80,95	73,90
<i>Fusarium semitectum</i>	00,00	04,76	05,00	19,05	00,00	05,76
<i>Fusarium solani</i>	19,05	42,86	30,00	14,28	00,00	21,24
<i>Mucor hiemalis</i>	00,00	00,00	00,00	04,76	00,00	00,95
<i>Nigrospora oryzae</i>	9,75	0,00	0,00	0,00	14,28	4,81
<i>Nigrospora sphaerica</i>	9,75	4,76	15,00	0,00	0,00	5,90
<i>Penicillium commune</i>	00,00	14,28	00,00	00,00	00,00	02,86
<i>Verticillium</i> sp. (1)	00,00	00,00	10,00	09,52	00,00	03,90
<i>Verticillium</i> sp. (2)	00,00	00,00	10,00	04,76	04,76	03,90

P1 a P5: propriedades onde foram feitas as coletas.

Tabela 5: Número de isolados fúngicos encontradas nos rizomas coletados em campo, em cinco diferentes propriedades, para o isolamento direto (D) e para o isolamento indireto (I).

Fungo	nº de isolados em cada tipo de isolamento											
	P1		P2		P3		P4		P5		Média	
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0,4
<i>Alternaria tenuissima</i>	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0,2
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0,4	0
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0,2	0,4
<i>Curvularia geniculata</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0
<i>Epicoccum</i> sp.	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0,4	0
<i>Fusarium graminearum</i>	7	4	5	1	3	4	4	4	5	2	4,8	3,8
<i>Fusarium oxysporum</i>	11	11	12	11	11	3	18	4	17	4	13,8	6,6
<i>Fusarium semitectum</i>	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	1	0
<i>Fusarium solani</i>	2	2	7	5	5	1	2	1	0	0	3,2	1,8
<i>Mucor hiemalis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,2	0
<i>Nigrospora oryzae</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0	2	1	0	0	3	0	0	0	0	0,2	1
<i>Penicillium commune</i>	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0,4
<i>Verticillium</i> sp. (1)	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0,8	0
<i>Verticillium</i> sp. (2)	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0,2	0,2

P1 a P5: propriedades onde foram feitas as coletas.

4.1.2. Caracterização molecular

A identificação de *F. graminearum* foi confirmada por meio da análise da região ITS rDNA do isolado FNG001. O alinhamento das seqüências de várias espécies morfologicamente próximas alocou o isolado no 'Clado Fg', composto pelo complexo de espécies '*Fusarium graminearum* Group 2' (Fg Group 2) (O' Donnell *et al.* 2004), consideradas por Leslie e Summerell (2006) como a mesma espécie biológica, *F. graminearum* (Figura 1). Apesar da espécie *Fusarium pseudograminearum*, pertencente ao Fg Group 1 (Aoki e O'Donnell 1999), estar agrupada no Clado Fg, foi descartada a possibilidade do isolado ser identificado como *F. pseudograminearum*, devido à características morfológicas e biológicas (dados não mostrados). As seqüências das espécies do 'Clado Fg' foram distingüidas das demais espécies com suporte de bootstrap de 97%. As espécies da Seção Sporotrichiella apresentaram elevada dissimilaridade em relação às espécies da Seção Discolor, incluindo o isolado FNG001 (Figura 1).

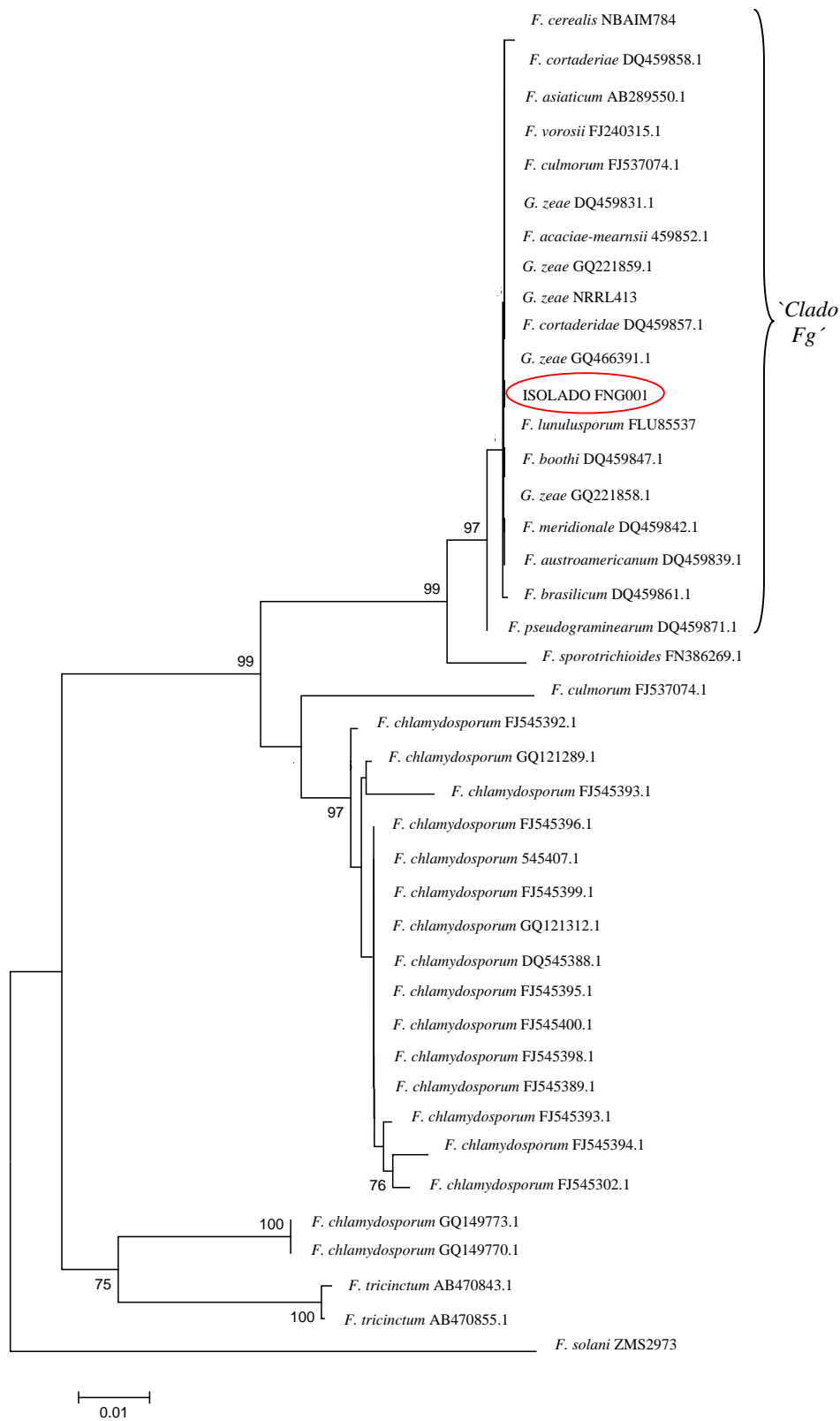


Figura 1: Árvore filogenética obtida com base em seqüências da região ITS do DNA ribossomal utilizando a análise de Neighbour Joining (Kimura 2-parameters). Valores do suporte de bootstrap com 1000 repetições.

4.1.3. Patogenicidade dos fungos associados

No teste realizado para avaliar a capacidade de colonização de superfície cortada, dezesseis das dezenove espécies encontradas apresentaram resultado positivo (Tabela 6). Ao avaliar os resultados obtidos (Figuras 3 e 4), verificou-se que os fungos *M. hiemalis* (Figura 3-E), *N. oryzae* (Figura 3-F) e *Verticillium* sp. (2) (Figura 3-I) não foram capazes de colonizar a superfície cortada, não havendo desenvolvimento micelial a partir dos discos utilizados para a inoculação.

Tabela 6: Testes de patogenicidade de isolados fúngicos encontrados em rizomas de gengibre.

Fungo	Resultados		
	Colonização sup. cortada	Colonização sup. perfurada	Podridão
<i>A. murorum</i>	+	+	+
<i>A. luteoalbus</i>	+	+	+
<i>A. tenuissima</i>	+	+	-
<i>A. Níger</i>	+	+	-
<i>Chaetomium</i> sp.	+	+	-
<i>C. geniculata</i>	+	-	-
<i>Epicoccum</i> sp.	+	+	-
<i>F. graminearum</i>	+	+	+
<i>F. oxysporum</i>	+	+	+
<i>F. semitectum</i>	+	-	-
<i>F. solani</i>	+	+	-
<i>L. theobromae</i>	+	+	+
<i>M. hiemalis</i>	-	NR	NR
<i>N. oryzae</i>	-	NR	NR
<i>N. sphaerica</i>	-	NR	NR
<i>P. commune</i>	+	+	-
<i>S. rolfsii</i>	+	+	+
<i>Verticillium</i> sp. (1)	+	+	-
<i>Verticillium</i> sp. (2)	+	-	-

NR: não realizado.

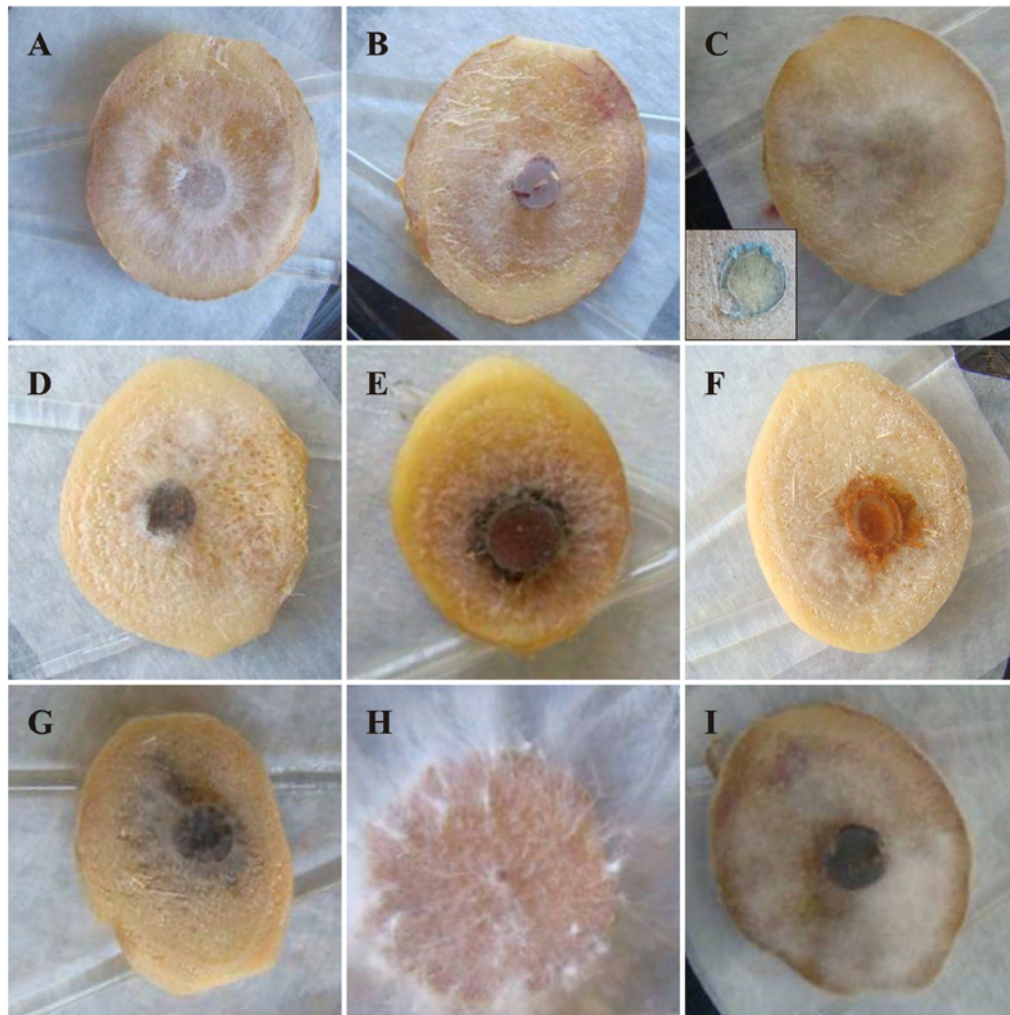


Figura 2: Resultados do teste de patogenicidade após 14 dias a 27°C, para colonização de superfície cortada de rizomas de gengibre inoculados com discos de micélio de culturas desenvolvidas em BDA por 14 dias a 27°C. **A,** *Fusarium oxysporum*; **B,** *Fusarium graminearum*; **C,** *Fusarium solani* (no detalhe, formação de esporodóquios); **D,** *Fusarium semitectum*; **E,** *Acremonium murorum*; **F,** *Acrostalagmus luteo-albus*; **G,** *Lasiodiplodia theobromae*; **H,** *Sclerotium rolfsii*; **I,** *Alternaria tenuissima*.

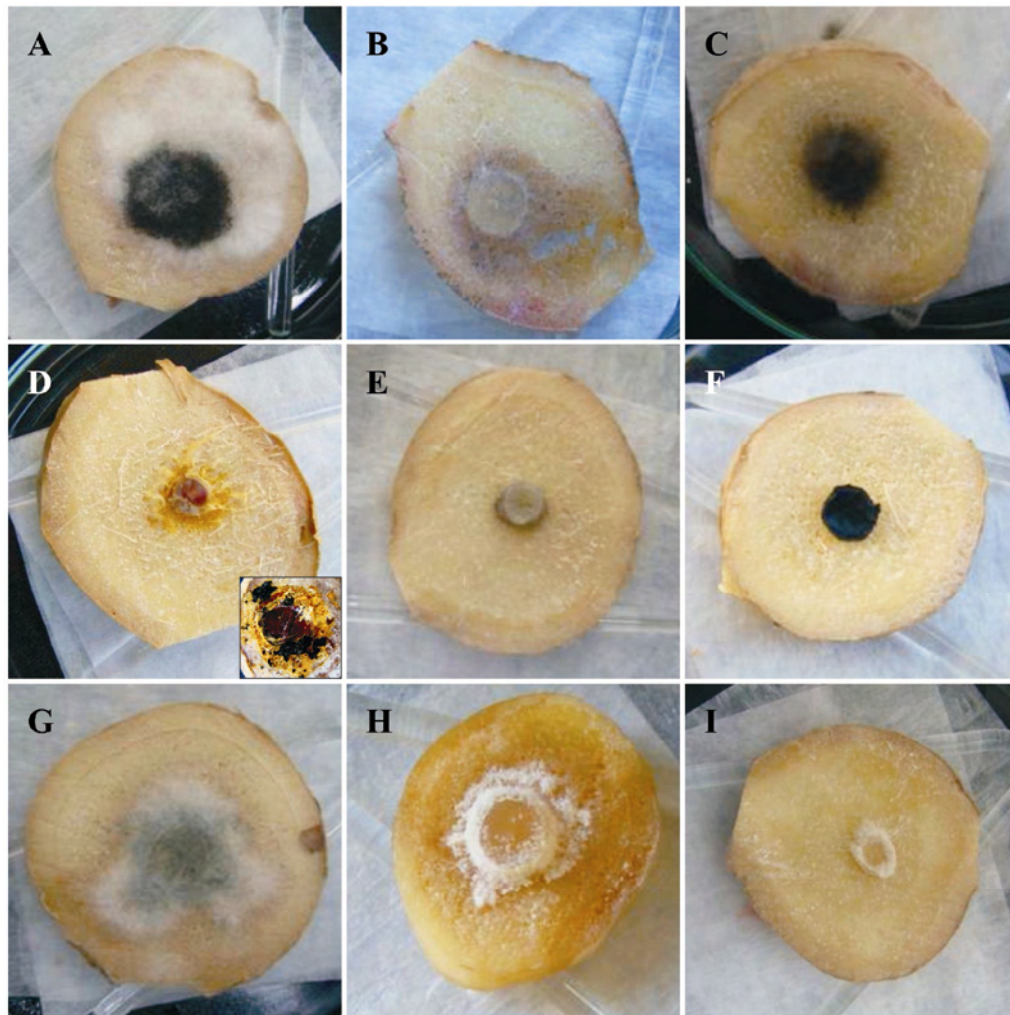


Figura 3: Resultados do teste de patogenicidade após 14 dias a 27°C, para colonização de superfície cortada de rizomas de gengibre inoculados com discos de micélio de culturas desenvolvidas em BDA por 14 dias a 27°C. **A,** *Aspergillus niger*; **B,** *Chaetomium* sp.; **C,** *Curvularia geniculata*; **D,** *Epicoccum* sp. (no detalhe, esporulação); **E,** *Mucor hiemalis*; **F,** *Nigrospora oryzae*; **G,** *Penicillium commune*; **H,** *Verticillium* (1); **I,** *Verticillium* (2).

Dentre as dezesseis espécies consideradas positivas para o primeiro teste, treze foram positivas para o teste de colonização da superfície perfurada, e seis espécies foram capazes de causar podridão (Tabela 6). Durante a avaliação dos resultados do teste (Figuras 4 e 5), considerou-se como positivas aquelas espécies que apresentaram desenvolvimento micelial no interior das perfurações feitas nos rizomas.

O sintoma de podridão causado por *F. oxysporum* se caracterizou pelo escurecimento dos tecidos epidérmicos, hipodérmicos e corticais próximos ao local de inoculação, pela depressão provocada na superfície onde foi posicionado o inóculo, além da colonização micelial de coloração branca, dos tecidos internos e a superfície epidérmica (Figura 4A). Nos rizomas com sintomas causados por infecção natural, observou-se desde um escurecimento (bronzamento) até a podridão negra dos tecidos vasculares (Figura 6A).

A podridão causada por *F. graminearum* causou escurecimento de tecidos epidérmicos, hipodérmicos e corticais adjacentes ao local da inoculação, depressão superficial a partir do local de inoculação, desenvolvimento micelial de coloração vermelha e branca nos tecidos internos e na superfície epidérmica, além da produção de uma pigmentação avermelhada nos locais de colonização (Figura 4B). Nos rizomas com infecção natural foi observado, interna e externamente, abundante desenvolvimento de micélio branco e vermelho, além de abundante produção de pigmento avermelhado (Figura 6B).

Acremonium murorum apresentou desenvolvimento micelial de coloração preta no interior nos orifícios, tendo provocado o escurecimento de tecidos epidérmicos e hipodérmicos periféricos ao local da inoculação (Figura 4E). Foi observada a colonização de micélio preto na região vascular de rizomas com infecção natural do fungo (Figura 6D).

O fungo *A. luteo-albus* produziu, de forma abundante, micélio de coloração alaranjada no interior dos orifícios feitos, além do escurecimento de tecidos epidérmicos e hipodérmicos próximos ao local da inoculação (Figura 4F). Nos rizomas infectados de forma natural verificou-se o desenvolvimento micelial de coloração alaranjada, em regiões internas expostas por cortes (Figura 6C).

Lasiodiplodia theobromae foi responsável pela colonização micelial de coloração preta no interior dos orifícios e na superfície dos rizomas, tendo causado também escurecimento dos tecidos epidérmicos e hipodérmicos adjacentes ao local

de inoculação (Figura 4G). Verificou-se a presença de micélio de coloração preta e branca, além do desenvolvimento de picnídios, em superfícies cortadas de rizomas com infecções naturais do fungo (Figura 6E).

O sintoma de podridão provocado por *S. rolfsii* ocorre com o desenvolvimento micelial de coloração branca no interior das perfurações feitas, escurecimento de tecidos epidérmicos, hipodérmicos e corticais adjacentes e a depressão dos tecidos superficiais sob o local da inoculação (Figura 4H), além de uma rápida colonização, inclusive, da superfície epidérmica dos rizomas (dados não mostrados). Quando os sintomas provocados por infecção natural foram avaliados, verificou-se a uma colonização generalizada de micélio branco, além da produção de numerosos escleródios (Figura 6F).

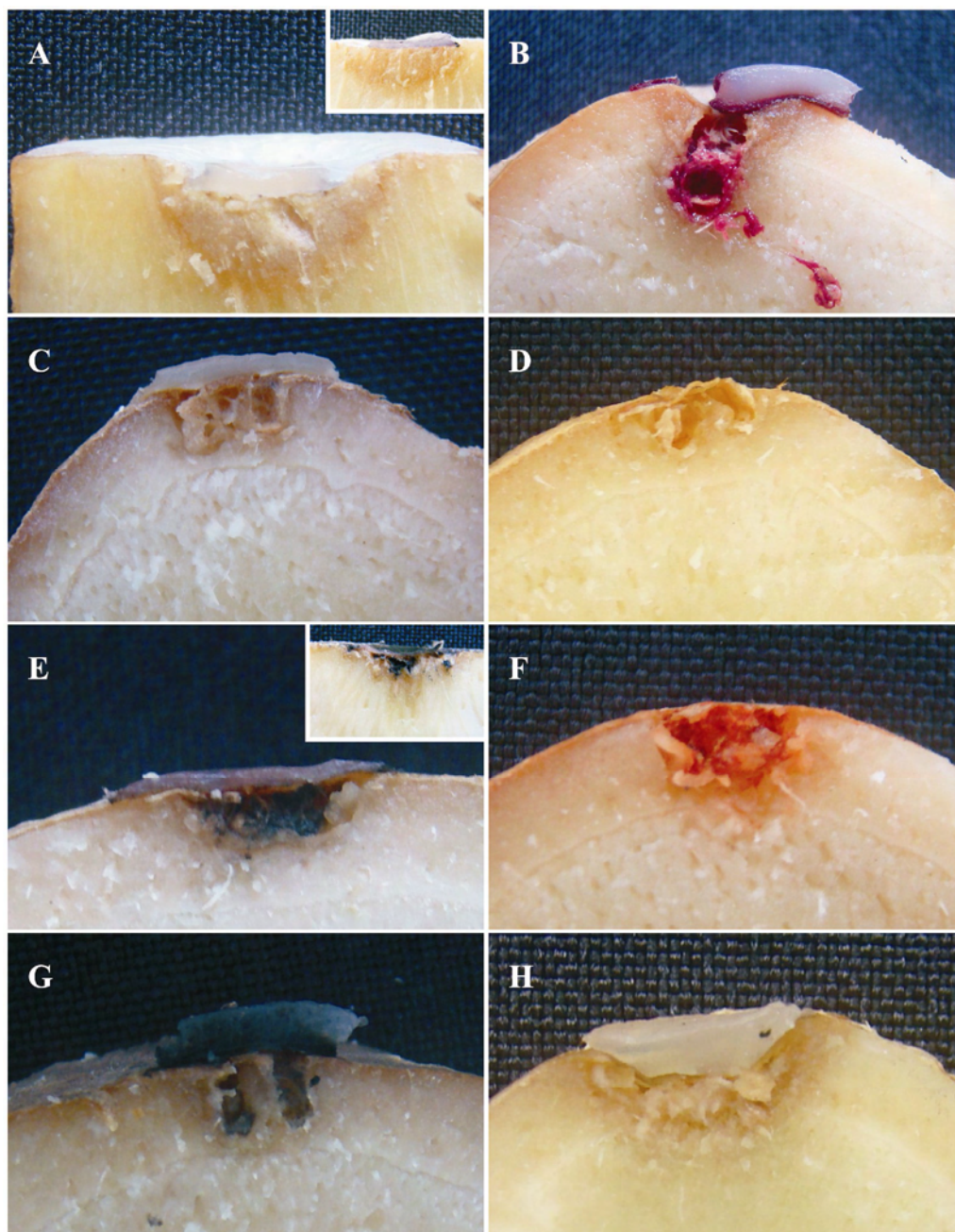


Figura 4: Resultados do teste de patogenicidade após 14 dias a 25°C, para colonização de superfície perfurada e podridão de rizomas de gengibre inoculados com discos de micélio de culturas desenvolvidas em BDA por 14 dias a 27°C – visualização de cortes transversais dos rizomas. **A**, *Fusarium oxysporum*; **B**, *Fusarium graminearum*; **C**, *Fusarium solani*; **D**, *Fusarium semitectum*; **E**, *Acremonium murorum*; **F**, *Acrostalagmus luteo-albus*; **G**, *Lasiodiplodia theobromae*; **H**, *Sclerotium rolfsii*.

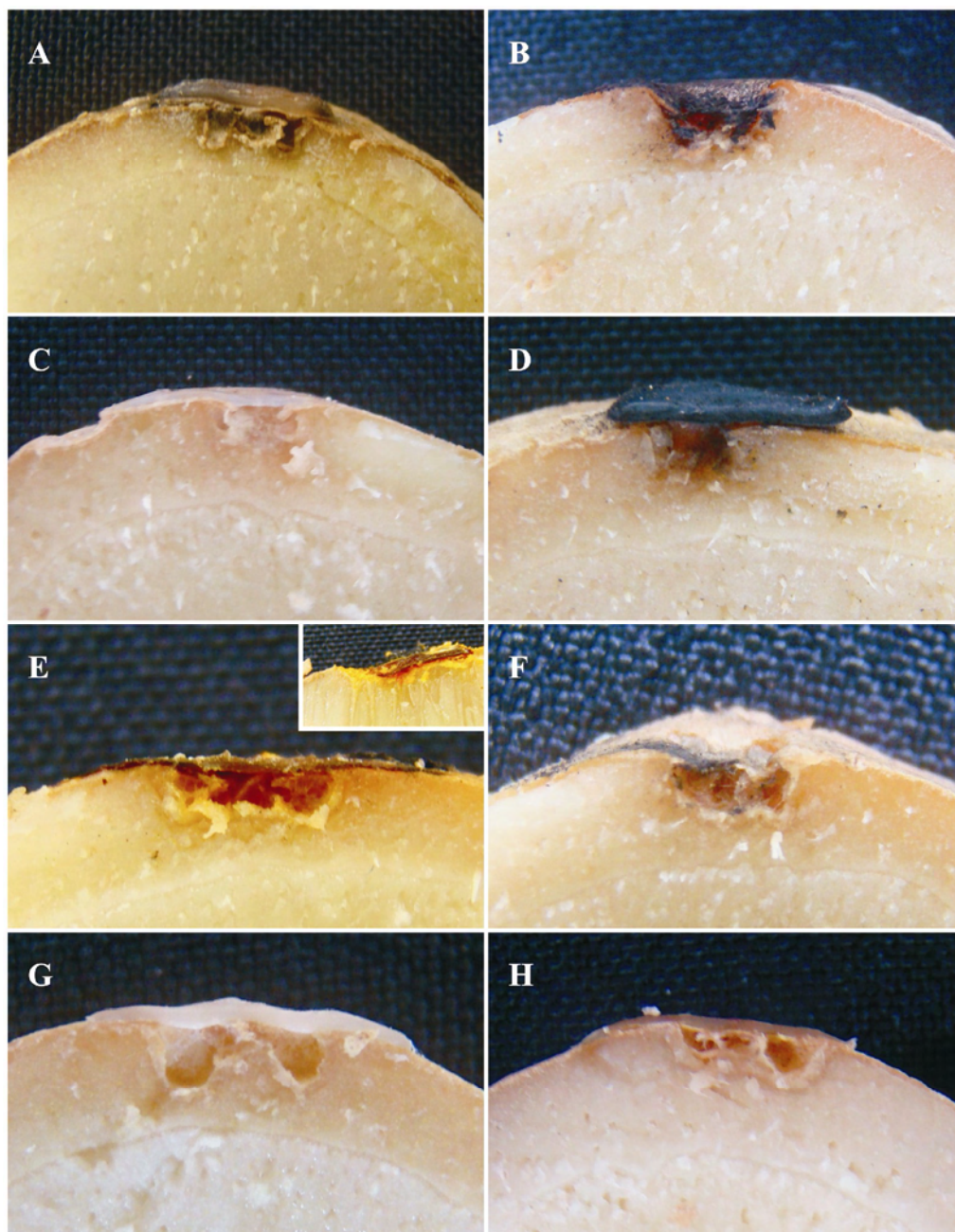


Figura 5: Resultados do teste de patogenicidade após 14 dias a 25°C, para colonização de superfície perfurada e podridão de rizomas de gengibre inoculados com discos de micélio de culturas desenvolvidas em BDA por 14 dias a 27°C – visualização de cortes transversais dos rizomas. **A,** *Alternaria tenuissima*; **B,** *Aspergillus niger*; **C,** *Chaetomium* sp.; **D,** *Curvularia geniculata*; **E,** *Epicoccum* sp.; **F,** *Penicillium commune*; **G,** *Verticillium* (1); **H,** *Verticillium* (2).

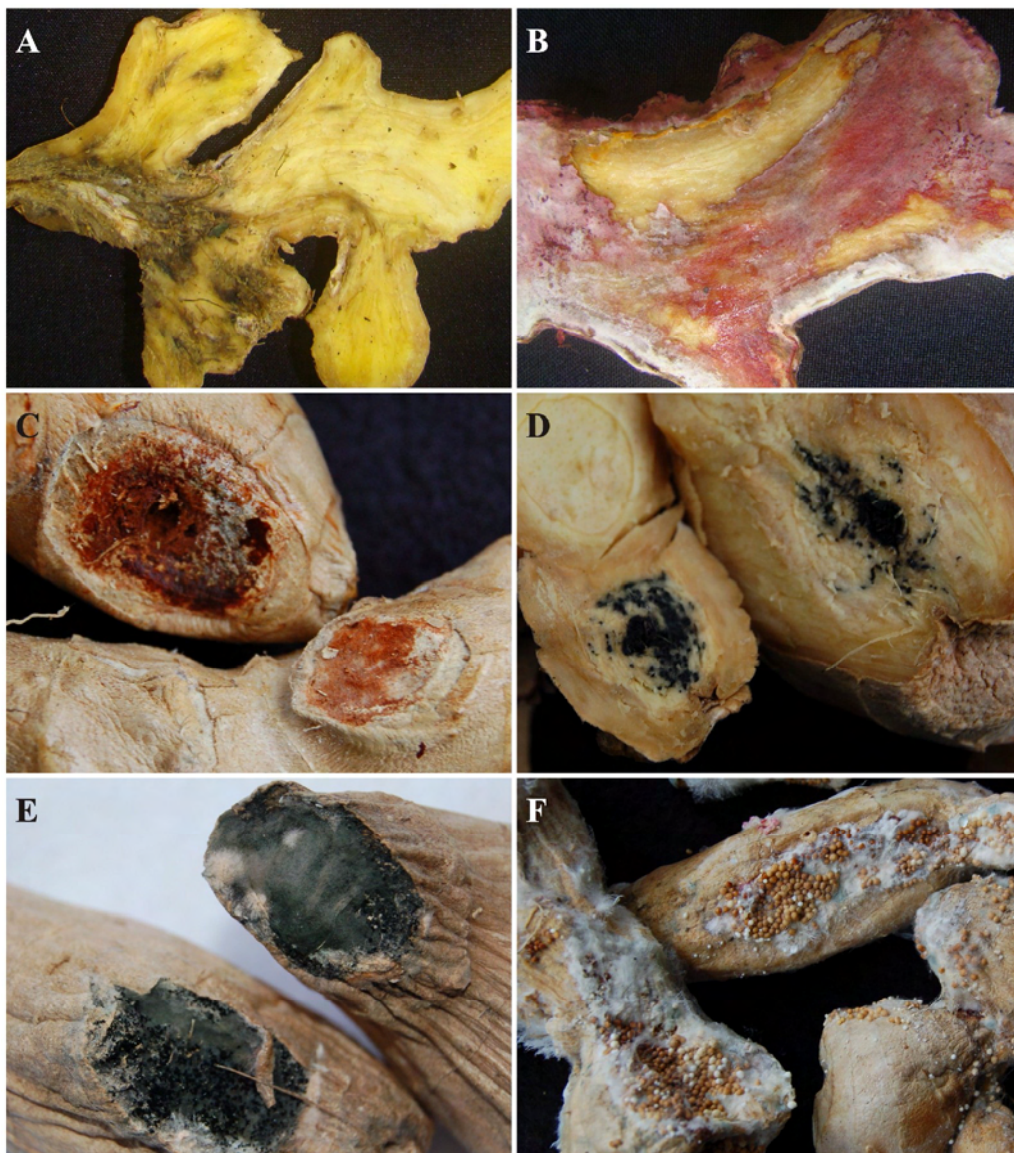


Figura 6: Sintomas e sinais de podridões causadas por *Fusarium oxysporum* (A), *Fusarium graminearum* (B), *Acrostalagmus luteo-albus* (C), *Acremonium murorum* (D), *Lasiodiplodia theobromae* (E), *Sclerotium rolfsii* (F) em rizomas de gengibre.

4.2. Bactérias

4.2.1. Bactérias isoladas de rizomas coletados no campo

Foram observados quatro tipos de colônias bacterianas a partir dos isolamentos realizados: coloração creme, branca, amarela ou vermelha. Observou-se que as colônias de coloração branca ficaram semelhantes às aquelas de coloração creme, após repicagens sucessivas. Foram isoladas, purificadas e utilizadas para testes de patogenicidade 98 isolados de bactérias, a partir de 100 rizomas de gengibre sintomáticos.

4.2.2. Testes de patogenicidade de bactérias

Dentre os 98 isolados avaliados no 1º teste, 12 foram capazes de incitar podridão-mole (Tabela 7), ou seja, cerca de 10% dos isolados. Todos estes apresentaram colônias de coloração creme quando em meio NA. Muitos destes apresentaram sintomas de podridão associados à característica de odor fétido. Apenas três isolados causaram podridão-mole quando realizado o 2º teste, BAC001, BAC003 e BAC007, e apenas BAC001 incitou a liberação de odor fétido. Quando avaliado o 3º teste, verificou-se que cinco isolados foram capazes de provocar o sintoma de podridão-mole. Todos estes incitaram o sintoma associado ao odor fétido característico. Os isolados BAC001, BAC003, BAC005, BAC006 e BAC012 foram utilizados para os testes diagnósticos devido aos resultados positivos obtidos em pelo menos dois dos testes. O isolado BAC007 não foi utilizado porque perdeu a patogenicidade.

Os sintomas de podridão-mole resultantes dos testes de patogenicidade feitos, sem ou com anteparo de vidro, podem ser visualizados nas Figuras 7C e D e nas Figuras 7E e F, respectivamente. Observou-se o amolecimento seguido da maceração dos tecidos, aspecto encharcado e, em muitos casos, odor fétido (Tabela 7).

As Figuras 7A e B ilustram a podridão-mole de um rizoma com infecção bacteriana natural, no qual se observou amolecimento e desfragmentação generalizada dos tecidos, aspecto encharcado, escurecimento epidérmico, odor fétido, e pus bacteriano. O isolado BAC012, associado a este rizoma, foi identificado como *E. cloacae* subsp. *cloacae*.

Tabela 7: Resultados dos testes de patogenicidade dos isolados bacterianos inoculados em discos de rizoma de gengibre incubados em câmara úmida a 27° C por 6 dias.

Isolado	Resultados					
	Podridão-mole			Odor fétido		
	1° teste – Sem anteparo	2° teste – Com anteparo	3° teste – Sem anteparo	1° teste – Sem anteparo	2° teste – Com anteparo	3° teste – Sem anteparo
BAC001	+	+	+	+	+	+
BAC002	+	-	-	+	-	-
BAC003	+	+	+	+	-	+
BAC004	+	-	-	+	-	-
BAC005	+	-	+	-	-	+
BAC006	+	-	+	-	-	+
BAC007	+	+	-	-	-	-
BAC008	+	-	-	-	-	-
BAC009	+	-	-	-	-	-
BAC010	+	-	-	-	-	-
BAC011	+	-	-	-	-	-
BAC012	+	-	+	+	-	+

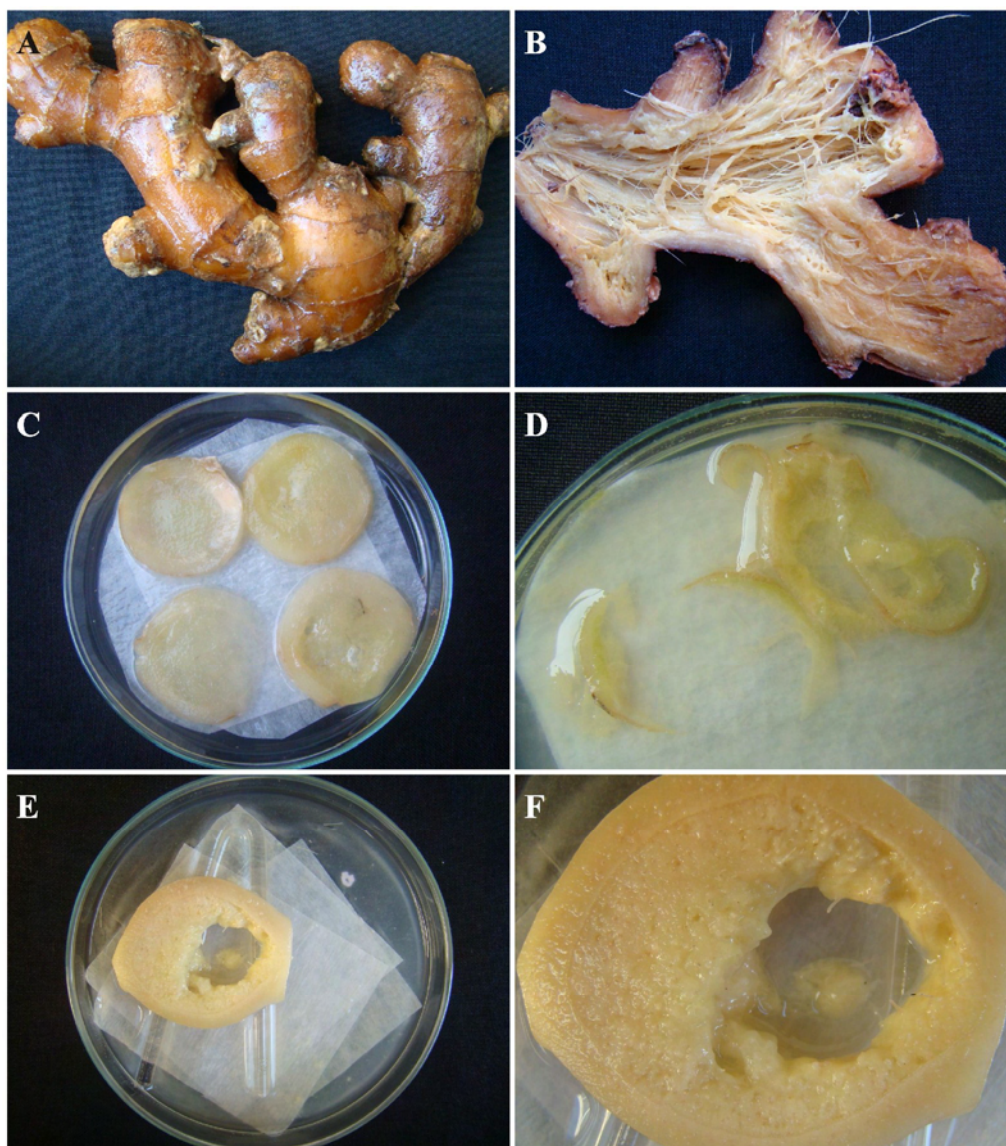


Figura 7: Sintomas naturais de podridão-mole em rizomas de gengibre causados por bactérias pectinolíticas (A e B). Resultado de teste de patogenicidade em discos de rizoma de gengibre com inoculação de bactérias crescidas por 48 horas em meio NA a 27°C seguido de incubação por seis dias a 27°C, sem (C e D) e com anteparo de vidro (E e F).

4.2.3. Identificação de bactérias

De acordo com os testes diagnósticos realizados, identificou-se o isolado BAC001 como *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula, assemelhando-se aos biovares II e IV (Schaad *et al.* 2001) (Tabela 8). O perfil de ácidos graxos do isolado indicou duas espécies de *Pseudomonas*, *P. fluorescens*, com índices de similaridade de 0,71 e 0,40 para as bibliotecas Sherlock[®] ITSA e IR2A, respectivamente, e *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula, com índices de similaridade de 0,73 e 0,71 para as bibliotecas Sherlock[®] ITSA e IR2A, respectivamente (Tabela 8). No entanto, as características bioquímicas associadas ao histórico de patogenicidade das espécies na literatura descartaram a possibilidade do isolado ser identificado como *P. putida* (Schaad *et al.* 2001; Brenner *et al.* 2005).

De acordo com os testes diagnósticos realizados, os isolados BAC003, BAC005, BAC006 e BAC012 apresentaram características semelhantes entre si, com exceção para os testes de urease, L-arabinose e ornitina e lisina descarboxilases (Tabela 9). Estes isolados apresentaram perfil de ácidos graxos de alta similaridade com *E. cloacae* subsp. *cloacae*, em pelo menos uma das bibliotecas Sherlock[®] consultadas (ITSA e IR2A), variando de 71 a 81% de similaridade (Tabela 9). As características bioquímicas e o perfil de ácidos graxos (Tabela 9) apresentados por estes isolados são compatíveis com a espécie *E. cloacae* subsp. *cloacae*, de acordo com Brenner *et al.* (2005), Nishijima *et al.* (2004) e Hoffmann *et al.* (2005).

Tabela 8: Relação de características bioquímicas e de perfil de ácidos graxos do isolado identificado como *Pseudomonas fluorescens*, isolado de rizoma de gengibre.

Teste	Isolado BAC001	<i>*P. fluorescens</i>					<i>*P. marginalis</i>	<i>*P. viridiflava</i>	<i>*P. putida</i>	
		bvI	bvII	bvIII	bvIV	bvV			bvA	bvB
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento aeróbio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento anaeróbio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluorescência em meio B de King	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Levana	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Arginina desidrolase	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
NO ₃ a N ₂	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Liquefação de gelatina	+	+	+	+	+	-	Nd	+	-	-
Podridão-mole em batata	+	+	+	+	+	+	Nd	+	-	-
Utilização de Sacarose	+	+	+	-	+	D	+	-	-	D
Utilização de D-trealose	+	+	+	d	+	D	+	-	-	-
**Similaridade com o perfil de ácidos graxos de <i>P. fluorescens</i> , em %	^A 71 ^B 40									
**Similaridade com o perfil de ácidos graxos de <i>P. putida</i> , em %	^A 73 ^B 71									

*Dados de Brenner *et al.* (2005) e Schaad *et al.* (2001); ** ^A Biblioteca MIS Sherlock® ITSA; ^B Biblioteca MIS Sherlock® IR2A.

Tabela 9: Relação de características bioquímicas e de perfil de ácidos graxos do isolado identificado como *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*, isolado de rizoma de gengibre.

Teste	Código do isolado				<i>*E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	<i>*Pectobacterium</i> spp.
	BAC003	BAC005	BAC006	BAC012		
Gram	-	-	-	-	-	-
Crescimento aeróbio	+	+	+	+	+	+
Crescimento anaeróbio	-	-	-	-	-	-
Fluorescência em meio B de King	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	Nd
Urease	-	-	-	+	**V	-
Liquefação de gelatina	-	-	-	-	-	Nd
Ornitina descarboxilase	+	-	+	+	+	-
Lisina descarboxilase	-	-	+	-	-	-
<i>Utilização dos seguintes açúcares:</i>						
D-Manose	+	+	+	+	+	
D-Manitol	+	+	+	+	+	
D-Maltose	+	+	+	+	+	
D-Trealose	+	+	+	+	+	
L-Arabinose	-	-	-	+	+	
Eritritol	-	-	-	-	-	
***Similaridade com o padrão de ácidos graxos de <i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> , em %	^A 00 ^B 81	^A 71 ^B 78	^A 77 ^B 00	^A 00 ^B 79		

*Dados de Brenner *et al.* (2005); **V: variável (65%); *** ^A Biblioteca MIS Sherlock[®] ITSA; ^B Biblioteca MIS Sherlock[®] IR2A.

5. DISCUSSÃO

Dentre as seis espécies fúngicas isoladas consideradas capazes em incitar podridão nos rizomas, três foram encontradas tanto nas amostragens feitas durante armazenamento refrigerado como naquelas feitas em campo, *A. luteo-albus*, *F. graminearum* e *F. oxysporum*. No entanto, *A. murorum*, *L. theobromae*, *S. rolfsii* foram encontrados apenas durante o armazenamento refrigerado, provavelmente por ser esta uma situação mais favorável para estes patógenos, por meio de uma possível contaminação presente nas câmaras frias ou mesmo devido ao clima e à época do ano. Apesar do critério de amostragem não ter sido o mesmo para *packing-house* e campo, as duas espécies com maior média de incidência conforme a avaliação de campo, *F. oxysporum* e *F. graminearum*, foram encontradas também em *packing-house*.

Ao realizar dois métodos de isolamento, esperava-se que as espécies encontradas na superfície epidérmica fossem predominantemente sapróbios, e que os agentes etiológicos de doenças, encontrados principalmente em tecidos internos, como a hipoderme e o córtex. No entanto, observou-se uma distribuição equilibrada na localização das espécies consideradas sapróbias e aquelas fitopatogênicas, tendo sido encontradas tanto por meio de isolamento direto como por meio do isolamento indireto (Tabela 5). No entanto, os resultados mostraram que é necessária a realização dos dois métodos de isolamento durante o trabalho de diagnose de doenças em pós-colheita de gengibre, pois é possível que uma espécie fitopatogênica deixe de ser isolada e identificada se apenas um método for utilizado. *Acrostalagmus luteo-albus*, por exemplo, apenas foi isolado por meio de isolamento indireto, para as amostras de campo (Tabela 5).

Quando as amostragens foram realizadas em *packing-house*, identificaram-se seis espécies fúngicas, e para as amostragens de campo, dezesseis espécies. Além do menor número de amostragens e apenas um método de amostragem, é esperado que amostragens realizadas em *packing-house* apresentem menor número de espécies fúngicas, pois nesta etapa da pós-colheita os rizomas já foram selecionados, lavados, curados e cicatrizados, além de estarem sob armazenamento refrigerado.

Um grande número de espécies mostrou resultado positivo para o teste de colonização da superfície cortada (Tabela 6). Esta superfície consiste em tecidos corticais que normalmente ficam expostos por meio de cortes feitos durante o

processamento pós-colheita, caso não haja uma etapa de cura e cicatrização, ou seja, a formação de uma camada de súber (Lana 1991). Os fungos capazes em colonizar estes cortes foram tanto patogênicos como oportunistas (Figuras 2 e 3), ressaltando-se que a inoculação foi feita em tecidos recém-cortados, não-cicatrizados. Isso demonstrou a importância da etapa de cura e cicatrização no processamento do gengibre.

No segundo teste feito, pequenos furos a partir da superfície epidérmica foram o ponto inicial do desenvolvimento dos fungos. Muitos foram capazes de desenvolver algum crescimento micelial ao longo das perfurações, que consistiam de canais formados de epiderme, hipoderme e córtex. No entanto, poucos foram capazes de provocar alterações visuais nos tecidos colonizados, como escurecimento ou depressão (Figuras 4 e 5). Estes resultados mostraram que ferimentos contribuem para a infecção de fungos causadores de podridão, sendo necessário evitá-los ao máximo durante o manuseio dos rizomas na colheita e ao longo de todo o processamento pós-colheita.

O fungo *F. oxysporum* é considerado um grave problema fitossanitário presente em vários países produtores de gengibre, como EUA (Trujilo 1963), Índia (Dake e Edison 1989) e Austrália (Stirling 2004). Uma vez que o número de isolados da espécie associados ao isolamento direto foi duas vezes maior em relação ao isolamento indireto (Tabela 5), é provável que as infecções podem ter origem tanto devido ao inóculo presente no solo como também, em grande parte, à entrada do fungo por meio de ferimentos durante a pós-colheita, como demonstrado neste trabalho (Figura 4A).

Existem relatos recentes de *F. graminearum* como agente causal de podridão de tubérculos de batata durante armazenamento nos EUA (Ali *et al.* 2005; Burlakoti *et al.* 2008), e este foi o primeiro relato de podridão pós-colheita de rizomas de gengibre causada por este fungo. Nota-se que enfermidades podem ser causadas a homens e animais por meio de três toxinas que podem ser produzidas pelo fungo, zearalenona, nivalenol e deoxynivalenol (Greenhalgh *et al.* 1983), tornando o órgão infectado impróprio para o consumo.

Acremonium murorum foi relatado em gengibre, nos EUA, em rizomas oriundos da China, no ano de 1946. A espécie *A. stromaticum* foi associada ao gengibre em 1975, na Índia (Farr e Rossman 2010). *Acrostalagmus luteo-albus* foi relatado para gengibre em 1941, e identificado, na ocasião, como *A. cinnabarinus*, em rizomas de

origem chinesa, interceptados na Califórnia, EUA (Farr e Rossman 2010). *Lasiodiplodia theobromae* foi relatado associado ao gengibre na Índia, em 1979 (Farr e Rossman 2010). O fungo *S. rolfsii* é um cosmopolita capaz de infectar diversos tubérculos, raízes tuberosas e rizomas, inclusive o e gengibre (Moreira *et al.* 2006), e foi relatado para gengibre na África do Sul, em 2000 (Farr e Rossman 2010).

Este é o primeiro relato de ocorrência e de podridão de rizomas de gengibre causado por *F. graminearum* no mundo, e o primeiro relato de ocorrência e de podridão de rizomas de gengibre causada por *A. murorum* e *L. theobromae* no Brasil. É o primeiro relato de ocorrência de *Chaetomium* sp., *Epicoccum* sp., *F. semitectum*, *N. sphaerica* e *P. commune* em rizomas de gengibre no mundo, e o primeiro relato de ocorrência de *A. tenuissima*, *A. niger*, *M. hiemalis*, *N. oryzae* em rizomas de gengibre no Brasil.

Um número de doze isolados de bactérias patogênicas foi detectado durante a amostragem de rizomas no campo. No entanto, conforme relataram Nishijima *et al.* (2004), é possível que um número maior de isolados de *E. cloacae* subsp. *cloacae* estivesse associado aos rizomas. Os autores verificaram que *E. cloacae* subsp. *cloacae* pode ocorrer em tecidos de gengibre saudáveis, e que esta espécie bacteriana pode incitar a podridão dos rizomas inicialmente saudáveis quando em condições favoráveis. Ao estudar outras espécies vegetais, McInroy e Kloepper (1995) e Magnani (2005) verificaram que o mesmo pode ocorrer para *P. fluorescens*.

O 1º teste de patogenicidade de bactérias apresentou maior número de isolados positivos para podridão-mole em relação ao 2º teste. Assim, o 1º teste pode ter favorecido condições adequadas para a expressão da patogenicidade dos isolados, pelo contato direto dos segmentos de rizoma com o papel-filtro umedecido.

A partir destas informações, verificou-se que é importante evitar o contato direto com a água durante o armazenamento, assim como a adequada secagem dos rizomas após lavagem.

O odor fétido não foi uma característica presente em todos os rizomas com podridão-mole, e apenas um isolado apresentou o sintoma associado a este odor durante o 2º teste, não sendo uma característica determinante na diagnose destas bactérias.

As espécies de *Pseudomonas* conhecidas por provocar podridões em órgãos de reserva vegetais são *P. fluorescens*, *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens e

Pseudomonas viridiflava (Burkholder) Dowson (Hunter e Cigna 1981; Krejzar *et al.* 2008; Malavolta Jr. *et al.* 2008). No Brasil, já foram relatadas *P. viridiflava*, em alface, alho, batata, cebola, feijão e mandioca, *P. marginalis* em alface, alho, cebola, crisântemo, gérbera, mostarda e tomate, e *P. fluorescens* em alface, alho, batata, cebola, filodendro e tomate (Malavolta Jr. *et al.* 2008). Também existem relatos de podridões em raízes tuberosas de parsnip (*Pastinaca sativa*) por *P. viridiflava* e *P. marginalis* pv. *pastinacae* nos EUA (Hunter e Cigna 1981); podridão por *P. marginalis* em rizomas de copo-de-leite (*Zantedeschia* sp.) na República Tcheca (Krejzar *et al.* 2008); e podridão pós-colheita de brócolis por *P. fluorescens* no Reino Unido (Cui e Harling 2006). Este é o primeiro relato de *P. fluorescens* causando podridão-mole em rizomas de gengibre no mundo, sendo também o primeiro relato para *Pseudomonas* spp. causando doença em gengibre, no mundo.

Diversas espécies de *Enterobacter* causam enfermidades em seres humanos, incluindo algumas capazes de incitar a deterioração de tecidos vegetais, como *E. cloacae* e *Enterobacter sakazakii* Farmer, Asburry, Hickman e Brenner. *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* já foi relatada incitando a deterioração de diversas espécies vegetais no mundo, tais como mamão, no Havaí, EUA (Nishijima *et al.* 1987), orquídea *Odontioda*, no Japão (Takahashi *et al.* 1997), cebola, no Colorado e Washington, EUA (Schwartz e Otto 2000; Schroeder *et al.* 2009), gengibre, no Havaí, EUA, e macadamia, no Havaí, EUA (Nishijima *et al.* 2007). Na Austrália, foi relatada a ocorrência do gênero *Enterobacter* em rizomas de gengibre (Stirling 2004). Keith *et al.* (2008) relataram a deterioração dos tecidos internos de frutos de mamão por *E. sakazakii* no Havaí, EUA. Este é o primeiro relato de *E. cloacae* subsp. *cloacae* incitando podridão de rizomas de gengibre no Brasil.

Neto (1997) avaliou linhagens de *E. cloacae* isoladas de plantas e de casos clínico-hospitalares, por meio de serologia, eletroforese de proteínas totais e RAPD. O autor concluiu que linhagens oriundas de vegetais possuem estreita relação com aqueles de casos clínicos, apesar de ser possível diferenciá-los por meio dos métodos estudados. Foi observado também que linhagens clínicas mostraram capacidade fitopatogênica, causando o colapso interno de escamas de cebola.

Verifica-se ainda que muitos produtores de gengibre realizam a irrigação utilizando corpos d' água inapropriadamente localizados adjacentes à currais, sendo esta uma fonte de contaminação fecal, sendo necessária a conscientização dos

mesmos quanto ao risco desta contaminação à saúde humana e à qualidade do produto que comercializam.

6. CONCLUSÕES

Os fungos capazes de causar podridão em rizomas de gengibre encontrados na pós-colheita foram *A. murorum*, *A. luteo-albus*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *L. theobromae* e *S. rolfsii*.

Os principais fungos causadores de podridão em rizomas de gengibre encontrados foram *F. oxysporum* e *F. graminearum*.

Este é o primeiro relato de podridão de rizomas de gengibre causada por *F. graminearum* no mundo, e o primeiro relato de podridão de rizomas de gengibre causada por *A. murorum* e *L. theobromae* no Brasil.

Este é o primeiro relato de ocorrência e de podridão de rizomas de gengibre causada *P. fluorescens* no mundo e o primeiro relato de ocorrência e de podridão de rizomas de gengibre causada *E. cloacae* subsp. *cloacae* no Brasil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas AC, Ferreira FA, Mafia RG, Gonçalves RC (2007) Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: 'Métodos em Fitopatologia' (Eds Alfenas AC e Mafia RG) p.53-91 (UFV: Viçosa, MG)
- Ali S, Rivera VV, Secor GA (2005) First report of *Fusarium graminearum* causing dry rot of potato in North Dakota. *Plant Disease* **89**, 105.
- Anderson RC, Gardner DE (1999) An Evaluation of the Wilt-Caused Bacterium *Ralstonia solanacearum* as a Potential Biological Control Agent for the Alien Kahili Ginger (*Hedychium gardnerianum*) in Hawaiian Forests. *Biological Control* **15**, 89-96.
- Aoki T, O'Donnell K (1999) Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* **91**, 597-609.
- Anzai Y, Kim H, Park J-Y, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads base don 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1563-1589.
- Brasil. MDIC, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. SECEX, Secretaria do Comércio Exterior. <http://www.mdic.gov.br/sitio>. Acesso em 2009.
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (2005) The Proteobacteria. Part B – The Gammaproteobacteria. In: 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' Vol. 2. (Ed Garryt GM) 2ed. (Springer: Michigan) 1106p.
- Burlakoti RR, Ali S, Secor GA, Neate SM, McMullen MP, Adhinkari TB (2008) Genetic relationships among populations of *Gibberella zea* from barley, wheat, potato, and sugar beet in the upper Midwest of the United States. *Phytopathology* **98**, 969-976.
- Bussaban B, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD, Lumyong S (2002) Index of Fungi Described from The Zingiberaceae. *Mycotaxon* **83**, 165-182.
- Carmichael JW, Kendrick WB, Connors LI, Singler L (1980) Genera of Hyphomycetes. (The University of Alberta Press: Edmonton) 387p.

- Chrubasic S, Pittler MH, Roufogalis BD (2005) Zingiberis rhizome: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* **12**, 684-701.
- Cui X, Harling R (2006) Evaluation of Bacterial Antagonists for Biological Control of Broccoli Head Rot Caused by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **96**, 408-416.
- Dake GN, Edison S (1989) Association of Pathogens with Rhizome Rot of Ginger in Kerala. *Indian Phytopathology* **42**, 116-119.
- Denti EA, Reis EM (2003) Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do Planalto Médio gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 585-590.
- Domsch KH, Gams W Anderson T (2007) Compendium of Soil Fungi. 2 ed. rev. (IHW – Verlag Eching) 672p.
- Dohoo NP (2005) Diseases of Ginger. In: `Ginger: The Genus *Zingiber*'. (Eds Ravindran PN, Nirmal Babu K) pp.305-340 (CRC Press: Boca Raton)
- Dohoo NP, Sharma M (1997) New records of fungi occurring on ginger rhizomes in Hamachal Pradesch. *Indian Phytopathology* **50**, 148.
- Domingues M (2006) Controle físico e biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* em gengibre. 58p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Programa de Pós-graduação em Fitopatologia. Universidade de São Paulo - ESALQ. Piracicaba, SP.
- Elpo ERS Negrelle RRB Rucker NGA (2008) Produção de gengibre no município de Morretes, PR. *Scientia Agraria* **8**, 211-217.
- Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Exportações Brasileiras de Hortaliças, 2000-2007. Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, sistematizados. Disponível em http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortaliças_em_numeros/exportacoes_brasileiras_hortaliças_2000_2007.pdf. Acesso em 2009.
- Fahy PC, Parsley GL (1983) Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide. (Academic Press: Sidney) p.393.

- Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ (1980) *Enterobacter sakazakii*: A New Species of “Enterobacteriaceae” Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**, 569-584.
- Farr DF, Rossman AY. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>. Acesso em 2010.
- Greenhalgh R, Neish GA, Miller JD (1983) Deoxynivalenol, Acetyl Deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on soil substrates. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 625-629.
- Grimont PAD, Vancanneyt M, Lefevre M, Vandemeulebroecke K, Vauterin L, Brosch R, Kersters K, Grimont F (1996) Ability of Biolog and Biotype-100 Systems to Reveal the Taxonomic Diversity of the Pseudomonads. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 465-643.
- Hamírez-Ahumada MC, Timmermann BN, Gang DR (2006) Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in tumeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): Identification of curcuminoid syntase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry* **67**, 2017-2029.
- Hanlin RT (1998) Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes Vols. I e II (APS Press: St. Paul)
- Hanlin RT (1990) Illustrated Genera of Ascomycetes Vol. I. 2 ed. (APS Press: St. Paul)
- Henz G (2006) Doenças das Hortaliças. In: ‘Patologia Pós-Colheita de frutas, olerícolas e ornamentais tropicais’ (Eds Oliveira SMA, Terão D, Dantas ASFD, Tavares SCCH) p.629-673 (Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF)
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Hilario E, Buckley TR, Young JM (2004) Improved resolution on the phylogenetic relationship among *Pseudomonas* by the combined analysis of atpD, carA, recA and 16S rDNA. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**, 51-64.

- Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Heesemann J, Monget D, Schleifer KH, Roggenkamp A (2005) Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 196-205.
- Hugh R, Leifson E (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **66**, 24-26.
- Hunter JE, Cigna JA (1981) Bacterial Blight Incited in Parsnip by *Pseudomonas marginalis* and *Pseudomonas viridiflava*. *Phytopathology* **71**, 1238-1241.
- Incap. Instituto Capixaba de pesquisa e extensão rural. Produtores comemoram bom ano do gengibre. Disponível em http://www.incap.es.gov.br/?a=noticias/2008/agosto/noticias_21_08_2008. Acesso em 2010.
- Inpa. Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia. Gengibre pode ser usado no tratamento do câncer. Disponível em http://www.inpa.gov.br/noticias/noticia_sgn02.php?codigo=1149. Acesso em 2010.
- Ishii M, Aragaki M (1963) Ginger wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease* **47**, 710-713.
- Itc. International Trade Centre UNCTAD/WTO. Global Spice Market: Imports – 1996-2000. (ITC 2002: Geneva) 80p.
- Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* **60**, 969-976.
- Kavita PG, Thomas G (2008) Population genetic structure of the clonal plant *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae), a wild relative of cultivated ginger, and its response to *Pythium aphanidermatum*. *Euphytica* **160**, 89-100.
- Keith RC, Nishijima KA, Keith LM, Fitch MM, Nishijima WT, Wall MM (2008) Atypical Internal Yellowing of Papaya Fruit in Hawaii Caused by *Enterobacter sakazakii*. *Plant Disease* **92**, 487.

- Kimura M (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **44**, 301-307.
- Krejzar V, Mertelík J, Pánková I, Kloudová K, Václav K (2008) *Pseudomonas marginalis* Associated with Soft Rot of *Zantedeschia* spp. *Plant Protection Science* **44**, 85-90.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* **9**, 299-306.
- Lana, MM (1991) Estudo da conservação pós-colheita de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). 85 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. (Blackwell Publishing: Iowa) 387p.
- Lima MAC, Alves RE, Terao D. Colheita e Manuseio na Pós-Colheita. In: `Patologia Pós-Colheita de frutas, olerícolas e ornamentais tropicais´ (Eds Oliveira SMA, Terao D, Dantas ASFD, Tavares SCCH) p.411-439 (Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF). 2006.
- Macagnan DR, Romeiro RS, Macedo DM, Schurt DA (2007) Podridão-mole em pós-colheita de batata (*Solanum tuberosum*) incitada por *Pseudomonas viridiflava*. *Summa Phytopathologica* **33**, 307-308.
- Magnani GS (2005) Diversidade de Bactérias Endofíticas em Cana-de-açúcar. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.
- Malavolta Jr VA, Almeida IMG (1998) Podridão em gengibre causada por bactérias pectinolíticas do gênero *Erwinia*. *Summa Phytopathologica* **24**, 67.

- Malavolta Jr VA, Beriam LOS, Almeida IMG, Rodrigues Neto J, Robbs CF (2008) Bactérias Fitopatogênicas Assinaladas no Brasil: Uma Atualização. *Summa Phytopatologica* **34**. 188p.
- McInroy JA, Kloepper JW (1995) Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* **173**, 337-342.
- Mendes MAS, Urben AF. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em 2010.
- Moore ERB, Mau M, Arnscheidt A, Bottger EC, Hutson RA, Collins MD, Van de Peer Y, De Wachter R, Timmins KN (1996) The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intrageneric relationships. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 478-492.
- Moeller V (1955) Simplified tests for some amino acid descarboxylases and for arginine dihydrolase system. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* **36**, 158-172.
- Moreira SI, Pereira OL, Puschmann R (2007) Primeiro relato de podridão pós-colheita em rizomas de gengibre causada por *Sclerotium rolfsii* no Brasil. In: `II Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita de Frutas, Hortaliças e Flores´. Viçosa, MG.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research* **8**, 4321-4325.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WF (1983) *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. (Pennsylvania State University Press: Pennsylvania) 193p.
- Nishijima KA, Couey HM, Alvarez, AM (1987) Internal Yellowing, a Bacterial Disease of Papaya Fruits Caused by *Enterobacter cloacae*. *Plant Disease* **71**, 1029-1034.

- Nishijima KA (2004) Association of *Enterobacter cloacae* with rhizome rot of edible ginger in Hawaii. *Plant Disease* **88**, 1318-1327.
- Nishijima KA, Wall MM, Siderhurst MS (2007) Demonstrating Pathogenicity of *Enterobacter cloacae* on Macadamia and Identifying Associated Volatiles of Gray Kernel of Macadamia in Hawaii. *Plant Disease* **91**, 1221-1228.
- O'Donnell K, Ward TJ, Geiser DM, Kistler HC, Aoki T (2004) Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology* **41**, 600-623.
- Ocbes. Sindicato e Organização das Cooperativas Brasileiras do Estado do Espírito Santo. Exportação agrícola ganha fôlego e atinge US\$ 1 bilhão. Disponível em http://www.ocbes.coop.br/ocb/index.php?id_noticia=768&module=m_noticias&pag=inf_noticia. Acesso em setembro de 2009.
- Overy DP, Frisvad JC (2005) Mycotoxin Production and Postharvest Storage Rot of Ginger (*Zingiber officinale*) by *Penicillium brevicompactum*. *Journal of Food Protection* **68**, 607-609.
- Pappalardo L, Smith MK, Hamil SD, Stirling AM, McKay D (2009) DNA amplification fingerprint analysis of genetic variation within *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi*. *Australasian Plant Pathology* **38**, 51-54.
- Pawar NV, Patil VB, Kamble SS, Dixit GB (2008) First Report of *Aspergillus niger* as Plant Pathogen on *Zingiber officinale* from India. *Plant Disease* **92**, 1368.
- Pereira JM, Barreto RW, Ellison CA, Maffia LA (2003) *Corynespora cassicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control* **26**, 21-31.
- Pereira OL, Moreira SI, Puschmann R (2007) Nova doença pós-colheita em rizomas de gengibre causada por *Acrostalagmus luteo-albus*. In: `II Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita de Frutas, Hortaliças e Flores´. Viçosa, MG.
- Pratchi, Sharma TR, Singh BM (2002) Salicylic acid induced insensitivity to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* in the calli of *Zingiber officinale* Roscoe. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 31-39.

- Rao VG (1966) An account of the market and storage diseases of fruits and vegetables in Bombay-Maharashtra (India). *Mycopathology et Mycology Applied* **28**, 165-176, 1966.
- Ravindran PN, Nirmal Babu K (2005) Ginger: The genus *Zingiber* (CRC Press: Boca Raton) 552p.
- Rupollo G, Gutkoski LC, Marini, LJ, Elias MC (2004) Sistemas de armazenamento hermético e convencional na conservabilidade de grãos de aveia. *Ciência Rural*, **34**, 1715-1722.
- Ryu EA (1940) A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. *Kitazato Archives of Experimental Medicine* **17**, 58-63.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. (American Phytopathological Society Press: St. Paul) 373p.
- Schroeder BK, Toit LJ, Schwartz HF (2009) First Report of *Enterobacter cloacae* Causing Onion Bulb Rot in the Columbia Basin of Washington State. *Plant Disease* **93**, 323.
- Schwartz HF, Otto K (2000) First Report of a Bulb Decay of Onion by *Enterobacter cloacae* in Colorado. *Plant Disease* **84**, 808. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.7.808B
- Sharma TR, Singh BM (1997) High-frequency in vitro multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Roscoe. *Plant Cell Reports* **17**, 68-72.
- Simmons EG (2007) *Alternaria – An Identification Manual*. (CBS Fungal Biodiversity Centre: Utrecht) 775p.
- Souza JL, Resende PL (2001) Cultivo orgânico de gengibre, taro e inhame. (CPT: Viçosa) 232p.
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK (1999) The Staden Package, 1998. *Methods in Molecular Biology* **132**, 115-130.
- Stead DE (1992) Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 281-295.

- Silva CF, Batista LR, Schuan RF (2003) Incidência de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.). *Revista Brasileira de Armazenamento* **7**, 30-36.
- Stirling AM (2002) *Erwinia chrysanthemi*, the cause of soft rot in ginger (*Zingiber officinale*) in Australia. *Australasian Plant Pathology* **31**, 419-420.
- Stirling AM (2004) The causes of poor establishment of ginger (*Zingiber officinale*) in Queensland, Australia. *Australasian Plant Pathology* **33**, 203-210.
- Stirling GR, Nikulin A (1998) Crop rotation, organic amendments and nematicides for control of root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) on ginger. *Australasian Plant Pathology* **27**, 234-243.
- Sweta Priya R, Subramanian RB (2008) Isolation and molecular analysis of R-gene in resistant *Zingiber officinale* (ginger) varieties against *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi*. *Bioresource Technology* **99**, 4540-4543.
- Sutton BC (1980) The Coelomycetes, fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata. (Commonwealth Mycological Institute: Kew) 696p.
- Takahashi Y, Takahashi K, Sato M, Watanabe K, Kawano T (1997) Bacterial Leaf Rot of *Odontioda* Orchids Caused by *Enterobacter cloacae*. *Annual Phytopathological Society of Japan* **63**, 164-169.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
- Thornley MJ (1960) The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Bacteriology* **23**, 37-52.
- Trujillo EE (1964) *Fusarium* yellows and rhizome rot of common ginger. *Phytopathology* **53**, 1370-1371.
- Tsang MMC, Shintaku M (1998) Hot Air Treatment for Control of Bacterial Wilt in Ginger Root. *Applied Engineering in Agriculture* **14**, 159-163.

- Ventura JA, Costa H (2006) Controle Cultural. In: `Patologia Pós-Colheita de frutas, olerícolas e ornamentais tropicais´ (Eds Oliveira SMA, Terao D, Dantas ASFD, Tavares SCCH) p.145-169 (Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF)
- Verdejo-Lucas S, Sorribas FJ, Ornat C, Galeno M (2003) Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology* **52**, 521-528.
- Vikram A, Kushalappa A (2006) Diagnosis of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. In: `Patologia Pós-Colheita de frutas, olerícolas e ornamentais tropicais´ (Eds Oliveira SMA, Terao D, Dantas ASFD, Tavares SCCH) p.45-83 (Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF)
- Wagener RE, Davis ND, Diener UL (1980) Penitrem A and Roquefortine Production by *Penicillium commune*. *Applied and Environmental Microbiology* **39**, 882-887.
- Wang PH, Chung CY, Lin YS, Yeh Y (2003) Use of polymerase chain reaction to detect the soft rot pathogen, *Pythium myriotylum*, in infected ginger rhizomes. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 116-120.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: `PCR Protocols - A Guide To Methods and Applications´ (Eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ) p.315-322 (Academic Press: London)
- Wittig HPP, Johnson KB, Pscheidt JW (1997) Effect of epiphytic fungi on brown rot blossomblight and latent infections in sweet cherry. *Plant Disease* **81**, 383-387.
- Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S (2000) Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes. *Microbiology* **146**, 2385-2394.
- Yamamoto S, Harayama S (1995) PCR Amplification and Direct Sequencing of gyrB Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1104-1109.
- Yang GH, Conner RL, Cai H, Li F (2008) First Report of Rhizome Blight of Ginger Caused by Binucleate *Rhizoctonia* AG-R in China. *Plant Disease* **92**, 312.

- Yu Q, Alvarez AM, Moore PH, Zee F, Kim MS, Silva A, Hepperly PR, Ming R (2003) Molecular Diversity of *Ralstonia solanacearum* Isolated from Ginger in Hawaii. *Phytopathology* **93**, 1124-1130.
- Zare R, Gams W, Evans HC (2001) A revision of *Verticillum* section Prostrata. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia* **73**, 51-86.
- Zauza EAV, Alfenas AC, Mafia RG (2007) Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: 'Métodos em Fitopatologia' (Eds Alfenas AC e Mafia RG) p.23-47 (UFV: Viçosa, MG)