

DENISE PEREIRA TORRES

**ETIOLOGIA DA MANCHA DE CURVULARIA EM GLADIÓLO E
ASPECTOS DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO**

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
2013

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

T

Torres, Denise Pereira, 1987-
T693e Etiologia da mancha de curvularia em gladiolo e aspectos da
2013 interação planta – patógeno / Denise Pereira Torres. – Viçosa,
MG, 2013.
x, 42f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Gleiber Quintão Furtado
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Curvularia gladioli*. 2. Fungos fitopatogênicos.
3. Gladiolo - Doenças e pragas. 4. Plantas ornamentais.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 632.45

DENISE PEREIRA TORRES

**ETIOLOGIA DA MANCHA DE CURVULARIA EM GLADÍOLO E
ASPECTOS DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO**

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: 18 de fevereiro de 2013.

Prof.^a Maria Catarina Megumi Kasuya

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof. Gleiber Quintão Furtado
(Orientador)

“Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.”

(Confúcio)

A Deus,
À minha mãe Elizabete,
Aos meus irmãos Daniele e
Thiago Willian.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades, conquistas, aprendizado e força nos momentos difíceis;

Aos meus pais Miguel Corrêa Torres e Elizabete Nunes Pereira pelo carinho, apoio, incentivo, e compreensão;

Ao meu irmão Thiago Willian pelo carinho e à minha irmã Daniele Pereira Torres pelo carinho, apoio e pelo melhor presente dos últimos tempos, minha linda afilhada Emanuele Pereira de Oliveira;

Aos meus avôs Anísio, Ana Maria, Maria (*in memoria*) e Sérgio e aos tios Wildo, Elizete e Dilma pelo carinho, apoio e incentivo;

Ao professor Gleiber Quintão Furtado pela orientação, conselhos e incentivo;

Aos professores Olinto Liparini Pereira e Maria Catarina Megumi Kasuya pelos ensinamentos, sugestões, conselhos e incentivo;

Ao professor Fabrício de Ávila Rodrigues pelas sugestões e disponibilização dos equipamentos de seu Laboratório;

Aos amigos do Laboratório de Patologia Florestal Ana Lúcia, Daniela, Gleiber, Nilmara, Renildo, Vítor e em especial a Mariana Silva pela ajuda durante a realização deste trabalho e pela convivência durante este período;

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes e Pós Colheita Alexandre, André, Deiziane, Danilo, Stefânia e Olinto pela acolhida durante a reforma do Laboratório de Patologia Florestal, ensinamentos e sobre tudo pela amizade.

À Ana Lúcia Rodrigues, Deiziane Dutra, Lilían Costa e Patrícia Silveira pelo companheirismo, árduas horas de estudos, conselhos e amizade;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos;

Aos amigos do curso de mestrado e demais estudantes do Programa de Pós Graduação em Fitopatologia pela convivência e amizade;

Aos amigos Jonas Rios e José Maria Rodrigues da Luz, pelos conselhos, incentivo e ajuda com as análises estatísticas;

Aos funcionários da Universidade Federal de Viçosa pelos serviços prestados;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso;

A todos que de alguma maneira contribuíram com mais essa conquista;

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

DENISE PEREIRA TORRES, filha de Miguel Corrêa Torres e Elizabete Nunes Pereira, nasceu na cidade de Januária-MG, em 18 de outubro de 1987.

Em maio de 2006, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em janeiro de 2011.

Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Associações Micorrízicas/Departamento de Microbiologia sob a orientação da Prof^a Maria Catarina Megumi Kasuya.

Em março de 2011, iniciou o Curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Gleiber Quintão Furtado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
ARTIGO 1	9
First Report of <i>Curvularia gladioli</i> Causing a Leaf Spot on <i>Gladiolus grandiflorus</i> in Brazil.....	10
ARTIGO 2	13
Suscetibilidade de gladiolo à mancha de curvularia.....	14
RESUMO.....	14
AGRADECIMENTOS	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
ARTIGO 3	25
Processo infeccioso de <i>Curvularia gladioli</i> em folhas de <i>Gladiolus grandiflorum</i>	26
RESUMO.....	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO	36
AGRADECIMENTOS	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CONCLUSÕES GERAIS	42

RESUMO

TORRES, Denise Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Etiologia da mancha de curvularia em gladiolo e aspectos da interação planta-patógeno.** Orientador: Gleiber Quintão Furtado.

O mercado de flores e plantas ornamentais é um segmento promissor e encontra-se em expansão no Brasil. O gladiolo é reconhecido mundialmente devido à variedade de cores, tamanhos e forma das flores. Dentre as doenças relatadas para a cultura, a mancha de curvularia está entre as mais destrutivas. Os objetivos deste trabalho foram identificar o patógeno associado a essa doença no Brasil; avaliar a suscetibilidade dos principais materiais genéticos de gladiolo cultivado no país à mancha de curvularia e relacioná-la com o desenvolvimento de estruturas infectivas (porcentagem de germinação e de formação de apressórios) do patógeno; e elucidar o processo infeccioso do fungo em folhas de variedade suscetível e resistente de gladiolo. Plantas de *Gladiolus grandiflorus* variedades Amsterdam e T-704 apresentando sintomas de mancha de curvularia foram encontradas no Setor de Floricultura do Departamento de Fitotecnia / Universidade Federal de Viçosa. O patógeno foi identificado como *Curvularia gladioli* baseado em características morfológicas dos conídios e conidióforos e análises filogenéticas das regiões ITS e 28S do rDNA. Os genótipos *Gladiolus callianthus* e *G. grandiflorus* variedades Amsterdam, Red Beauty, Rose Friendship, T-704, Verônica e Yester Gold foram avaliadas quanto à suscetibilidade ao patógeno. Os materiais genéticos apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade a *C. gladioli*, sendo *G. grandiflorus* variedades T-704 e Red Beauty os mais suscetíveis, seguidos da variedade Tradehorn e da espécie *G. callianthus*. Os demais materiais genéticos não diferenciaram entre si. Não houve diferença na porcentagem de germinação de conídios entre os materiais genéticos avaliados. Já quanto aos apressórios, foram observadas diferenças entre as porcentagens de formação desta estrutura entre *G. callianthus* e *G. grandiflorus* variedade Amsterdam e *G. grandiflorus* variedade T-704. O processo infeccioso de *C. gladioli* foi estudado em *G. grandiflorus* variedades T-704 e Verônica utilizando-se técnicas de microscopia de luz microscopia e de eletrônica de varredura. Não houve diferença na porcentagem de germinação de conídios e de formação de

apressórios entre estas variedades. Em relação à colonização, foi observado um menor desenvolvimento de hifas nos tecidos da variedade resistente. Conidióforos foram observados emergindo através de tricomas e de aberturas estomáticas em ambas às variedades entre sete a oito dias após a inoculação. *C. gladioli* apresentou um desenvolvimento semelhante durante a pré-penetração em ambas as variedades e uma colonização e reprodução mais abundante na variedade suscetível. Essas informações são de grande importância para o entendimento da interação *C. gladioli* - gladiolo e contribuem para o desenvolvimento de estratégias de manejo da doença.

ABSTRACT

TORRES, Denise Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Etiology of curvularia leaf spot on gladiolus and aspects of plant-pathogen interaction.** Adviser: Gleiber Quintão Furtado.

The flowers and ornamental market is a promising sector which is expanding in Brazil. The gladiolus is worldwide recognized due to the variety of colors, size and shape of its flowers. Among the diseases reported to gladiolus, the curvularia spot is one of the most destructive. The aims of this study were to identify the pathogen associated with this leaf spot in Brazil; evaluating the susceptibility of the main gladiolus genetic material, grown in this country, to curvularia spot and relating it with the development of pathogen infective structures (rate of germination and appressoria formation); and elucidate the fungus infection process in susceptible and resistant varieties of gladiolus leaves. Plants of *Gladiolus grandiflorus* varieties 'T-704' and 'Amsterdam' showing curvularia spot were found in Crop science Department / Division of Floriculture of the Universidade Federal de Viçosa. The pathogen was identified as *Curvularia gladioli* based on conidia and conidiophores morphometric characteristics and phylogenetic analysis of ITS and 28S rDNA regions. The susceptibility to pathogen was evaluated on genotypes *Gladiolus callianthus* and *G. grandiflorus* varieties Amsterdam, Red Beauty, Rose Friendship, T-704, Verônica and Yester Gold. The genetic materials presented different level of susceptibility to *C. gladioli*. *G. grandiflorus* varieties T-704 and Red Beauty were the most susceptible followed by Tradehorn variety and *Gladiolus callianthus*. The remaining genetic materials did not differentiate between them. There was no difference in the germination rate between susceptible and resistant varieties. As for the appressorium, differences were observed between the percentages of formation of this structure between *G. callianthus* and *G. grandiflorus* variety Amsterdam and *G. grandiflorus* variety T-704. The infection process of *C. gladioli* was studied on *G. grandiflorus* varieties T-704 and Amsterdam using light and scanning electron microscopy techniques. There was no difference in the germination and appressorium formation rate between these varieties. Regarding the colonization, it was observed a lower hyphae development in the leaf tissues of resistant variety. Conidiophores were

observed emerging through trichomes and stomatal openings in both the varieties from seven to eight days after inoculation. *C. gladioli* showed a similar development during pre-penetration in both varieties. The colonization and sporulation were more abundant in the susceptible variety. These information have a great importance to understand the *C. gladioli* - *gladiolus* interaction and contribute to development of strategies for the disease management.

INTRODUÇÃO GERAL

O mercado de flores e de plantas ornamentais é considerado um dos mais promissores segmentos do agronegócio brasileiro, alcançando, nos últimos anos, aumentos da ordem de 8-10% ao ano na produção e de 12-15% nos valores comercializados (Tombolato et al., 2010; Junqueira & Peetz, 2011). O faturamento do setor foi de 3,8 bilhões de reais em 2010, 4,3 bilhões de reais em 2011, e em 2012, estima-se que este valor represente cerca de 5 bilhões de reais (IBRAFLOR, 2012). O mercado nacional absorve a maior parte da produção, que corresponde a 97,3% de todo o valor comercializado. No entanto, o consumo de flores no Brasil (US\$ 7,00 per capita / ano) é baixo quando comparado a países como Bélgica (US\$ 130,00 per capita/ ano), Holanda (US\$ 120,00 / ano) e Argentina (US\$ 25,00 per capita / ano) (Reetz et al., 2007; Junqueira & Peetz, 2011). Apesar do considerável crescimento dos últimos anos, a participação do Brasil no total do mercado mundial de flores e plantas ornamentais é ainda muito pequena e possui, portanto, um grande potencial de crescimento (Buainain & Battle, 2007).

No comércio internacional, o Brasil tem se destacado pela produção de flores bulbosas, sendo os cormos de gladiolo e os bulbos de amarílis, os principais produtos exportados (IBRAFLOR, 2012; Tombolato et al., 2010).

As flores bulbosas são comercializadas principalmente na forma de bulbos e flores de corte. Os gêneros mais utilizados para essa finalidade são *Crocus*, *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Iris*, *Lilium*, *Narcissus* e *Tulipa*, respondendo por cerca de 90% da área destinada ao cultivo desse grupo de plantas ornamentais no mundo (Benschop et al, 2010). As flores bulbosas são cultivadas predominantemente em regiões de clima temperado, sendo a Holanda, o maior produtor mundial (Hertogh et al., 2012). Já no Brasil, o estado de São Paulo é considerado o principal produtor, e os gêneros *Alstroemeria*, *Hippeastrum*, *Zantedeschia*, *Gladiolus*, *Hemerocallis* e *Lilium* os mais cultivados (Tombolato et al., 2010).

Dentre as famílias botânicas que produzem flores bulbosas, destaca-se a Iridaceae, que apresenta gêneros de grande importância econômica, tais como *Crocus*, *Gladiolus* e *Iris* (Meerow, 2012).

O *Gladiolus* é o segundo maior gênero dessa família englobando mais de 260 espécies originárias da África, Madagascar e Eurasia (Goldblatt et al., 2008). As variedades das diferentes espécies de *Gladiolus* são reconhecidas mundialmente devido à variedade de cores, tamanhos e forma das flores. No Brasil, o gladiolo é tradicionalmente cultivado como flor de corte para abastecer o mercado interno, que consome cerca de 60% de toda produção. Nos últimos anos seus cormos também têm se tornado um importante produto para exportação, sendo exportados para a Holanda (12 milhões de cormos) e então redistribuídos para Portugal, Espanha e Itália (Tombolato et al., 2005, 2010).

No sistema de cultivo do gladiolo, dentre os fatores que prejudicam a produção, destaca-se a ocorrência de diversas doenças, resultando na redução da qualidade e da produtividade das flores e cormos bem como no aumento do custo de produção. As doenças que causam maiores danos e perdas à cultura incluem a podridão de fusarium (*Fusarium* spp.), mofo-cinzento (*Botrytis gladiolorum*), podridão-seca (*Stromatinia gladioli*), ferrugem do gladiolo (*Uromyces transversalis*) e manchas foliares causadas por patógenos como *Curvularia* spp., *Septoria gladioli*, *Phyllosticta gladioloides* e *Stemphylium* sp. (Magie, 1953; Shakir et al., 1998; Baiswar et al., 2007; Tombolato et al., 2010).

Curvularia spp. são patógenos de plantas que atuam geralmente como patógenos fracos ou saprófitas, mas que podem causar doenças importantes como a mancha de curvularia em gladiolo, queima das folhas do inhame e mancha de curvularia em milho (Baiswar et al., 2007; Michereff et al., 2008; Akinbode, 2010). A mancha de curvularia está entre as doenças mais destrutivas que ocorrem no gladiolo, sendo que o fungo pode infectar todas as partes da planta. A doença ocorre principalmente em locais com temperaturas entre 18 e 32 °C e chuvas frequentes (Magie, 1953).

A doença é relativamente recente e *Curvularia gladioli* tem, provavelmente, origem em regiões subtropicais da América Central, já que o patógeno não é encontrado em espécies de gladiolos selvagens na África, principal centro de diversidade da planta (Boerema & Hamers, 1989). O primeiro relato de *Curvularia* em gladiolo foi em 1947, na Flórida (Magie, 1948). A doença mostrou-se como uma séria ameaça à indústria de flores de corte, causando a destruição de centenas de acres em poucos meses (Horst, 2008) e, num curto espaço de tempo, tornou-se mundialmente distribuída (Boerema & Hamers, 1989).

O fungo foi primeiro identificado como *Curvularia lunata* (Magie, 1948), mas Parmelle (1956) sugeriu, baseado nas características do hilo, tamanho dos esporos e estudos de infecção, que o patógeno causando a mancha foliar do gladiolo fosse renomeado *Curvularia trifolii* f.sp. *gladioli*. Contudo, o patógeno pode ser distinguido de *C. trifolii* pela explícita curvatura do conídio na terceira célula da base e pela pequena relação comprimento/largura. Por isso o patógeno foi reclassificado e atualmente o binomial em uso é *C. gladioli* (Boerema & Hamers, 1989).

Com relação à taxonomia do gênero *Curvularia*, este, juntamente com *Bipolaris*, *Drechslera* e *Exserohilum*, formam um complexo grupo de fungos, mundialmente distribuídos e conhecidos como helmintosporium graminícolas (Sivanesan, 1987). Espécies desse grupo podem atuar como patógenos tanto de plantas como de animais (Ellis, 1971) e algumas delas tem sido associadas a doenças de grande importância econômica em culturas como cevada, trigo, arroz, sorgo e milho (Kumar et al., 2002; Strange & Scott, 2005; Ali & Yan, 2012). A taxonomia desse grupo de fungos é confusa e alterações na nomenclatura são frequentes (Sivanesan, 1987). Tradicionalmente esses quatro gêneros tem sido diferenciados por características morfológicas, tais como forma do conídio, morfologia do hilo, tipo de germinação, ontogenia do septo e textura dos conidióforos (Goh et al., 1998). No entanto, a recente utilização de técnicas de biologia molecular associada, a tradicional caracterização morfológica dos isolados, tem dado novos rumos à taxonomia desses fungos (Goh et al., 1998; Manamgoda et al, 2011, 2012).

As espécies de *Curvularia* compartilham muitas características morfológicas com o *Bipolaris* spp. e muitas espécies, em ambos os gêneros, têm sido associadas ao teleomorfo *Cochliobolus* (Goh et al., 1998). Segundo Sivanesan (1987) a separação desses grupos é feita com base nas características morfobiométricas dos conídios, como tamanho, número de septos, curvatura e presença ou ausência de desproporcionalidade entre as células do conídio. No entanto, alguns dessas características são partilhadas por espécies em ambos os gêneros, e a identificação do patógeno torna-se artificial (Goh et al, 1998). Estudos recentes desenvolvidos por Goh et al. (1998) e Manamgoda et al. (2012) revelaram, embasados em dados morfológicos e moleculares, que *Curvularia* e *Bipolaris* formam dois clados distintos. O primeiro clado agrupa as espécies de *Bipolaris* que produzem

conídios largos, em forma de canoa, que não formam estromas e estão associadas ao teleomorfo *Cochliobolus*. No segundo clado foram agrupadas as espécies de *Curvularia* e as espécies de *Bipolaris* (*B. australiensis*, *B. coicis*, *B. ellisii*, *B. graminicola*, *B. hawaiiensis*, *B. ovariicola*, *B. ravenelii*, *B. spicifera*, *B. perotidis* e *B. tripogonis*) semelhantes em morfologia à *Curvularia* e *Cochliobolus*. As espécies deste grupo apresentam conídios curtos (geralmente menor que 100 µm), retos a curvos, geralmente formam estroma e estão associadas ao teleomorfo *Pseudocochliobolus* (Manamgoda et al., 2012).

O controle das doenças que ocorrem no gladiolo no Brasil, assim como de outras plantas ornamentais, enfrenta um grande entrave em relação à legislação que regulamenta o uso de defensivos químicos, pois há poucos produtos registrados para aplicação nesse grupo de plantas no país (Tombolato et al. 2010). Dentre as várias doenças que podem ocorrer na cultura, encontram-se registros de produtos químicos apenas para controle daquelas causadas pelos patógenos *B. gladiolorum* e *U. transversalis* (AGROFIT, 2012).

Segundo Magie (1951), a utilização de variedades de gladiolo resistentes é uma estratégia eficiente no controle de doenças, dado o alto custo do controle químico e a sua ineficiência para o controle de algumas importantes doenças, como no caso da podridão de fusarium. Esse mesmo autor cita, ainda, a existência de variedades de gladiolo altamente resistentes à mancha de curvularia nos países em que esta doença já está estabelecida, fazendo com que o melhoramento genético visando a resistência a essa doença possa alcançar resultados satisfatórios.

Os programas de melhoramento genético do gladiolo buscam a melhoria das principais características como coloração, número e forma das flores, capacidade de floração no inverno e de multiplicação e resistência a doenças foliares e dos cormos (Magie, 1960; Cantor, 2006). No Brasil, além das características agronômicas como produtividade e rusticidade, os programas estão focados, principalmente, na busca de materiais resistentes ou tolerantes à ferrugem (*U. transversalis*), considerada a principal doença da cultura no país (Tombolato et al., 2010).

Apesar da importância da mancha de curvularia e os danos causados à cultura em países como Estados Unidos, Canadá, Paquistão e Índia (Magie, 1948; Parmelee, 1954; Shakir et al., 1998; Baiswar et al., 2007) onde a doença

já ocorre, no Brasil não há qualquer informação relacionada com a reação dos principais materiais genéticos de gladiolo a *C. gladioli*. Portanto, os objetivos desse trabalho foram:

- elucidar a etiologia da mancha de curvularia detectada em cultivo de *G. grandiflorus*;
- avaliar a suscetibilidade dos principais materiais genéticos de gladiolo cultivados;
- estabelecer uma relação entre a suscetibilidade dos materiais genéticos e o desenvolvimento das estruturas infectivas de *C. gladioli*;
- estudar o processo infeccioso de *C. gladioli* em folhas de variedades de *G. grandiflorus* suscetível e resistente.

Os estudos propostos objetivam ampliar os conhecimentos sobre essa nova doença relatada no Brasil e possibilitar um melhor entendimento com relação aos aspectos da interação de *C. gladioli* – *Gladiolus* spp. de forma a contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de Praga/Doença. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_. Acesso em: 31/01/2013.

Akinbode OA (2010) Evaluation of antifungal efficacy of some plant extracts on *Curvularia lunata*, the causal organism of maize leaf spot. African Journal of Environmental Science and Technology 4: 797–800.

Ali F, Yan JB (2012) Disease resistance in maize and the role of molecular breeding in defending against global threat. Journal of Integrative Plant Biology 54 (3): 134–151.

Baiswar P, Chandra S, Kumar R (2007) Status of gladiolus diseases and their management in India - A review. Journal of Ornamental Horticulture 10: 209–214.

Benschop M, Kamenetsky R, Le Nard M, Okubo H, De Hertogh A (2010) The Global Flower Bulb Industry: Production, Utilization, Research. Horticultural Reviews 36: 1-115.

Boerema GH, Hamers MEC (1989) Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 3b: Fungi on bulbs: Amaryllidaceae and Iridaceae. Netherlands Journal of Plant Pathology 95 Supplement 3: 1-32.

Buainain AM, Batalha MO (2007) Cadeias produtivas de flores e mel. Brasília: MAPA/SPA.

Cantor M (2006) Genetic breeding of *Gladiolus hybridus* in Romania. HortScience 41(4): 1041.

Ellis, MB (1971) Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.

Goh TK, Hyde KD, Lee DKL (1998) Generic distinction in the *Helminthosporium*-complex based on restriction analysis of the nuclear ribosomal RNA gene. Fungal Diversity 1: 85–107.

Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Davies TJ, Manning JC, Van der Bank M, Savolainen V (2008) Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany* 33: 495–508.

Hertogh AA, Van Scheepen J, Le Nard M, Okubo H, Kamenetsky R (2012) Globalization of the flower bulb industry. In: Kamenetsky R, Okubo H (Eds.) *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production*. Boca Raton (Florida), USA. CRC Press. pp. 1-16.

Horst, RK (2008) *Westcott's Plant Disease Handbook*. 7th Ed. New York. Springer.

IBRAFLOR. 2011 (janeiro a maio): Balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. Disponível em: www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=161. Acesso em: 12/11/2012.

Junqueira AH, Peetz MS (2011) Panorama socioeconômico da floricultura no Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 17(2): 101-108.

Kumar J, Schäfer P, Hückelhoven R, Langen G, Baltruschat H, Stein E, Nagarajan S, Kogel KH (2002) *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*, 3: 185–195.

Magie RO (1948) Curvularia spot, a new disease of gladiolus. *Plant Disease Reporter* 32(1): 11-13.

Magie RO (1951) Breeding gladiolus for disease resistance. *Florida Agricultural Experiment Station Journal Series* N° 36.

Magie RO (1953) Some fungi that attack gladiolus. 1953 USDA Yearbook of Agriculture.

Magie RO (1960) Breeding gladiolus for Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 72: 375-378.

Manamgoda DS, Cai L, Bahkali AH, Chukeatirote E, Hyde KD (2011) *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity* 51:3-42.

Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EHC, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas RG, Tan YP, Hyde KD (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* complex. Fungal Diversity 56: 131–144.

Meerow AW (2012) Taxonomy and Phylogeny. In: Kamenetsky R, Okubo H (Eds.) Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production. Boca Raton (Florida), USA. CRC Press. pp. 17-56.

Michereff SJ, Noronha MA, Maffia LA (2008) Tamanho de amostras para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame no campo. Summa Phytopathologica 34(2): 189-191.

Parmelee JA (1954) *Curvularia* on gladiolus in Canada. Plant Disease Reporter 38: 515-517.

Parmelee JA (1956) The identification of the *Curvularia* parasite of gladiolus. Mycologia 48: 558-567.

Reetz, ER, Santos C, Rigon L, Corrêa S, Lindemann C, Beling RR (2007) Anuário brasileiro das flores 2007. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz.

Shakir AS, Haq E, Ayub M (1998) Studies on pathogenecity and eradication of some fungal disease of gladiolus in Pakistan. Pakistan Journal of Biological Sciences 1 (1): 23-26.

Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. CAB International Mycological Institute, Wallingford, UK.

Strange RN, Scott PR (2005) Plant disease: a threat to global food security. Annual Review of Phytopathology 43: 83-116.

Tombolato AFC, Uzzo, RP, Junqueira AH, Peetz MS, Stancato GC, Alexandre MAV (2010) Bulbosas ornamentais no Brasil. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 16(2): 127-138.

Tombolato AFC, Castro JL, Matthes LAF, Leme JM (2005) Melhoramento genético do gladiolo no IAC: novos cultivares 'IAC Carmim' e 'IAC Paranapanema'. Científica, Jaboticabal, 33(2): 142-147.

ARTIGO 1

(Aceito para publicação Plant Disease)

First Report of *Curvularia gladioli* Causing a Leaf Spot on *Gladiolus grandiflorus* in Brazil

First Report of *Curvularia gladioli* Causing a Leaf Spot on *Gladiolus grandiflorus* in Brazil

D. P. Torres, M. A. Silva, D. B. Pinho, O. L. Pereira, G. Q. Furtado.

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 36570-000, Brazil

Gladiolus (Iridaceae) is a popular bulbous plant grown worldwide as an ornamental garden plant or cut flower due to its attractive color, size and flower shape. In April 2012, leaf spots were observed on plants of *G. grandiflorus* varieties 'T-704' and 'Amsterdam' growing in a field production of cut flowers located in the city of Viçosa, Minas Gerais. The oval to round leaf were brown in color with a dark border surrounded by a halo of yellow tissue. Infected leaf samples were deposited in the herbarium at the Universidade Federal de Viçosa (VIC31897). A fungus was isolated from the leaf spots and a single-spore, pure culture was initiated and grown on corn meal carrot agar (CCA) medium in Petri dishes incubated at 25 °C, under a 12 h photoperiod, for 4 weeks. A sporulating, single-spore culture was deposited at the Coleção de Culturas de fungos fitopatogênicos "Prof. Maria Menezes" (UFRPE, Brazil) code CMM 4055. On CCA medium, the fungal isolate initially appeared white becoming dark after 14 d. Thirty conidia and conidiophores were measured for identification to species. The septate, smooth to pale brown conidiophores were present singly or in groups. The, simple, straight or flexuous conidiophores measured 42.5 to 82.5 × 3.5 to 7.5 µm and some had a geniculate growth pattern. The majority of conidia were curved at the third (central) cell from the base, which was usually enlarged compared to the end cells. The cells at each end of the 3-septate conidia were pale brown, the intermediate cell brown or dark brown, and the third (central) cell was often the darkest. The basal cell had a protuberant hilum. Conidia were smooth and measured 20.0 to 33.5 × 10 to 17.5 µm. These characteristics matched well with the description of *Curvularia gladioli* (1). To confirm this identification, DNA was extracted using a Wizard Genomic DNA Purification Kit and the internal transcribed spacer region (ITS) of rDNA was amplified using ITS1 and ITS4 primers and the partial 28S rDNA region using primers LR0R and LR5. The sequences were deposited in

GenBank as accession No. JX995106 and JX995107, respectively. The ITS sequence matched sequence No. AF071337, *Curvularia gladioli* (2), with 100% identity. This pathogen was first identified as *C. lunata*, but based on the characteristic of the hilum, spore size and pathogenicity testing, the fungus was renamed *C. trifolii* f.sp. *gladioli* (3). Due to the explicit curvature of the conidia at the third cell and the molecular data, the fungus was reclassified as *C. gladioli* (1,2). To confirm Koch's postulates, one-month-old healthy plants of *G. grandiflorus* var. 'T-704' and 'Amsterdam' (5 plants each) were inoculated with a conidial suspension (2×10^4 conidia mL⁻¹) by spraying the foliage. The control plants were sprayed with distilled water. Symptoms were consistent with those initially observed, and all plants developed leaf spots by 4 days after inoculation. *C. gladioli* was consistently recovered from the symptomatic tissue and control plants remained symptomless. To our knowledge, this is the first report of *C. gladioli* causing leaf spot on *G. grandiflorus* in Brazil. Due to a lack of chemical fungicides for management of this pathogen, further studies to evaluate the susceptibility of the main varieties of *G. grandiflorus* grown in Brazil to *C. gladioli* may be necessary.

References: (1) G. H. Boerema & M. E. C. Hamers. Neth. J Pl Path. 95:1, 1989. (2) Manamgoda D. S. et al. Fungal Divers. 56:131, 2012. (3) J. A. Parmelee. Mycologia. 48:558, 1956.

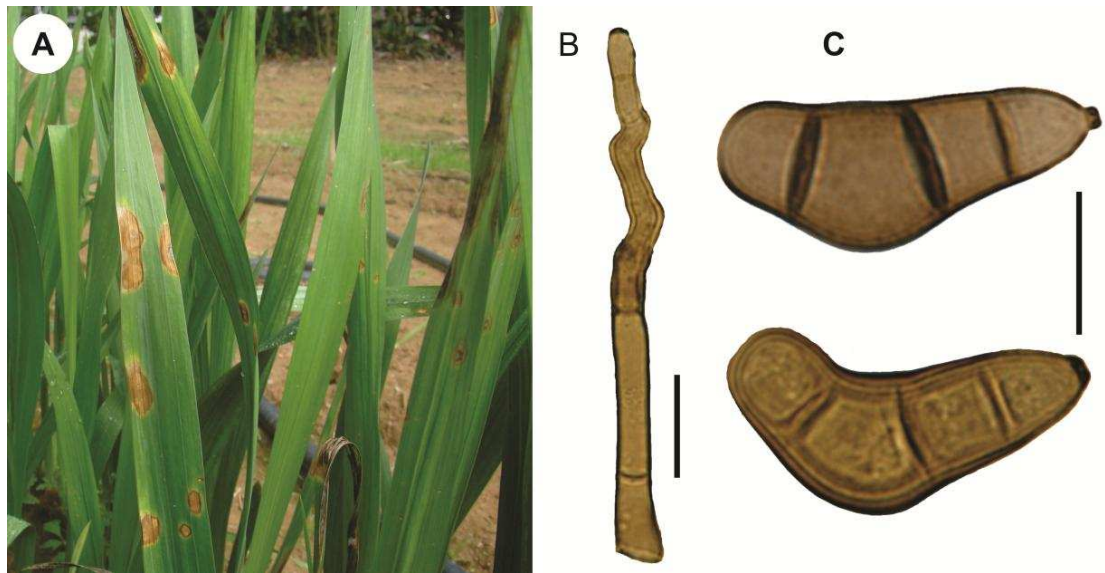


Figure: A, *Gladiolus grandiflorus* var. 704 exhibiting leaf spots caused by *Curvularia gladioli*. B, Detail of geniculate, simple conidiophore of *C. gladioli*. C, Curved, 3-distoseptate conidia of *C. gladioli* with protuberant hilum.

ARTIGO 2

(De acordo com as normas da Tropical Plant Pathology)

Suscetibilidade de gladiolo à mancha de curvularia

Suscetibilidade de gladiolo à mancha de curvularia

Denise P. Torres¹, Mariana A. Silva¹, Gleiber Q. Furtado¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 36570-000, Brasil

Autor para correspondência: Gleiber Q. Furtado, e-mail: gfurtado@ufv.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos avaliar a suscetibilidade de diferentes materiais genéticos de gladiolo (*Gladiolus callianthus* e *Gladiolus grandiflorum* variedades Amsterdam, Red Beauty, Rose Friendship, T-704, Verônica e Yester Gold) e correlacioná-la com o desenvolvimento de estruturas infectivas (germinação e formação de apressórios) do fungo *Curvularia gladioli* na superfície foliar destes genótipos. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de 3×10^4 conídios mL⁻¹ de *C. gladioli*. A avaliação da severidade da mancha de curvularia foi realizada oito dias após a inoculação. Fragmentos de folhas de *G. callianthus* e de *G. grandiflorum* variedades Amsterdam, Red Beauty e T-704 foram coletados 24 h após a inoculação, clareados e quantificada a porcentagem de germinação e de formação de apressórios de *C. gladioli*. As variedades T-704 e Red Beauty foram os materiais genéticos mais suscetíveis, seguidos de *G. callianthus* e da variedade Tradehorn. Os demais materiais não diferenciaram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A porcentagem de germinação de conídios (93,5%) não apresentou diferença entre os materiais genéticos. Porém, para a formação de apressório observaram-se maiores valores para *G. callianthus* (66,5%) e *G. grandiflorus* var. Amsterdam (55,7%) e menores para a variedade T-704 (32,4%). Dessa forma, não houve uma relação entre a suscetibilidade das folhas dos materiais genéticos de gladiolo testados com a germinação dos conídios. No entanto, a porcentagem formação de apressórios de *C. gladioli* foi maior na superfície foliar de genótipos mais resistentes.

Palavras chave: Flores bulbosas, *Curvularia gladioli*, *Gladiolus callianthus*, *Gladiolus grandiflorum*, germinação, apressório

Gladiolus são plantas ornamentais de elevado valor econômico, ocupando posição de destaque no mercado mundial de flores bulbosas (Benschop et al, 2010). Pertencem, juntamente com os gêneros *Iris* e *Crocus*, à família Iridaceae (Meerow, 2012) e englobam mais de 260 espécies originárias da África, Madagascar e Eurasia (Goldblatt et al., 2008). *Gladiolus* com flores de diversas cores estão atualmente disponíveis no mercado, sendo os de colorações branca e vermelha, as preferidas pelo consumidor brasileiro (Tombolato et al., 2010).

Estimam-se que 60% da produção nacional anual de cormos de gladiolo são destinadas à produção de flores de corte para o mercado interno e os outros 40% são exportados, especialmente para Holanda (Tombolato et al., 2010).

Diversos patógenos fúngicos como *Botrytis gladiolorum*, *Curvularia* spp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Septoria gladioli*, *Phyllosticta gladioloides*, *Stemphylium* sp. e *Uromyces transversalis* são patogênicos ao gladiolo resultando na redução da qualidade e da produtividade das flores e cormos, bem como no aumento do custo de produção (Magie, 1953; Baiswar et al., 2007; Shakir et al., 2008; Tombolato et al., 2010).

O primeiro relato de *Curvularia* em gladiolo foi em 1947, na Flórida (Magie, 1948), tornando-se num curto espaço de tempo distribuída mundialmente (Boerema & Hamers, 1989). No Brasil, a espécie *C. gladioli* foi recentemente relatada causando doença em *G. grandiflorum*, variedades T-704 e Amsterdam. As plantas sintomáticas apresentavam manchas foliares ovais a circulares de coloração marrom e bordas escuras, circundadas por um halo amarelado (Torres et al., 2013).

Os programas de melhoramento genético do gladiolo buscam a melhoria das principais características como coloração, número e forma das flores, capacidade de floração no inverno e de multiplicação e resistência a doenças foliares e dos cormos (Magie, 1960; Cantor, 2006). No Brasil, além das características agronômicas como produtividade e rusticidade, os programas estão focados principalmente na busca de materiais resistentes ou tolerantes à ferrugem (*U. transversalis*), considerada a principal doença da cultura no país (Tombolato et al., 2010). Entretanto, apesar da importância da mancha de curvularia, não há informação relacionada com a reação dos materiais

genéticos de gladiolo a *C. gladioli*. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade de diferentes espécies e variedades de *Gladiolus*, cultivadas no Brasil, à mancha de curvularia causada por *C. gladioli* e avaliar se existe uma relação com a germinação dos conídios e formação de apressórios *in vivo*.

Cormos de *G. callianthus* e *G. grandiflorus* variedades, Amsterdam, Red Beauty, Rose Friendship, T-704, Tradehorn, Verônica, e Yester Gold foram cultivados em vasos plásticos contendo substrato composto de uma mistura de areia, terra de barranco e esterco bovino na proporção 2:2:1. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas de 2 a 3 vezes por semana.

Foi utilizado o isolado CMM 4055 de *C. gladioli* (Torres et al., 2013). O isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura milho-cenoura-água sob temperatura de 25 °C, no escuro para induzir a esporulação.

A suspensão de conídios foi obtida a partir de culturas fúngicas com 21 dias de idade. Para a preparação da suspensão de inóculo, 10 mL de água destilada foram adicionados a cada placa de Petri e as estruturas fúngicas removidas com o auxílio de uma alça de Drigalsky e filtrada em uma dupla camada de gaze. Realizou-se a contagem de conídios em câmara de Neubauer e, em seguida, a suspensão foi ajustada para 3×10^4 conídios mL⁻¹.

Para a inoculação, as faces abaxiais de folhas de plantas com 21 dias de idade foram atomizadas até o ponto de máxima retenção de gotas e envoltas por sacos plásticos umedecidos, para criar um ambiente saturado. As plantas foram mantidas em câmaras de crescimento com temperatura ajustada para 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz durante 30 h. Posteriormente, os sacos plásticos foram removidos e as plantas transferidas para câmara climatizada com temperatura ajustada para 22 °C e fotoperíodo de 12 h de luz.

A avaliação da severidade da mancha de curvularia nas diferentes variedades de gladiolo foi realizada aos oito dias após a inoculação das plantas. Fragmentos de 17 cm, a partir da extremidade da folha, foram digitalizados e as imagens com resolução de 200 dpi armazenadas em microcomputador. Posteriormente, as imagens foram analisadas quanto à proporção de tecido doente e sadio, por meio do software QUANT[®] (v.1.01; Universidade Federal de Viçosa, 2003).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento e cada repetição constituída de duas

folhas, folha completamente expandida e folha mais jovem, de um vaso contendo uma planta. O experimento foi repetido uma vez. A homogeneidade de variância dos dois experimentos foi confirmada pelo teste de Bartlett (Gomes & Garcia, 2002) e a análise estatística realizada com a média dos dois experimentos. Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), utilizando-se a transformação arco seno da raiz da proporção da severidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SAS (Version 9.0, Cary, USA).

A porcentagem de germinação de conídios e formação de apressórios foi avaliada em *G. callianthus* e *G. grandiflorus* variedades Amsterdam, Red Beauty e T-704. Cerca de 20 fragmentos de folhas de aproximadamente 1 cm² foram coletados aleatoriamente de cada tratamento 24 h após a inoculação. Para o clareamento dos fragmentos, estes foram imersos em frascos de vidro contendo álcool 70% e submetidos a trocas frequentes do líquido até que quase toda a clorofila fosse retirada. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para frascos de vidro contendo solução saturada de cloral hidratado (Vetec[®]) e mantidos por três dias com o objetivo de se obter o máximo de clareamento. Os fragmentos foram corados com lacto fucsina (0,1%) transferidos para lâminas contendo uma gota de água glicerinada, e observados sob microscópio óptico. Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade e a relação entre as porcentagens de germinação de conídios e de formação de apressórios avaliadas por meio da correlação linear de Pearson, utilizando-se o software SAS (Version 9.0, Cary, USA).

Os materiais genéticos de gladiolo testados apresentaram diferença na suscetibilidade a *C. gladioli*. (Tabela 1). As variedades T-704 e Red Beauty foram consideradas as mais susceptíveis, *G. callianthus* e a variedade Tradehorn apresentaram suscetibilidade intermediária e as variedades Amsterdam, Rose Friendship, Verônica e Yester Gold as menos suscetíveis. Existem várias variedades de gladiolo que são altamente resistentes à mancha foliar causada por *C. gladioli* (Magie, 1953). A suscetibilidade de 46 variedades de gladiolos à podridão de *Fusarium* e às manchas foliares causadas por *Botrytis* e *Curvularia* foram avaliadas por McClellan & Pryor (1957), os quais observaram que, em uma escala de avaliação de 0 a 4, apenas quatro das variedades apresentaram severidade à mancha de curvularia menor ou igual a

um, e dez foram consideradas muito suscetíveis à doença. Porém, a condição de incubação das plantas após a inoculação foi diferente da utilizada neste trabalho. McClellan & Pryor (1957) mantiveram os gladiolos em temperatura de 29° C por 48 h, e posteriormente os transferiram para casa de vegetação até a avaliação dos sintomas da doença.

TABELA 1: Severidade da mancha de curvularia em plantas de *Gladiolus callianthus* e em sete variedades de *Gladiolus grandiflorus*, incubadas em câmara climatizada a 22 °C, oito dias após inoculação com *Curvularia gladioli*.

Material genético	Severidade % *
<i>Gladiolus grandiflorus</i> var. T-704	21,46 A
<i>G. grandiflorus</i> var. Red Beauty	11,92 B
<i>Gladiolus callianthus</i>	5,20 C
<i>G. grandiflorus</i> var. Tradehorn	1,96 CD
<i>G. grandiflorus</i> var. Verônica	1,15 D
<i>G. grandiflorus</i> var. Amsterdam	0,68 D
<i>G. grandiflorus</i> var. Yester Gold	0,34 D
<i>G. grandiflorus</i> var. Rose Friendship	0,05 D

* Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram transformados para arco seno da raiz da proporção da severidade.

As primeiras lesões foram observadas entre 3 a 4 dias após a inoculação das plantas em folhas completamente expandidas. Em relação à sintomatologia, foi observada uma reação diferencial dos materiais genéticos. As variedades mais suscetíveis apresentaram manchas foliares circulares a ovais, coloração cinza a marrom escuro, com ou sem halo amarelo, que se tornavam irregulares e se estendiam ao longo da nervura da folha. Na variedade T-704, as manchas se tornavam necróticas e as folhas adquiriram um aspecto murcho (seco). Na variedade Red Beauty, as manchas também se tornavam necróticas, no entanto, as manchas eram sempre circundadas por halos amarelos. Já em *G. callianthus*, as manchas eram de formato

arredondado e sempre circundadas por halos amarelos. Nas variedades menos suscetíveis Amsterdam, Rose Friendship, Tradehorn, Verônica e Yester Gold foram observadas apenas pequenas manchas de coloração marrom claro a marrom escuro.

McClellan & Marshall (1957) relataram que *C. gladioli* é capaz de infectar a variedade Picardy na faixa de temperatura entre 7° e 30 °C, com a temperatura ótima entre 24° e 30 °C. Já Jackson (1961) relata que a infecção nas folhas das variedades Corona, Valeria e Florida Pink ocorreu apenas na faixa de temperatura de 24° a 36 °C. No presente trabalho, ocorreu infecção foliar em todas as variedades testadas a 22°C, no entanto, não foi observada esporulação do patógeno. Portanto, a não esporulação do patógeno foi, provavelmente, devida a temperatura mais baixa utilizada nesse experimento.

Em relação ao desenvolvimento das estruturas infectivas, os conídios apresentaram germinação polar, ocorrendo, frequentemente, em ambas as extremidades simultaneamente (Figura 2). Os tubos germinativos apresentaram crescimento em direções aleatórias e algumas vezes eram observadas ramificações. A maioria dos conídios (93,5%) germinou 24 h após a inoculação, porém, não houve diferença significativa na porcentagem de germinação sobre os fragmentos de folhas dos materiais genéticos testados. Portanto, não foi observada uma relação entre a suscetibilidade dos genótipos à mancha de curvularia e a porcentagem de germinação dos conídios. Resultados semelhantes foram observados para os patossistemas arroz - *Curvularia tuberculata*, arroz - *Curvularia oryzae*, *Exserohilum turcicum* - milho e *Colletotrichum gloeosporioides* - macieira (De Luna et al., 2002; Muir et al., 2008; e Araújo & Stadnik, 2011). Já Magnani et al. (2007), relataram que, em folhas de diferentes cultivares de soja inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi*, a porcentagem de germinação de conídios na superfície de genótipos suscetíveis foi maior que na superfície de genótipos resistentes e a resistência dos materiais genéticos testados foi observada já na fase de pré-penetração.

Apressórios hialinos eram formados principalmente sob as células da epiderme, mas alguns eram observados sobre estômato. A porcentagem de formação de apressório diferiu entre os materiais genéticos, sendo maior em *G. callianthus* (66,5%) e *G. grandiflorus* variedade Amsterdam (55,7%) e menor em *G. grandiflorus* variedade T-704 (32,4%) (Figura 3). Deste modo, foi observada uma correlação negativa ($r = - 0,64$) entre a severidade da mancha

de curvularia (Tabela 1) e a porcentagem de formação de apressórios (Figura 2). Na maioria dos patossistemas, os eventos iniciais de infecção do patógeno, porcentagem de germinação de conídios e de formação de apressórios, nas superfícies de genótipos suscetíveis e resistentes, são semelhantes (Bell, 1981). Porém, relações diretas entre a porcentagem de formação de apressórios e a suscetibilidade ao patógeno têm sido encontradas nos patossistemas guaraná - *Colletotrichum guaranicola*, tomate - *Alternaria solani* e soja - *P. pachyrhizi* (Bentes & Matsuoka, 2002; Araujo & Matsuoka, 2003; Magnani et al., 2007).

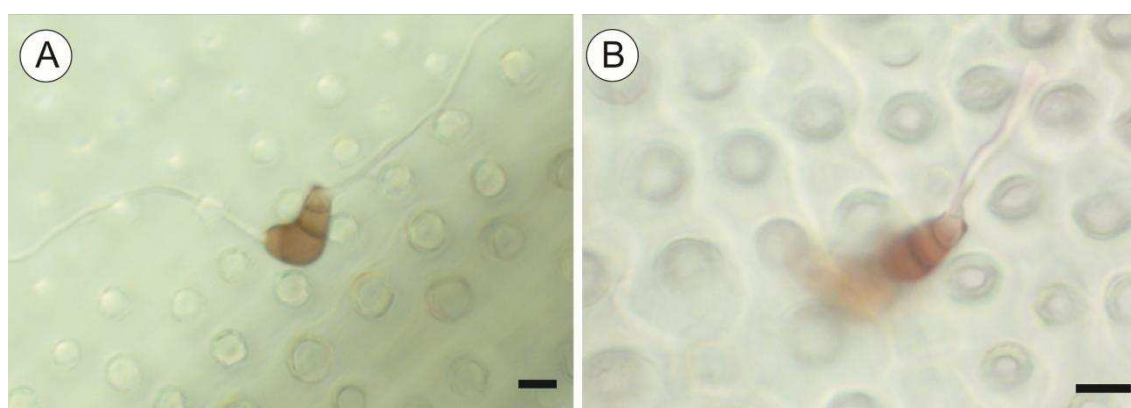


FIGURA 1: Germinação de conídios de *Curvularia gladioli* inoculados sobre a superfície abaxial de *Gladiolus grandiflorus* variedades Amsterdam (A) e Red Beauty (B) a 25 °C, 24 h após a inoculação, A. Germinação bipolar; B. Germinação unipolar com formação de apressório hialino sobre as células da epiderme. Barras= 10 µm.

A maioria dos conídios penetrou na folha diretamente e alguns, cerca de 16%, penetraram via estômato. Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de penetração por estômato entre os genótipos.

Os resultados deste trabalho indicam que os diferentes genótipos de gladiolo cultivados no país apresentam reação diferencial à mancha de curvularia, sendo *G. grandiflorus* variedade T-704 o mais suscetível e *G. grandiflorus* variedades Amsterdam, Rose Friendship, Verônica e Yester Gold os menos suscetíveis. A resistência a essa doença não está relacionada à porcentagem de germinação de conídios do patógeno, no entanto, correlaciona-se positivamente com a porcentagem de formação de apressórios.

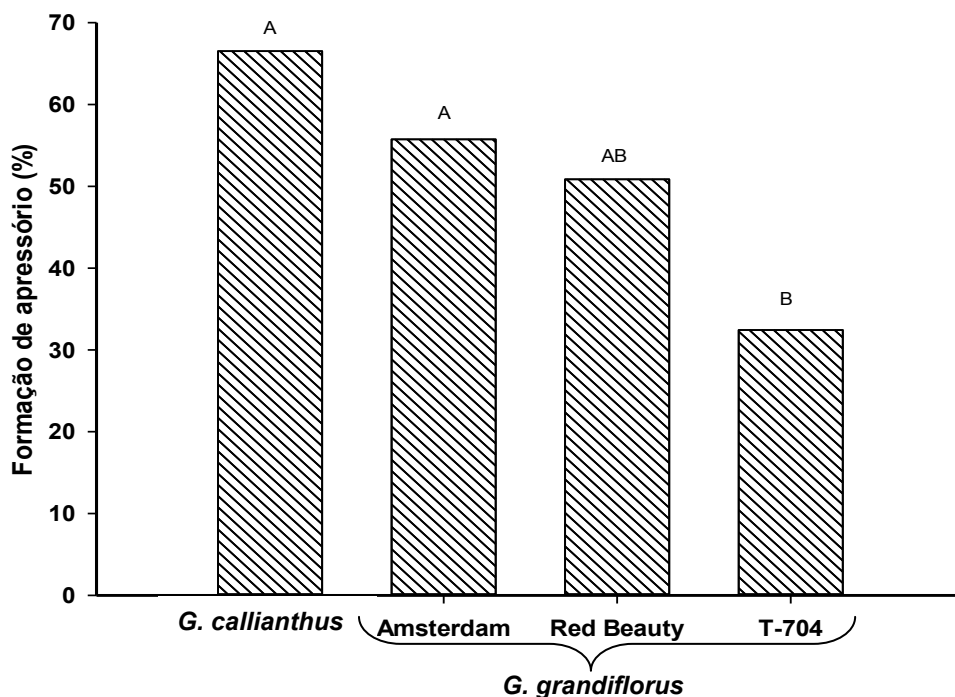


FIGURA 2: Porcentagem de formação de apressórios de *Curvularia gladioli* inoculados na superfície abaxial de folhas de *Gladiolus callianthus* e de *Gladiolus grandiflorus* variedades Amsterdam, Red Beauty e T-704, 24 h após a inoculação. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Considerando a alta suscetibilidade de alguns materiais genéticos de *Gladiolus* à mancha de curvularia, é de grande importância que novos estudos englobando um número maior de variedades e de isolados deste patógeno sejam realizados com o objetivo de detectar fontes de resistência dessa ornamental a *C. gladioli*.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos do primeiro autor e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo JCA, Matsuoka K (2004) Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomates resistentes e suscetíveis. Fitopatologia Brasileira 29:268-275.

Araújo L, Stadnik MJ (2011) Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de glomerella causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. Tropical Plant Pathology 36(4): 241-248.

Baiswar P, Chandra S, Kumar R (2007) Status of gladiolus diseases and their management in India - A review. Journal of Ornamental Horticulture 10: 209-214.

Bell AA (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. Annual Review of Plant Physiology 32: 21-81.

Benschop M, Kamenetsky R, Le Nard M, Okubo H, De Hertogh A (2010) The Global Flower Bulb Industry: Production, Utilization, Research. Horticultural Reviews 36: 1-115.

Bentes JLS, Matsuoka K. (2002) Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. Fitopatologia Brasileira 27: 71-77.

Boerema GH, Hamers MEC (1989) Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 3b: Fungi on bulbs: Amaryllidaceae and Iridaceae. Netherlands Journal of Plant Pathology 95 Supplement 3: 1-32.

Cantor M (2006) Genetic breeding of *Gladiolus hybridus* in Romania. HortScience 41(4): 1041.

De Luna LZ, Watson AK, Paulitz TC (2002) Reaction of rice (*Oryza sativa*) cultivars to penetration and infection by *Curvularia tuberculata* and *C. oryzae*. Plant Disease 86:470-476.

Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Davies TJ, Manning JC, Van der Bank M, Savolainen V (2008) Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. Systematic Botany 33: 495-508.

Gomes FP, Garcia CH (2002) Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais. Piracicaba: FEALQ.

Jackson CR (1961) Some host-parasite relationships in the curvularia disease of gladiolus in Florida. Plant Disease Reporter 45(7): 512-516.

Magie RO (1953) Some fungi that attack gladiolus. 1953 USDA Yearbook of Agriculture.

Magie RO (1960) Breeding gladiolus for Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 72: 375-378.

Magie, RO (1948) Curvularia spot, a new disease of gladiolus. Plant Disease Reporter 32(1): 11-13.

Magnani EBZ, Alves E, Araújo DV (2007) Eventos dos processos de pre-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. Fitopatologia Brasileira 31: 156-160.

McClellan WD, Marshall BH (1950) Effect of temperature on the development of some diseases of *Gladiolus*, *Narcissus* and *Lilium*. Phytopathology 40: 872.

McClellan WD, RL Pryor (1957) Susceptibility of gladiolus varieties to *Fusarium*, *Botrytis* and *Curvularia*. Plant Disease Reporter 41: 47-50.

Meerow AW (2012) Taxonomy and Phylogeny. In: Kamenetsky R, Okubo H (Eds.) Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production. Boca Raton (Florida), USA. CRC Press. pp. 17-56.

Muiru WM, Mutitu EW, Kimenju JW, Koopmann B, Tiedemann AV (2008) Infectious structures and response of maize plants to invasion by *Exserohilum turcicum* in compatible and incompatible host pathogen systems. Journal of Applied Biosciences 10(2): 532 - 537.

Shakir AS, Haq E, Ayub M (1998) Studies on pathogenecity and eradication of some fungal disease of gladiolus in Pakistan. Pakistan Journal of Biological Sciences 1 (1): 23-26.

Tombolato AFC, Uzzo, RP, Junqueira AH, Peetz MS, Stancato GC, Alexandre MAV, (2010) Bulbosas ornamentais no Brasil. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 16(2): 127-138.

Torres DP, Silva MA, Pinho DB, Pereira OL, Furtado GQ (2013) First report of *Curvularia gladioli* causing a leaf spot on *Gladiolus grandiflorus* in Brazil. Plant Disease (no prelo).

ARTIGO 3

(De acordo com as normas da European Journal of Plant Pathology)

Processo infeccioso de *Curvularia gladioli* em folhas de *Gladiolus grandiflorum*

Processo infeccioso de *Curvularia gladioli* em folhas de *Gladiolus grandiflorum*

Denise Pereira Torres¹, Mariana Aparecida Silva¹ e Gleiber Quintão Furtado^{1,*}

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 36570-000, Brasil; * Autor para correspondência

(Fax: +055 31 3899-2629; E-mail: gfurtado@ufv.br)

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo elucidar o processo infeccioso de *Curvularia gladioli* em folhas de variedades de *Gladiolus grandiflorum* variedades T-704 (suscetível) e Verônica (resistente), utilizando-se microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Plantas de ambas as variedades foram inoculadas com uma suspensão de 2×10^4 conídios mL⁻¹ de *C. gladioli*. As amostras de folhas de ambas as variedades foram coletadas 1, 3, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 192 h após a inoculação (h.a.i.) e submetidas ao clareamento para as análises de ML e ao processamento para MEV. Os conídios apresentaram germinação polar e a maioria emitiu de um a dois tubos germinativos. A germinação dos conídios foi observada nas amostras já após 1 h.a.i tanto na variedade suscetível (40,9%) como na resistente (48,5%). A maior porcentagem de germinação de conídios e de formação de apressórios foi, respectivamente, 96,5% e 58,4% nas variedades suscetível e 98% e 54,9% na resistente, as 24 h.a.i. Protoapressórios foram visualizados principalmente sobre as células da epiderme após 1 e 3 h.a.i. na variedade resistente e suscetível, respectivamente. A penetração foliar foi principalmente a direta, mas também foi observada a penetração por estômatos. O crescimento intra e intercelular de hifas do patógeno foi observado na variedade suscetível (96 h.a.i.) e na resistente (192 h.a.i.), sendo que na variedade resistente foi observado menor desenvolvimento das hifas no tecido foliar do hospedeiro. A esporulação ocorreu em ambas às variedades entre 7 a 8 dias após a inoculação. Os conidióforos foram observados emergindo através de tricomas e de aberturas estomáticas. Estes resultados mostram que *C. gladioli* apresentou um desenvolvimento semelhante durante a pré-penetração em ambas as variedades e uma colonização e reprodução mais abundante na variedade

suscetível. Estas informações são importantes para o entendimento da interação entre *C. gladioli* e variedades suscetíveis e resistentes de *G. grandiflorum*.

Palavras chaves: germinação, infecção, colonização, reprodução, mancha de curvularia, gladiolo

Introdução

O gladiolo possui grande importância para o setor de plantas ornamentais. No Brasil, é tradicionalmente cultivado como flor de corte para abastecer o mercado interno, que consome cerca de 60% do que é produzido no país. No entanto, nos últimos anos, seus cormos têm se tornado um importante produto para exportação, sendo a Holanda o principal país importador (Tombolato et al. 2005).

Dentre as doenças do gladiolo, a mancha de curvularia é considerada uma das mais destrutivas, principalmente quando cultivados em locais com temperaturas entre 18 e 32 °C e chuvas frequentes (Magie 1953).

Essa doença, causada pelo fungo *Curvularia gladioli* Boerema & Hamers, foi relatada recentemente no Brasil causando manchas foliares em *Gladiolus grandiflorum* (Torres et al. 2013). Em um estudo prévio realizado por Torres e colaboradores (Dados não publicados) visando avaliar a suscetibilidade dos principais materiais genéticos de gladiolo cultivado no Brasil à mancha de curvularia, os autores observaram uma reação diferencial ao patógeno. No entanto, informações relacionadas aos aspectos da interação *C. gladioli* - gladiolo são inexistentes. Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi elucidar o processo infeccioso de *C. gladioli* em folhas de variedade de *G. grandiflorum* suscetível e resistente ao patógeno, utilizando-se técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.

Material e Métodos

Obtenção, cultivo e preparo do inóculo

Utilizou-se neste estudo o isolado monósporico CMM 4055 de *C. gladioli* (Torres et al., 2013). O isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura milho-cenoura-ágar e incubado sob temperatura de 25 °C, no escuro, durante 21 d.

Para a preparação da suspensão de inóculo, 10 mL de água destilada foram adicionados em cada placa de Petri contendo o isolado CMM 4055. Os conídios foram removidos com o auxílio de uma alça de Drigalsky e filtrado em dupla camada de gaze. Realizou-se a contagem de conídios em câmara de Neubauer e, em seguida, a suspensão foi ajustada para 2×10^4 conídios mL⁻¹.

Cultivo e Inoculação das plantas

Foram utilizadas plantas de gladiolo (*G. grandiflorus*) pertencentes às variedades T-704 (suscetível) e Verônica (resistente) crescidas em substrato composto de uma mistura de areia, terra de barranco e esterco bovino, na proporção 2:2:1. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas de 2 a 3 vezes por semana.

Para a inoculação, as faces abaxiais de plantas com 21 dias de idade foram atomizadas até o ponto de máxima retenção de gotas e envoltas por sacos plásticos umedecidos, para criar um ambiente saturado. As plantas foram mantidas em câmaras de crescimento com temperatura ajustada para 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz, durante 30 h. Posteriormente, os sacos plásticos foram removidos e as plantas transferidas para câmara climatizada com temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12 h de luz, onde permaneceram até o final das coletas das amostras.

Microscopia de luz

Para a avaliação da porcentagem de germinação de conídios e de formação de apressórios na superfície foliar das variedades T-704 e Verônica, cerca de cinco fragmentos de folhas de aproximadamente 1 cm² foram coletados aleatoriamente de cada tratamento 1, 3, 8, 12 e 24 após a inoculação (h.a.i.). Para o clareamento dos fragmentos, estes foram inicialmente armazenados em frascos contendo álcool 70%. Este solvente foi substituído até que quase toda a clorofila fosse removida. Posteriormente, os fragmentos

foram transferidos para frascos de vidro contendo solução saturada de cloral hidratado (Vetec[®]) e mantidos por três dias com o objetivo de se obter o máximo de clareamento. Os fragmentos foram montados em lâminas contendo uma gota de água glicerizada, corados com lacto fucsina (0,1%) e observados em microscópio óptico.

Microscopia eletrônica de varredura

Para as observações ao microscópio eletrônico de varredura, dez fragmentos, obtidos conforme citado anteriormente, foram coletados 1, 3, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 192 h.a.i. Os fragmentos obtidos foram depositados em tubos plásticos contendo 1 mL de solução fixadora (2,5% v/v de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) e mantidos em temperatura de 8 °C. Após sete dias, os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1M) e desidratados em uma série alcoólica 30, 50, 70, 80, 95 e 100 %, com intervalos de 10 min entre as trocas. Após a desidratação, o material foi submetido à secagem no ponto crítico em CO₂ utilizando-se o aparelho “Critical Point Dryer” (Balzers, modelo CPD020). Fragmentos coletados 72 e 96 h após a inoculação tiveram a epiderme removida, com o auxílio de uma fita adesiva, para a visualização de estruturas do fungo no interior do tecido hospedeiro. Os fragmentos foram montados sobre suportes metálicos de alumínio, cobertos com ouro por meio de metalização no aparelho “Sputter Coater” acoplado a um “Freezing Drying Unit” (Balzers, FDU010). Posteriormente, examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (LEO, modelo 1430VP) operando a 20 kv. Para cada tratamento, um stub com três fragmentos de folha foi examinado ao MEV.

Resultados

Desenvolvimento de estruturas infectivas e penetração fúngica

Não houve diferença no desenvolvimento de estruturas infectivas de *C. gladioli* sobre as folhas das variedades T-704 (suscetível) e Verônica (resistente). Uma hora após a inoculação já foi possível observar germinação dos conídios, para a variedade T-704 e Verônica foi observado 40,9% e 48,5%

de germinação, respectivamente. A germinação máxima foi visualizada 24 h.a.i., tanto para a variedade suscetível (96,5%) quanto para a resistente (98%) (Figura 1). Os conídios emitiram tubos germinativos a partir de células das extremidades dos esporos (Figura 2). A maioria dos conídios produziu de um a dois tubos germinativos, ramificados ou não, e geralmente em sentidos opostos (Figura 2D). Conídios emitindo mais de dois tubos germinativos também foram observados (Figura 2B). O crescimento do tubo germinativo na superfície da folha foi aleatório, podendo penetrar através dos estômatos ou encontrá-lo e continuar crescendo em outra direção (Figura 2A).

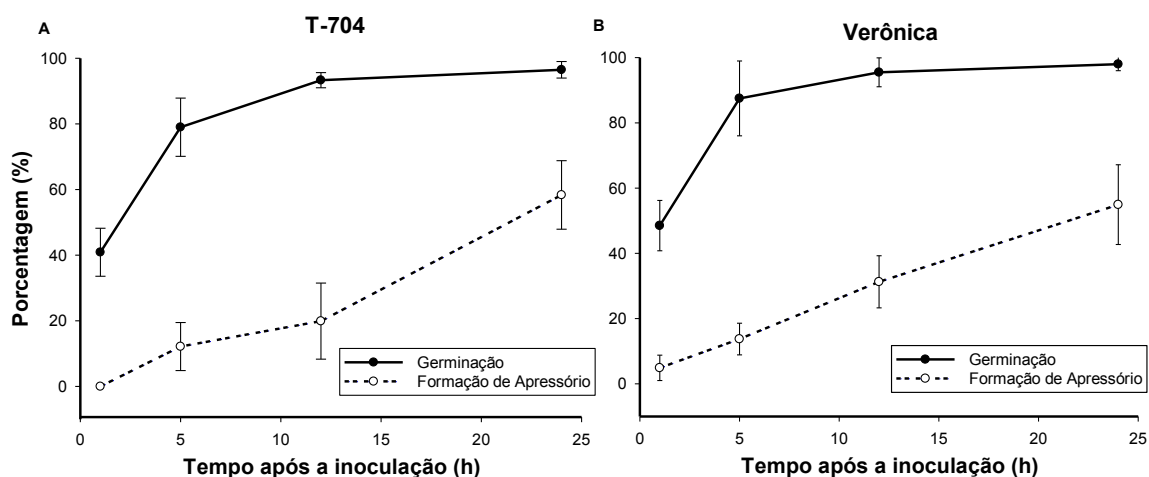


Figura 1: Porcentagem de germinação de conídios e de formação de apressórios de *Curvularia gladioli* na superfície foliar de *Gladiolus grandiflorus* resistente e suscetível. A: Variedade suscetível (T-704); B: Variedade resistente (Verônica).

Protoapressório, apressórios dilatados, não melanizados e raramente delimitados por septos, foram primeiramente observados com uma e três h.a.i. na variedade Verônica e na T-704, respectivamente (Figura 2A). Apressórios simples, hialinos e septados foram visualizados ocasionalmente (Figura 2D). Protoapressórios e apressórios foram visualizados principalmente sob as células da epiderme, mas também sobre estômato (Figura 2A). Não foi observada formação direta de apressório a partir da extremidade do conídio e nem a formação de estruturas complexas ou almofadas de infecção. Indícios da adesão do conídio na superfície foliar foram observados a partir de 3 h.a.i.

(Figura 2C). A penetração foliar foi principalmente a direta, mas também observada a penetração por estômatos.

Colonização fúngica e esporulação

Nas amostras obtidas 96 h.a.i. foram visualizados crescimentos intra e intercelular de hifas de *C. gladioli* em células do parênquima e em vasos xilemáticos da variedade suscetível, entretanto, na variedade suscetível não foi possível observar colonização nos tecidos de fragmentos coletados no mesmo horário (Figura 3A, B e C). Nas amostras com 192 h.a.i. foi observado crescimento abundante de hifas na superfície foliar do material suscetível, enquanto que no material resistente as hifas eram escassas e pouco distribuídas sobre o tecido hospedeiro (Figuras 4A e 4C). Conidióforos solitários ou em grupos (Figura 4B) foram vistos emergindo através de tricomas (Figura 4D) e, menos frequente, de estômatos (Figura 4E). Estes eram solitários ou em grupos, septados e de coloração marrom. Conídios apresentavam hilo protuberante, eram escuros (Figura 2D) e 3-distoseptado.

Sintomas da mancha de curvularia em folhas de gladiolo de material genético suscetível e resistente

Os primeiros sintomas da doença foram observados 3 ou 4 dias após a inoculação das plantas, em ambas as variedades. Na variedade T-704 foram observadas manchas foliares de coloração cinza a marrom escuro, circulares a ovais, que se coalesciam e se estendiam ao longo da nervura. Posteriormente, as manchas tornavam-se necróticas e as folhas adquiriram um aspecto murcho (seco). Já na variedade Verônica foram observadas apenas pequenas manchas de coloração marrom claro a marrom escuro, circundadas por halo amarelo, com uma baixa distribuição na superfície foliar.

Uma massa negra de conídios e conidióforos pode ser vista no centro das lesões, principalmente próximo as nervuras, das duas variedades cerca de uma semana após a inoculação (Figura 5).

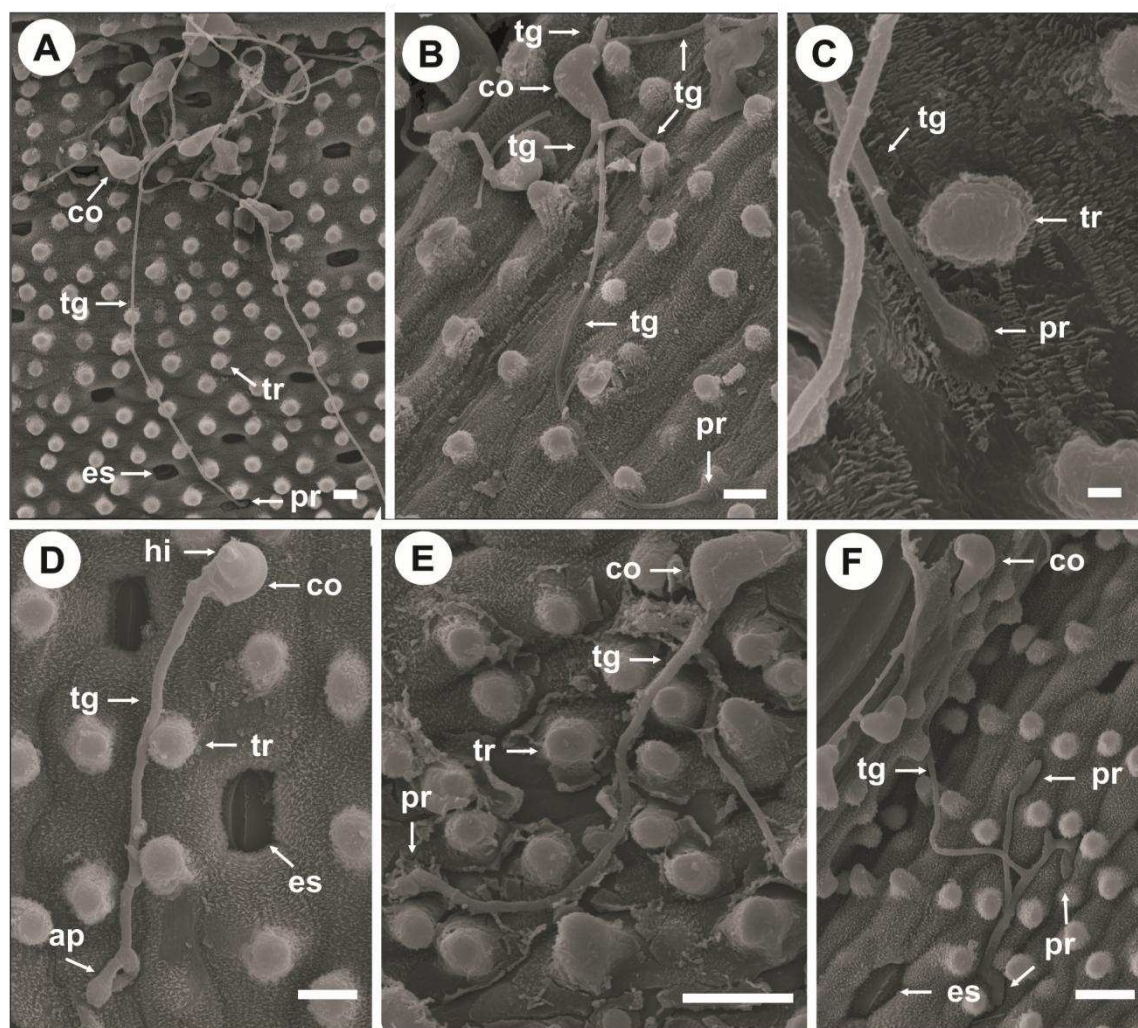


Figura 2: Fotomicroscopia eletrônica de varredura de folhas de *Gladiolus grandiflorus* variedade T-704, suscetível, inoculadas com *Curvularia gladioli*. A: Germinação polar de conídios e formação de protoapressórios sobre estômatos 3 horas após a inoculação (h.a.i.) (Barra= 10 μ m); B: Germinação bipolar de conídios com a emissão de cinco tubos germinativos e formação de protoapressório 12 horas (h.a.i.) (Barra= 10 μ m); C: Evidência da adesão de apressório na superfície foliar do hospedeiro 12 h.a.i. (Barra= 3 μ m); D: Germinação unipolar de conídio e formação de apressório 24 h.a.i. (Barra= 10 μ m); E: Degradação da cera epicuticular da superfície foliar por protoapressórios de *C. gladioli* 24 h.a.i. (Barra= 20 μ m); F: Ramificação do tubo germinativo e formação de múltiplos protoapressórios 24 h.a.i. (Barra= 20 μ m). ap, apressório; co, conídio; es, estômato; hi, hilo; tg, tubo germinativo; pr, protoapressório; tr, tricoma.

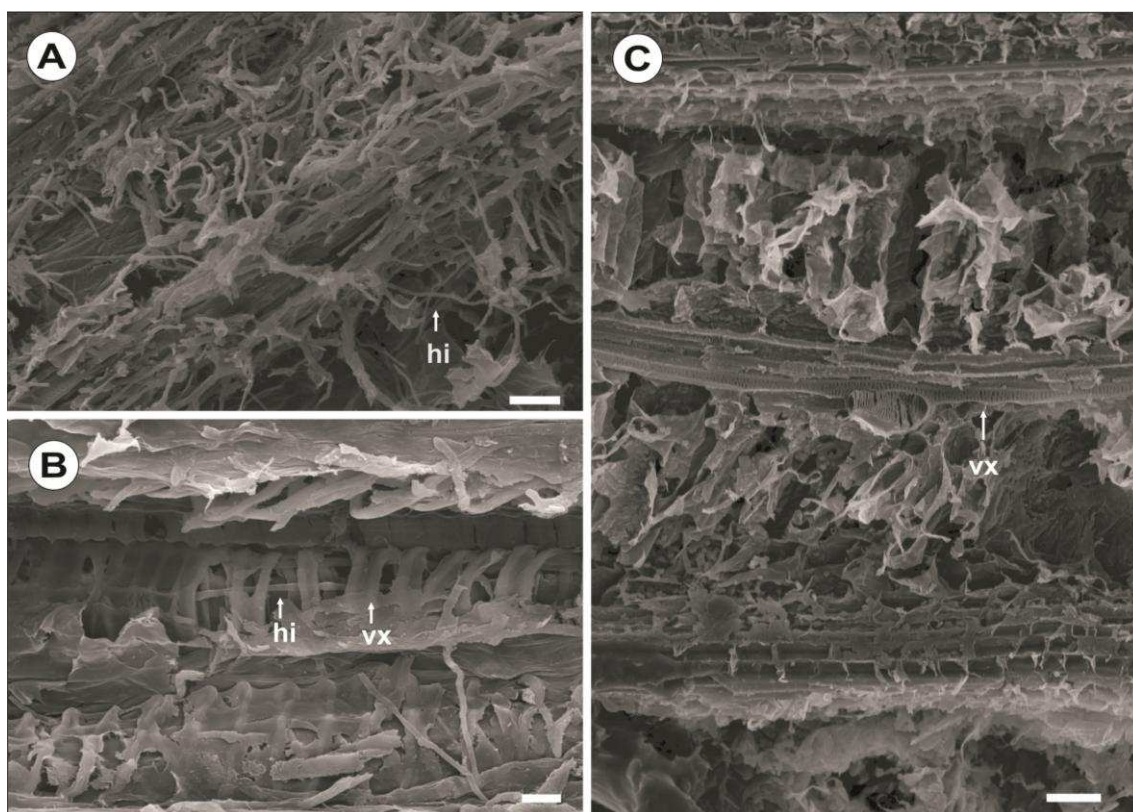


Figura 3: Fotomicroscopia eletrônica de varredura de folhas fraturadas de *Gladiolus grandiflorus* variedade suscetível (A, B) e resistente (C) 96 horas após a inoculação com *Curvularia gladioli*. A: Profuso crescimento intracelular e intercelular de hifas no parênquima (Barra = 30µm); B: Crescimento de hifas no interior dos vasos xilemáticos (Barra = 10µm); C: Ausência de crescimento de hifas no interior dos tecidos da variedade resistente (Barra = 30µm). hi, hifas; vx, vaso xilemático.

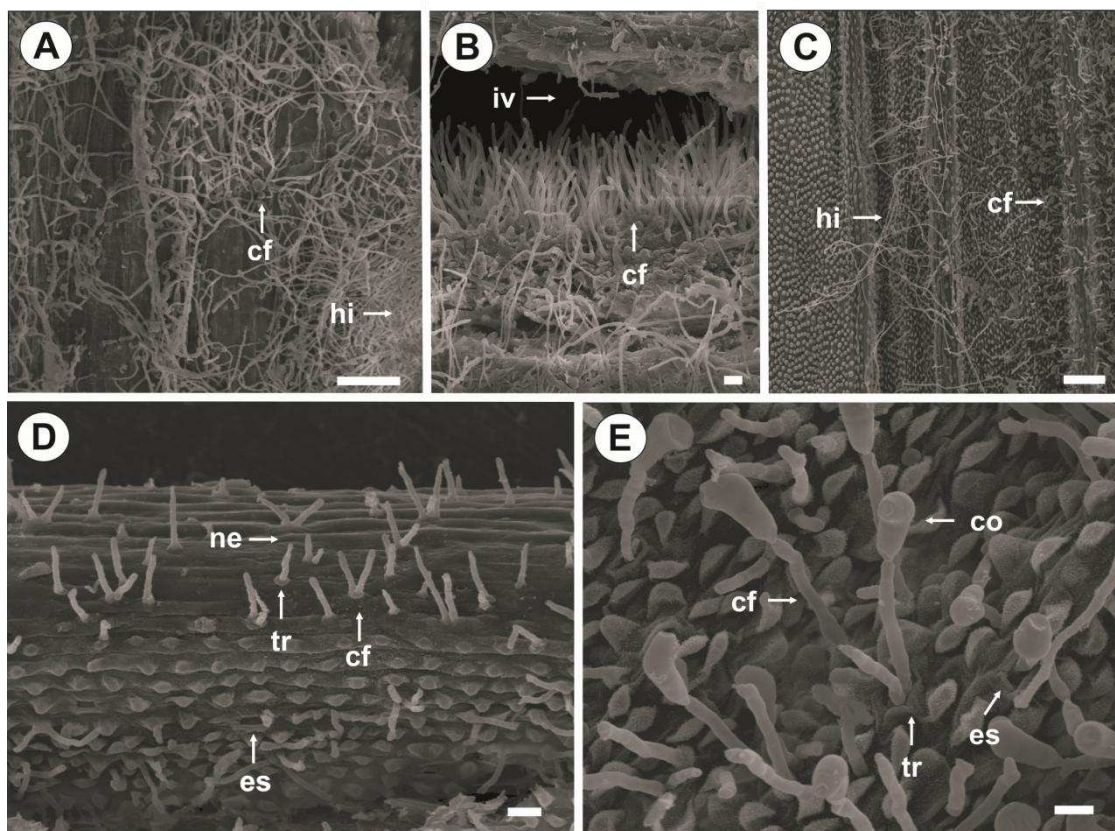


Figura 4: Fotomicroscopia eletrônica de varredura da superfície foliar de folhas de gladiolo suscetível (A, B) e resistente (C-E) 192 horas após a inoculação com *Curvularia gladioli*. A: Abundante crescimento de hifas na superfície de folhas da variedade T-704 (Barra = 100µm); B: Conidióforos sobre invaginações existente na superfície foliar da variedade T-704 (Barra = 20µm); C: Abundante formação de conidióforos na superfície de folhas da variedade Verônica (Barra = 100µm); D: Conidióforos emergindo de tricomas da nervura de folhas da variedade Verônica (Barra = 20µm); E: Conidióforos e conídios sobre a superfície foliar da variedade Verônica (Barra = 10µm). cf, conidióforo; co, conídio; es, estômato; iv, invaginações; hf, hifas; ne, nervura; tr, tricoma.

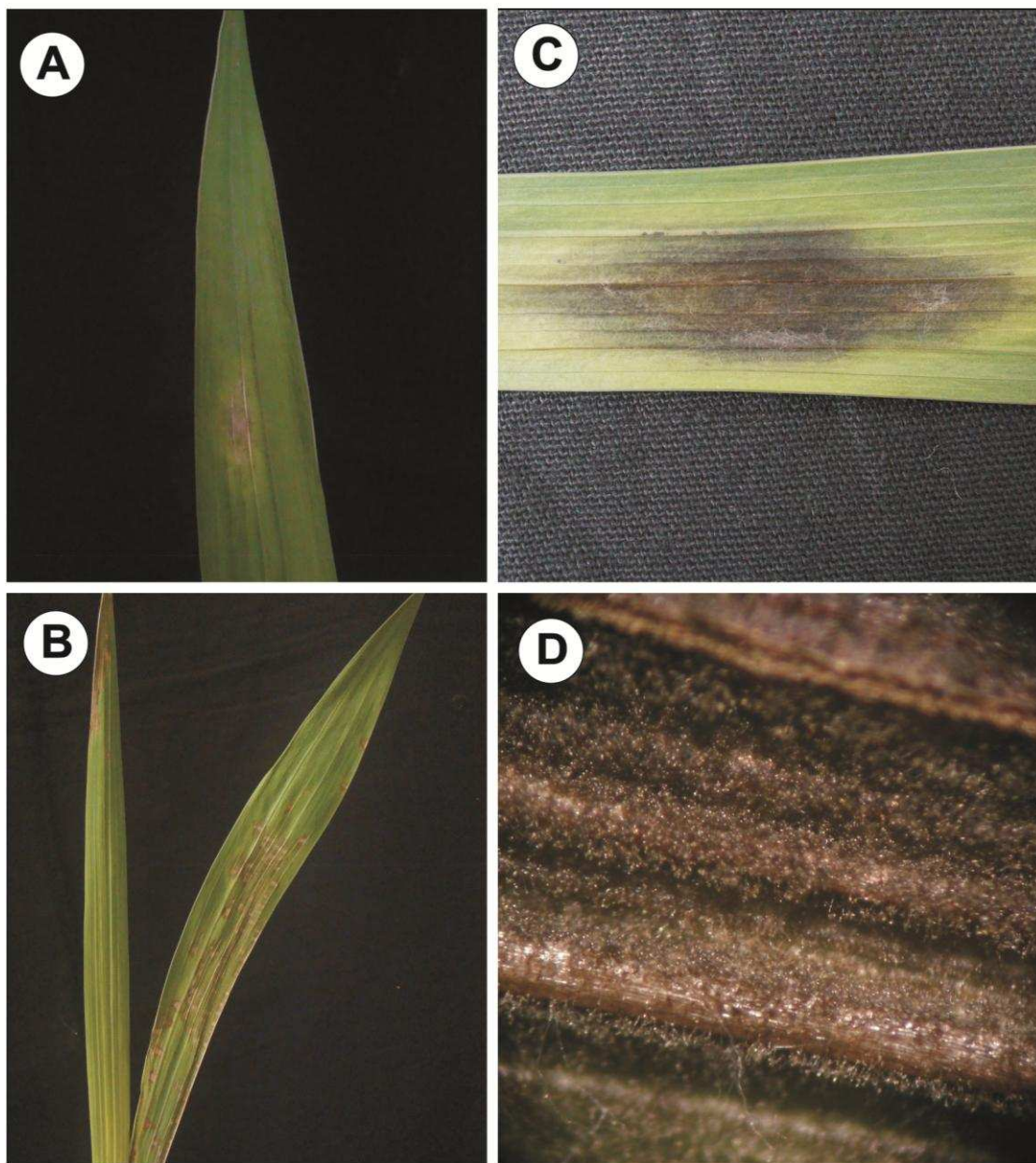


Figura 5: Mancha de curvularia causada por *Curvularia gladioli* em folhas de *Gladiolus grandiflorus* variedades Verônica (A) e T-704 (B, C e D). A e B: Folha apresentando sintomas da doença 7 d.a.i. (dias após a inoculação); B: Lesão necrótica com intensa esporulação do patógeno aos 11 d.a.i.; C: Lesões necróticas com intensa esporulação fúngica.

Discussão

O presente estudo mostra que não houve diferença nos eventos de pré-penetração de *C. gladioli* na variedade suscetível e na resistente. Os conídios, na superfície foliar de ambas as variedades, emitiram tubo germinativo a partir de uma ou de ambas as extremidades, nas proximidades do hilo, e cresceram semiaxialmente, conforme relatado para *C. lunata* e outras espécies de *Curvularia* (Sivanesan 1987). Formação de mais de um tubo germinativo por conídio também foi relatado para outras interações, tais como *Curvularia tuberculata* e *Curvularia oryzae* na superfície foliar de arroz (De Lana et al. 2002), *Exserohilum turcicum* em folhas de milho (Muiru et al. 2008), *Alternaria solani* em tomate (Araujo & Matsuoka 2004), *Cercospora coffeicola* em café (Souza et al. 2011), *Cercospora henningsii* (Babu et al. 2009) em mandioca e *Ramularia areola* em algodão (Curvelo et al. 2010). De acordo com Babu et al. (2009), a formação de múltiplos sítios de penetração de *C. henningsii*, em folhas de mandioca, a partir de um único conídio contribui para uma maior agressividade do patógeno. O conídio germinado apresentou também um extensivo crescimento dos tubos germinativos na superfície das folhas de gladiolo antes da formação de apressórios e penetração do patógeno. Este intenso crescimento do tubo germinativo na superfície do hospedeiro foi também observado por Jansson & Åkesson (2003) ao estudar a interação entre *Bipolaris sorokiniana* e cevada.

A formação de apressórios é essencial no processo infeccioso de alguns patógenos como *A. solani* e *E. turcicum* (Araujo & Matsuoka 2004; Muiru et al. 2008). Já para outros como *Alternaria cassiae*, *R. areola* e *C. coffeicola* é opcional ou desnecessária (Van Den Berg et al. 2003; Curvelo et al. 2010; Souza et al. 2011). A formação de apressórios em *C. gladioli* parece ser necessária para ocorrer a infecção, pois não foi observada penetração direta e nem por estômatos de extremidades de tubos germinativos que não formaram essa estrutura.

Jansson & Åkesson (2003) não observaram a formação de apressórios de *B. sorokiniana* em superfícies artificiais, levando-os a concluir que a formação de apressórios por esse patógeno necessita de sinais tigmotrópicos. Entretanto, a formação de apressórios em *C. gladioli* não parece necessitar de sinais tigmotrópicos, pois foi observada a formação de apressórios do patógeno

na superfície de placas de Petri de poliestireno (Torres et al. Dados não publicados).

Os fungos fitopatogênicos podem formar apressórios simples ou complexos. Apressórios simples originam-se de uma célula única, modificada e são formados nas extremidades dos tubos germinativos, mas também podem ser formados em hifas miceliais. Já os apressórios complexos são geralmente formados em hifas e originam-se de várias células (Emmett & Parbery, 1975). Neste trabalho, apenas apressórios simples foram observados. Apressórios simples têm sido observados nos patossistemas arroz - *C. oryzae*, arroz - *C. tuberculata* e sorgo - *Gloeocercospora sorghum* (De Lana et al. 2002; Myers e Fry 1978). Já apressórios complexos têm sido observados nos patossistemas algodão - *Rhizoctonia solani*, damasco - *Monilinia fructicola*, nectarina - *Botrytis cinerea* e ameixa - *B. cinerea* (Armentrout & Downer 1986; Fourie e Holz 1995; Cruickshank e Wade 1992). Protoapressórios ocorrem em *Gloeocercospora sorghum* e *B. cinerea* (Myers e Fry 1978; Fourie e Holz 1995) e diferem dos apressórios melanizados produzidos por *Colletotrichum* spp. e *Magnaporthe grisea* (Agrios 2005; Araújo e Stadnik 2011) e também dos apressórios dilatados, hialinos, porém delimitados por septos, produzidos por *B. cinerea* (Dinh et al. 2011) e *Phakopsora pachyrhizi* (Koch et al. 1983).

A adesão do protoapressórios de *C. gladioli* foi, possivelmente, devido à formação de matrizes extracelulares. A adesão dos esporos fúngicos na superfície foliar da planta hospedeira é essencial e determinante para o sucesso da infecção (Tucker e Talbot 2001). A adesão envolve tanto a formação de matrizes extracelulares como, por exemplo, as produzidas por *Cochliobolus heterostrophus* (Braun e Howard 1994) e *Bipolaris sorokiniana* (Jansson e Akesson 2003) quanto a produção de enzimas líticas, tais como as cutinases produzidas por *Uromyces viciae-faba* (Deising et al. 1992) e as esterases produzidas por *U. viciae-faba* (Deising et al. 1992) e *Curvularia eragrostidis* (Wang et al. 2006). Também foram observadas zonas livres de ceras epicuticulares em torno de alguns apressórios, o que, segundo Jansson e Åkesson (2003) são indícios de atividade enzimática, provavelmente esterases, como relatado pelos autores no patossistema cevada - *Bipolaris sorokiniana*.

A penetração de *C. gladioli* em ambas as variedades ocorreu tanto diretamente quanto por estômatos, indo ao encontro ao relatado por Boerema e Hamers (1989) e Torres et al. (Dados não publicados). Penetração direta foi

também observada nos patossistemas *C. eragrostidis* - *Digitaria sanguinalis* (Wang et al. 2006) *A. cassiae* - feijão caupi (Van Den Berg et al. 2003), *E. turcicum* - milho (Muiru et al. 2008) e *B. cinerea* - *Chamelaucium* spp. (Dinh et al. 2011). Já a penetração por estômatos é a principal forma de penetração dos patógenos *C. tuberculata*, *C. oryzae*, *R. areola* e *C. coffeicola* em arroz, algodão e café, respectivamente (De Lana et al. 2002; Curvelo et al. 2010; Souza et al. 2011).

A penetração direta em hospedeiros suscetíveis é facilitada pela produção de enzimas degradadoras de parede celular, como por exemplo, as cutinases (Agrios 2005). Em um estudo realizado por Wang et al. (2006) observaram um comportamento diferencial do fungo *C. eragrostidis* quando inoculados na planta invasora *Digitaria sanguinalis*, hospedeira, e quando inoculado na gramínea *Festuca arundinacea*, não hospedeira. Na hospedeira, a penetração do patógeno na parede celular de células da epiderme foi facilitada pela degradação de ceras epicuticulares, porém na planta não hospedeira, a degradação dessas ceras foi ineficiente impedindo o sucesso da penetração. A secreção de enzimas esterases por conídios de *C. eragrostidis* cultivados em meio de cultura Czapek contendo ceras removidas de folhas de ambas as plantas, foi maior na presença de ceras da planta hospedeira.

Em relação à colonização, o menor desenvolvimento do fungo nos tecidos da variedade resistente corrobora com o trabalho realizado por Torres et al. (Dados não publicados), no qual observaram menor tamanho e número das lesões nessa variedade. Portanto, a resistência a *C. gladioli*, assim como observado para *E. turcicum* (Muiru et al. 2008), parece estar associada com a inibição do crescimento micelial do patógeno nos tecidos resistentes, e, consequentemente, resultando numa menor severidade da doença.

Os mecanismos de resistência à mancha de curvularia na variedade Verônica não parecem estar ligados aos eventos iniciais de infecção do patógeno, pois não foram observadas diferenças nas porcentagens de germinação e de formação de apressórios sob a superfície foliar dessa variedade e da variedade T-704, suscetível ao patógeno. Esses mecanismos, no entanto, parecem estar relacionados a fatores químicos que inibem o desenvolvimento do patógeno no interior dos tecidos resistentes.

Considerando a importância da mancha de curvularia em gladiolo e a carência de trabalhos na literatura envolvendo esse patossistema, os

resultados deste trabalho são de grande importância para o entendimento do processo infeccioso de *C. gladioli* em variedades de gladiolo resistentes e suscetíveis, colaborando assim, com o desenvolvimento de estratégias de controle da doença que sejam mais eficientes, sustentáveis e econômicas. Entretanto, novos estudos visando um maior conhecimento dos processos bioquímicos relacionados à resistência de gladiolo a *C. gladioli* serão de grande valia e deverão ser realizados no futuro.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos do primeiro autor; a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro; e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (CCB/UFV) pela utilização do MEV e equipamentos auxiliares.

Referências bibliográficas

Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press.

Araujo JCA, Matsuoka K (2004) Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiros resistente e suscetível. Fitopatologia Brasileira 29:268-275.

Armentrout VN, Downer AJ (1986) Infection cushion development by *Rhizoctonia solani* on cotton. Phytopathology 77: 619-623.

Babu AM, Philip T, Kariappa BK, Kamble CK (2009) Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora henningsii* on cassava leaves. Journal of Phytopathology 157: 57–62.

Bell AA (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. Annual Review of Plant Physiology 32: 21-81.

Braun EJ, Howard RJ (1994) Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. Protoplasma 181: 202–212.

Cruickshank RH, Wade GC (1992) Production of appressoria by *Monilinia fructicola*. Mycologia Research 96 (6): 425-428.

Curvelo CRS, Rodrigues FA, Berger PG, Rezende D (2010) Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. Tropical Plant Pathology 35(2): 108-113.

De Luna LZ, Watson AK, Paulitz TC (2002) Reaction of rice (*Oryza sativa*) cultivars to penetration and infection by *Curvularia tuberculata* and *C. oryzae*. Plant Disease 86:470-476.

Deising H, Nicholson RL, Haug M, Howard RJ, Mendgen K (1992) Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. Plant Cell 4: 1101–1111.

Dinh SQ, Joyce DC, Irving DE, Wearing AH (2011) Histology of waxflower (*Chamelaucium* spp.) flower infection by *Botrytis cinerea*. Plant Pathology 60: 278–287.

Emmett RW, Parbery DG (1975) Appressoria. Annual Review of Phytopathology 13: 147-167.

Fourie JF, Holz G (1995) Initial infection processes by *Botrytis cinerea* on nectarine and plum fruit and the development of decay. Phytopathology 85:82-87.

Jansson HB, Akesson H (2003) Extracellular matrix, esterase and the phytotoxin prehelminthosporol in infection of barley leaves by *Bipolaris sorokiniana*. European Journal of Plant Pathology 109(6): 599-605.

Koch E, Ebrahim-Nesbat F, Hoppe HH (1983) Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. Phytopathologische Zeitschrift 106: 302-320.

Muiru WM, Mutitu EW, Kimenju JW, Koopmann B, Tiedemann AV (2008) Infectious structures and response of maize plants to invasion by *Exserohilum turcicum* in compatible and incompatible host pathogen systems. Journal of Applied Biosciences 10(2): 532 - 537.

Myers DF, Fry WE (1978) The development of *Gloeocercospora sorghi* in sorghum. *Phytopathology* 68:1147-1155.

Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. CAB International Mycological Institute, Wallingford, UK.

Souza AGC, Rodrigues FA, Maffia LA, Mizubuti ESG (2011) Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. *Journal of Phytopathology* 159: 6-11.

Torres DP, Silva MA, Pinho DB, Pereira OL, Furtado GQ (2013) First report of *Curvularia gladioli* causing a leaf spot on *Gladiolus grandiflorus* in Brazil. *Plant Disease* (in press).

Tucker SL, Talbot NJ (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39(1): 385-417.

van den Berg N, Aveling TAS, Venter SL (2003) Infection studies of *Alternaria cassiae* on cowpea. *Australasian Plant Pathology* 32: 33-38.

Wang F, Zhang P, Qiang S, Xu L (2006) Interaction of plant epicuticular waxes and extracellular esterases of *Curvularia eragrostidis* during infection of *Digitaria sanguinalis* and *Festuca arundinacea* by the fungus. *International Journal of Molecular Sciences* 7: 346-357.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- A mancha foliar observada em *Gladiolus grandiflorus* é causada por *Curvularia gladioli*;
- Os materiais genéticos de gladiolo avaliados apresentam reação diferencial ao patógeno;
- A suscetibilidade dos genótipos de gladiolo à mancha de curvularia não se correlaciona com a porcentagem de germinação de conídios de *C. gladioli*, no entanto, correlaciona-se negativamente com a porcentagem de formação de apressórios;
- A resistência da variedade Verônica a *C. gladioli* não está relacionada aos eventos iniciais de infecção do patógeno;
- A colonização de *C. gladioli* em tecidos resistentes é menos eficiente que a colonização em tecidos suscetíveis, resultando num menor número e tamanho de lesões, e consequentemente, reduzindo a severidade da doença.