

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Influência da idade do fruto no período de incubação e na
expressão de diferentes tipos de sintomas da mancha preta dos
citros**

Guilherme Fernando Frare

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2015**

**Guilherme Fernando Frare
Biólogo**

**Influência da idade do fruto no período de incubação e na expressão de
diferentes tipos de sintomas da mancha preta dos citros**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **LILIAN AMORIM**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Frare, Guilherme Fernando

Influência da idade do fruto no período de incubação e na expressão de diferentes tipos de sintomas da mancha preta dos citros / Guilherme Fernando Frare. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

77 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Phyllosticta citricarpa* 2. *Citrus sinensis* 3. Pinta preta 4. Falsa melanose 5. Mancha dura I. Título

CDD 634.3
F839i

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

“Aos meus pais, Jorge Pedro Frare e Maria do Carmo Doswaldo Frare, pelo amor, apoio, incentivo e confiança”

OFEREÇO

“À minha irmã, Vanessa Cristina Frare, pela amizade, confiança e por me incentivar em todos os momentos”

“À Ângela Maria Pereira do Nascimento, pelo carinho, pelas ideias compartilhadas e pela compreensão nos momentos difíceis”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo;

À Profa. Dra. Lilian Amorim pela orientação, confiança e amizade;

Ao Prof. Dr. Marcel B. Spósito do Departamento de Produção Vegetal, pela amizade, confiança e pelo apoio em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Hilton Thadeu do Departamento de Ciências Florestais, pela ajuda nas análises estatísticas;

Ao pesquisador Renato B. Bassanezi do Fundecitrus, pela colaboração na instalação dos experimentos;

Ao pesquisador Rodrigo M. Facchini do Fundecitrus, pelo apoio nas análises químicas;

Ao pesquisador Geraldo J. Silva Jr do Fundecitrus, por toda a ajuda na instalação e condução dos experimentos;

Ao Prof. Dr. Moacir Forin do Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química da UFSCAR, pela ajuda nas análises químicas;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pelos valiosos ensinamentos, estimulando nosso amadurecimento pessoal e profissional;

À Dra. Maria Beatriz C. Rodrigues do Departamento de Genética da ESALQ por ceder o isolado de *Phyllosticta citricarpa*;

Ao doutorando Thiago Gentil do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ pela ajuda nas análises de sobrevivência;

Ao doutorando Bruno Perlatti do Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química da UFSCAR, pela ajuda nas análises químicas;

A todos os colegas da Pós Graduação da Fitopatologia;

Aos amigos Rodrigo; Rafael, Renan e André pela companhia divertida;

Aos amigos Vitão, Biro, Diogão, Marcinho e Haroldo pelos bons momentos de descontração;

Ao amigo Luiz H. Montesino pela amizade e ajuda nos experimentos;

Ao meu amigo “irmão” António Nogueira Júnior, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Gleison O. Santos e Willian A. Ferreira do Fundecitrus, por toda ajuda nos experimentos

Muito Obrigado.

"Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas"

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 DESENVOLVIMENTO	25
2.1 Mancha preta dos citros	25
2.1.1 Histórico e importância.....	25
2.1.2 Etiologia.....	26
2.1.3 Sintomatologia.....	27
2.1.4 Epidemiologia e ciclo da doença	28
2.1.5 Manejo da mancha preta dos citros	29
2.2 Compostos fenólicos e defesa da planta.....	30
2.3 Material e métodos.....	33
2.3.1 Obtenção e preparo da suspensão de <i>Phyllosticta citricarpa</i>	33
2.3.2 Inoculação de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em laranjas em diferentes estádios fenológicos	33
2.3.3 Inoculação múltipla de <i>Phyllosticta citricarpa</i> , no mesmo fruto, em diferentes estádios fenológicos	35
2.3.4 Determinação do índice de cor (IC) da casca dos frutos.....	35
2.3.5 Germinação de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> na superfície de frutos de laranja, em diferentes estádios fenológicos, observadas em microscopia eletrônica de varredura	36
2.3.6 Detecção de compostos fenólicos, presentes no flavedo de frutos de laranja doce, em diferentes estádios fenológicos.....	36
2.3.6.1 Inoculação dos frutos com <i>Phyllosticta citricarpa</i> e preparo das amostras.....	36
2.3.6.2 Extração dos compostos fenólicos presentes no flavedo dos frutos	37
2.3.6.3 Quantificação de compostos fenólicos por meio de HPLC-ESI-MS/MS.....	37
2.3.6.4 Parâmetros quantitativos.....	38
2.3.7 Análises estatísticas.....	39
2.4 Resultados	40

2.4.1 Inoculação de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em frutos de laranjas em diferentes estádios fenológicos.....	40
2.4.2 Inoculação múltipla de <i>Phyllosticta citricarpa</i> , no mesmo fruto, em diferentes estádios fenológicos	50
2.4.3 Germinação de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> na superfície de frutos de laranjas, em diferentes estádios fenológicos, observadas em microscopia eletrônica de varredura	53
2.4.4 Detecção de compostos fenólicos presentes no flavedo de frutos de laranja doce em diferentes estádios fenológicos.....	55
2.5 Discussão	58
3 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICES	73

RESUMO

Influência da idade do fruto no período de incubação e na expressão de diferentes tipos de sintomas da mancha preta dos citros

A mancha preta dos citros (MPC), causada por *Phyllosticta citricarpa*, é uma doença de importância econômica devido à redução na produtividade ocasionada pela queda prematura dos frutos e ao aumento dos custos da produção devido ao uso intensivo de fungicidas. As lesões restringem-se praticamente ao flavedo dos frutos, depreciando-os para a comercialização e restringindo a exportação de frutas *in natura*. A MPC causa danos em todas as espécies cítricas de valor comercial, com exceção da *Citrus aurantium* (laranja azeda) e do *Citrus latifolia* (lima ácida Tahiti). *Phyllosticta citricarpa* causa infecções latentes e diferentes tipos de sintomas nos frutos. Essas características podem estar relacionadas com o estágio fenológico do fruto no momento da infecção. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a influência da idade dos frutos de laranja doce na germinação dos conídios e no período de incubação de *P. citricarpa* e identificar compostos fenólicos pré ou pós-formados no flavedo de frutos de laranja doce inoculados com *P. citricarpa*. Frutos de laranjeira das variedades Hamlin, Valência e Pêra com 1,5, 3,0, 5,0 e 7,0 cm de diâmetros foram inoculados com suspensão de conídios de *P. citricarpa* na concentração de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹ e avaliados mensalmente. O primeiro sintoma observado foi o da falsa melanose e não foram observadas diferenças no período de incubação entre as variedades. O período de incubação da falsa melanose foi afetado pela concentração de inóculo e pelo diâmetro dos frutos. Frutos de 1,5 e 3,0 cm de diâmetro inoculados com suspensão de conídios de *P. citricarpa*, na concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹, apresentaram sintomas entre 70 e 116 dias respectivamente, enquanto que os frutos de 1,5, 3,0 e 5,0 cm de diâmetro, inoculados com suspensão de 10^5 conídios.mL⁻¹, expressaram sintomas entre 40, 65 e 156 dias respectivamente. A expressão dos sintomas de mancha dura não diferiu entre as concentrações de inóculo, mas diferiu entre os diâmetros e entre as variedades avaliadas. A variedade Valência apresentou os menores tempos para o aparecimento dos sintomas quando comparado com as variedades Hamlin e Pêra. Os tempos médios para a expressão da mancha dura nos frutos (todas as variedades) inoculados com 1,5, 3,0, 5,0 e 7,0 cm de diâmetro foram 240, 217, 176 e 197 dias respectivamente. Sintomas de falsa melanose e mancha dura se expressaram independente um do outro. Não foi observado diferenças nas quantidades dos compostos fenólicos entre os frutos inoculados e não inoculados após 48 h de câmara úmida. As maiores quantidades de compostos fenólicos foram encontradas nos frutos menores e à medida que estes aumentaram de tamanho, observou-se a diminuição nas quantidades destes compostos. Não foram observadas diferenças no padrão de germinação do fungo em relação aos diferentes diâmetros inoculados, porém foram observadas placas de cera na superfície dos frutos de 7,0 cm de diâmetro. Os sintomas de falsa melanose parecem estar relacionados com a defesa da planta, e os sintomas de mancha dura estão relacionados com o estágio fenológico dos frutos.

Palavras-chave: *Phyllosticta citricarpa*; *Citrus sinensis*; Pinta preta; Falsa melanose; Mancha dura; Fenóis

ABSTRACT

Influence of fruit age on the incubation period and in the expression of different types of symptoms of citrus black spot

Citrus black spot (CBS), caused by *Phyllosticta citricarpa*, is a disease of economic importance due to the reduction in yield, caused by premature fruit drop, and high production costs, due to the intensive fungicide spraying. The lesions are restricted to the fruit flavedo, decreasing market prices and restricting exports of fresh fruits. CBS causes damage in all commercial citrus species with exception of *Citrus aurantium* (sour orange) and *Citrus latifolia* (Tahiti acid lime). *Phyllosticta citricarpa* causes latent infections and different types of symptoms on fruit. These characteristics may be related to the phenological stage of the fruit at the time of infection. The objectives of this study were to evaluate the influence of fruit age of sweet orange on conidia germination and on the incubation period of *P. citricarpa* and identify phenolics pre or post-formed in the flavedo of sweet orange inoculated with *P. citricarpa*. Orange fruits of varieties Hamlin, Valencia and Pera with 1.5, 3.0, 5.0 and 7.0 cm of diameters were inoculated with a conidia suspension of *P. citricarpa* at the concentration of 10^3 and 10^5 conidia.mL⁻¹ and were evaluated monthly. The first symptom observed was false melanose and no differences were found in the incubation period among the varieties. The incubation period of false melanose was affected by the inoculum concentration and fruit diameters. Fruits with 1.5 and 3.0 cm of diameter inoculated with a conidia suspension of *P. citricarpa*, at a concentration of 10^3 conidia.mL⁻¹, showed symptoms between 70 and 116 days, respectively. On the other hand, fruits with 1.5, 3.0 and 5.0 cm in diameter, inoculated with suspension of 10^5 conidia.mL⁻¹, expressed symptoms between 40, 65 and 156 days, respectively. The period for symptom expression of hard spot did not differ between inoculum concentrations. The incubation period differed between the diameters and varieties evaluated. The Valencia variety presented symptoms in a shorter time than Hamlin and Pera. The average times for hard spot expression in fruits (all varieties together) inoculated with 1.5, 3.0, 5.0 and 7.0 cm of diameter were 240, 217, 176 and 197 days, respectively. Symptoms of false melanose and hard spot were expressed independently from each other. No differences were observed in the amounts of phenolic compounds between inoculated and non-inoculated fruits after 48 h of incubation in a humid chamber. The highest amounts of phenolic compounds were found in smaller fruits and, as fruits increased size, there was a decrease in the amounts of these compounds. No differences were found in the germination pattern of fungus on the inoculated fruits, but wax plates were observed on the surface of fruits with 7.0 cm in diameter. Symptoms of false melanose seem to be related to the plant defense mechanism, and symptoms of hard spot appeared to be related with phenological stages of the fruits.

Keywords: *Phyllosticta citricarpa*; *Citrus sinensis*; Black spot; False melanose; Hard spot; Phenols

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Inoculação de *Phyllosticta citricarpa* em frutos de laranja doce com 1,5 (A), 3,0 (B), 5,0 (C) e 7,0(D) centímetros de diâmetro 34
- Figura 2 - Delimitação do local da inoculação, após 48 horas de câmara úmida, em frutos de laranja doce com 1,5 (A), 3,0 (B), 5,0 (C) e 7,0 (D) centímetros de diâmetro..... 34
- Figura 3 - Inoculações múltiplas de suspensão de *Phyllosticta citricarpa* em diferentes diâmetros do mesmo fruto de laranja 'Pêra' 35
- Figura 4 - Sintomas de falsa melanose em frutos inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, quando estavam com 1,5 (A), 3,0 (B) e 5,0 (C) cm de diâmetro. 40
- Figura 5 - Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo de aparecimento de sintomas de falsa melanose, nas variedades Hamlin, Pêra e Valência. Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos e duas concentrações de inóculo..... 42
- Figura 6 - Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo de aparecimento de sintomas de falsa melanose nos diferentes diâmetros dos frutos, inoculados com suspensões nas concentrações de 10^3 (A) e 10^5 (B) conídios.mL. Dados representam a média do experimento das três variedades..... 44
- Figura 7 - Sintomas de mancha dura em frutos inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* com 1,5 (A), 3,0 (B), 5,0 (C) e 7,0 (D) cm de diâmetro, aos 270 dias após a inoculação 44
- Figura 8 - Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo de aparecimento dos sintomas de mancha dura nas variedades Hamlin, Valência e Pêra. Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos e duas concentrações de inóculo..... 46
- Figura 9 - Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo de aparecimento de sintomas de mancha dura nos diferentes diâmetros dos frutos. Dados representam a média do experimento das três variedades nas duas concentrações de inóculo 47

- Figura 10 - Índice de cor dos frutos e tempo médio para a expressão de sintoma de falsa melanose e mancha dura em frutos de 1,5, 3,0, 5,0 e 7,0 cm de diâmetro, inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹. Dados representam a média das três variedades utilizadas no experimento 49
- Figura 11 - Evolução dos sintomas de mancha preta dos citros em fruto de laranja 'Valência' inoculado com 1,5 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, aos 160 (A), 200 (B), 230 (C) e 260 (D) dias após a inoculação. Note que os sintomas de falsa melanose (FM) e mancha dura (MD) são distintos um do outro 49
- Figura 12 - Evolução dos sintomas de mancha preta dos citros em fruto de laranja 'Pêra' inoculado com 3,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, aos 120 (A), 150 (B), 180 (C) e 240 (D) dias após a inoculação. Note que os sintomas de falsa melanose (FM) e mancha dura (MD) são distintos um do outro..... 50
- Figura 13 - Evolução dos sintomas de mancha preta dos citros em fruto de laranja 'Hamlin' inoculado com 5,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, aos 110 (A), 140 (B), 170 (C) e 200 (D) dias após a inoculação 50
- Figura 14 - Evolução dos sintomas de mancha preta dos citros em fruto de laranja 'Hamlin' inoculado com 7,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, aos 150 (A), 180 (B), 210 (C) e 240 (D) dias após a inoculação..... 50
- Figura 15 - Sintomas típicos de mancha preta dos citros em frutos de 'Valência' inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* aos 3,0 (A), 4,0 (B) e 5,0 (C) cm de diâmetro, 210 dias após a inoculação..... 51
- Figura 16 - Tempo médio para o aparecimento de sintomas de falsa melanose nos frutos de laranja das variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculados aos 3,0, 4,0 e 5,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹ 51
- Figura 17 - Tempo médio para o aparecimento de sintomas de mancha dura nos frutos de laranja das variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculados aos 3,0, 4,0 e 5,0 cm de diâmetro com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹ 52

- Figura 18 - Sintomas atípicos de MPC observados em frutos inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹ aos 5,0 (A), 6,0 (B) e 7,0 (C) cm de diâmetro, 200 dias após a inoculação 52
- Figura 19 - Tempo médio para o aparecimento de sintomas atípicos de mancha preta dos citros, nas variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculados aos 5,0, 6,0 e 7,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹ 53
- Figura 20 - Eletromicrografias da germinação de conídios e formação de apressórios (setas) de *Phyllosticta citricarpa* na superfície de frutos de laranja 'Pêra' com 1,5 (A, B), 3,0 (C, D), 5,0 (E, F) e 7,0 (G, H) cm de diâmetro, após 48 h de câmara úmida 54
- Figura 21 – Concentração dos compostos fenólicos presentes no flavedo de laranja 'Pêra', nos diferentes diâmetros, inoculados e não inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, após 48 h de câmara úmida ... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição dos solventes ácido acético em água deionizada (solvente A) e ácido acético em acetonitrila (solvente B)	38
Tabela 2 - Porcentagem de frutos com sintomas de falsa melanose inoculados com 1,5, 3,0, 5,0 cm de diâmetros, com suspensão de <i>Phyllosticta citricarpa</i> nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL ⁻¹	41
Tabela 3 - Tempo médio (dias) para a expressão dos sintomas de falsa melanose, nos frutos, das variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculadas com <i>Phyllosticta citricarpa</i> . Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos e duas concentrações de inóculo.....	41
Tabela 4 - Tempo médio (dias) para a expressão de sintomas de falsa melanose em frutos inoculados com suspensão de <i>Phyllosticta citricarpa</i> nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL ⁻¹ . Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos e as duas concentrações de inóculo	42
Tabela 5 - Tempo médio (dias) para a expressão dos sintomas de falsa melanose, nos frutos de diferentes diâmetros, inoculados com suspensão de <i>Phyllosticta citricarpa</i> nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL ⁻¹ . Dados representam a média das três variedades utilizadas no experimento	43
Tabela 6 - Porcentagem de frutos de laranja doce com sintoma de mancha dura, inoculados em diferentes diâmetros, com suspensão de <i>Phyllosticta citricarpa</i> nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL ⁻¹	45
Tabela 7 - Tempo médio (dias) para a expressão dos sintomas de mancha dura em frutos inoculados com suspensão de <i>Phyllosticta citricarpa</i> nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL ⁻¹ . Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos e as duas concentrações de inóculo.....	45
Tabela 8- Tempo médio (dias) para a expressão dos sintomas de mancha dura, das variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculadas com <i>Phyllosticta citricarpa</i> . Dados representam a média do experimento,	

considerando todos os diâmetros dos frutos e as duas concentrações de inóculo	46
Tabela 9 – Tempo médio (dias) para a expressão de sintomas de mancha dura, nos diferentes diâmetros, inoculados com suspensão de <i>Phyllosticta citricarpa</i> nas concentrações de 10^3 conídios.mL ⁻¹ e 10^5 conídios.mL ⁻¹ . Dados representam a média das três variedades utilizadas no experimento	47
Tabela 10- Índice de cor dos frutos das três variedades nos diferentes diâmetros, no momento da inoculação e da expressão dos sintomas de falsa melanose e mancha dura	48
Tabela 11 - Porcentagem de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> germinados na superfície de frutos de laranja ‘Pêra’, nos diferentes diâmetros, após 48 h de câmara úmida	53
Tabela 12 - Concentração média dos compostos fenólicos no flavedo de frutos de laranja ‘Pêra’, inoculados e não inoculados com suspensão de <i>Phyllosticta citricarpa</i> na concentração de 10^5 conídios.mL ⁻¹ , nos diferentes diâmetros após 48 h de câmara úmida	56
Tabela 13 - Concentração de eriocitrin no flavedo de frutos de laranja ‘Pêra’, inoculados e não inoculados, com suspensão de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> na concentração de 10^5 conídios.mL ⁻¹ , após 48 h de câmara	57
Tabela 14 - Concentração de naringenina no flavedo de frutos de laranja ‘Pêra’, inoculados e não inoculados, com suspensão de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> na concentração de 10^5 conídios.mL ⁻¹ , após 48 h de câmara.....	57

1 INTRODUÇÃO

A mancha preta dos citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa, é uma doença de importância econômica, pois em pomares muito afetados provoca queda prematura dos frutos, aumento no custo da produção, além de ser considerada uma doença quarentenária A1 nos países da União Europeia.

A MPC afeta folhas, ramos e frutos, causando danos em todas as variedades de laranjas doces, limões e tangerinas, com exceção da lima ácida Tahiti e da laranja azeda. A doença vem causando grandes prejuízos à cultura em várias regiões produtoras do mundo, estando presente nos continentes da África, Ásia, Oceania e América (KOTZÉ, 2000; SCHUBERT et al., 2012).

O fungo apresenta as duas fases do ciclo reprodutivo e, tanto os ascósporos, fase sexual, como os conídios, fase assexual, têm um importante papel no estabelecimento da doença no campo (KOTZÉ, 1981; SPÓSITO et al., 2011). Após o contato dos esporos (ascósporos e conídios) com a superfície do fruto, em condições ambientais favoráveis, eles germinam e penetram ativamente a cutícula, permanecendo latentes até a maturação dos frutos (KOTZÉ, 1981). O prolongado período de incubação da MPC pode estar relacionado com a época em que os frutos foram infectados (KOTZÉ, 1981). Aguiar et al. (2012) demonstraram que o período de incubação da MPC, em frutos de laranja inoculados com suspensão de *P. citricarpa*, em diferentes estádios fenológicos, apresentou uma relação polinomial negativa, ou seja, frutos com diâmetros menores apresentaram período de incubação maior que os frutos com diâmetros maiores. A influência do estágio fenológico de frutos no período de incubação de doenças já foi relatada em outros patossistemas (DROBY et al., 1986; PODILA; ROGERS; KOLATTUKUDY, 1993) e pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos na epiderme dos frutos (VERHOFF, 1974). Compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos uma hidroxila ligada a um anel aromático. Nesse grupo estão os ácidos fenólicos, os flavonoides e as quinonas (MANACH et al., 2004; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2008). Frutos cítricos são ricos em compostos fenólicos, os quais estão envolvidos em diversas atividades biológicas, dentre elas a proteção contra ataques de patógenos (KOES; QUATTROCCHIO; MO, 1994). Ortuño et al. (2011) demonstraram que as variedades de citros que apresentavam maiores

quantidades dos flavonoides hesperedina, naringina e diosmina nos frutos, expressavam menor grau de suscetibilidade a *Penicillium digitatum* quando comparadas com variedades que apresentavam menores quantidades dos mesmos flavonoides.

Além do prolongado período de incubação, a MPC apresenta diferentes tipos de sintomas nos frutos. Sintomas de falsa melanose são observados apenas em frutos verdes e não apresentam picnídios, enquanto que sintomas de mancha dura e de mancha virulenta se expressam no período de maturação dos frutos e apresentam picnídios (KIELY, 1948; KOTZÉ, 2000). Marques et al. (2012) realizaram análises histológicas de frutos de laranja com sintomas de falsa melanose e mancha dura e detectaram características distintas entre os dois tipos de sintomas. Nos frutos com sintomas de falsa melanose, os autores observaram acúmulo de fenóis nas câmaras subestomáticas, limitada desintegração do epicarpo e ausência de picnídios, indicando uma reação de defesa do hospedeiro. Nos frutos com sintomas de mancha dura, foram observadas profundas alterações no epicarpo e mesocarpo, danos às glândulas de óleo, provocados pela colonização do patógeno, e presença de picnídios.

Assim, este trabalho teve como objetivos: (I) estudar a influência da idade dos frutos de laranja doce na germinação dos conídios de *P. citricarpa* e no período de incubação da falsa melanose e da mancha dura e (II) identificar compostos fenólicos pré ou pós-formados no flavedo de frutos de laranja doce inoculados com *P. citricarpa*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Mancha preta dos citros

2.1.1 Histórico e importância

A mancha preta dos citros (MPC), cujo agente causal é o fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der Aa (telemorfo: *Guignardia citricarpa* Kiely), é uma doença de importância econômica devido à redução na produtividade ocasionada pela queda prematura dos frutos e ao aumento dos custos da produção (KIELY, 1948; FEICHTENBERGER, 1996; GOES, 1998). A MPC causa danos em todas as espécies cítricas de valor comercial, com exceção da laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) (KOTZÉ, 1981) e da lima ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Osbeck) (FEICHTENBERGER, 1996). Uma característica da MPC é o longo período de tempo para o aparecimento dos sintomas (KOTZÉ, 1981; AGUIAR et al., 2012). As lesões restringem-se praticamente ao flavedo do fruto, provocando queda prematura, depreciando-os para a comercialização (McONIE, 1967; GOES, 1998) e restringindo a exportação de frutas *in natura* para países onde a MPC é considerada doença quarentenária (SPÓSITO, 2006).

O patógeno foi primeiramente descrito na Austrália, em 1895, causando perdas significativas na produção de frutos de laranja 'Valência' (KIELY, 1948). Posteriormente perdas expressivas devido à doença foram relatadas em pomares na África do Sul, em 1929 (DOIDGE, 1929). Atualmente, a MPC encontra-se disseminada em vários países como Quênia, Moçambique, Nigéria, África do Sul, Zâmbia, Suazilândia, Zimbábue, Butão, China, Taiwan, Indonésia, Filipinas, Argentina, Uruguai, Brasil, Peru, Venezuela (KOTZÉ, 2000; CABI, 2015) e Estados Unidos (SCHUBERT et al., 2012).

No Brasil, a MPC foi relatada pela primeira vez em 1980 no Rio de Janeiro, nos municípios de São Gonçalo e Itaboraí, afetando tangerinas 'Rio' (ROBBS; PIMENTEL; RIBEIRO, 1980). Posteriormente, a doença se disseminou para outros estados, sendo detectada em pomares do Rio Grande do Sul em 1986, no Estado de São Paulo em 1993, no Estado de Minas Gerais em 2001 (GÓES; FEICHTENBERGER, 1993; BALDASSARI; REIS; GÓES, 2004) e no sul do Espírito Santo em 2002 (COSTA et al., 2003). Na Região Norte, está presente em Rondônia

e no Amazonas (GASPAROTTO et al., 2004; EMBRAPA, 2012) e na Região Nordeste a doença foi detectada na Bahia em 2012 (SILVA et al., 2012).

2.1.2 Etiologia

O patógeno causador de MPC apresenta tanto a fase anamórfica ou assexuada como a fase teleomórfica ou sexuada. Na fase assexuada, picnídios de *P. citricarpa* são formados nas lesões dos frutos, folhas e pedúnculo (FEICHTENBERGER et al., 2005). Os picnídios são globosos, de coloração marrom escura a preta, com 115 - 190 µm de diâmetro. Os conídios, medindo de 8 a 10,5 x 5,5 a 7 µm, são unicelulares, hialinos, de formato obovóide a elíptico, asseptados, multigutulados e com um apêndice hialino em uma das extremidades (KOTZÉ, 2000; FEICHTENBERGER et al., 2005).

Na fase sexuada, os pseudotécios são produzidos somente em folhas em decomposição (KOTZÉ, 2000, FEICHTENBERGER et al., 2005). O pseudotécio é globoso, de coloração marrom escura, unilocular com um ostíolo central. Em seu interior são formados ascos bitunicados, de formato cilíndrico-clavado, medindo de 12 a 15 µm x 40 a 65 µm. No interior dos ascos são formados oito ascósporos medindo de 4 a 6,5 µm x 12,5 a 16 µm (KOTZÉ, 2000), unicelulares, hialinos, cilíndricos com o centro dilatado e apresentando apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Por muito tempo *P. citricarpa* foi detectado em vários países onde a MPC nunca tinha sido relatada anteriormente, em folhas de plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas e em frutas como abacate, manga e banana. McOnie (1964) descreveu duas estirpes similares morfológicamente, porém fisiológica e patogenicamente diferentes de *G. citricarpa* infectando citros. A estirpe causadora de sintomas típicos de MPC era específica de citros e com crescimento lento em meio de cultura. A outra estirpe não era específica de citros, não causava sintomas típicos de MPC em frutos de laranja, era isolada de outros hospedeiros e crescia duas vezes mais rapidamente em meio de cultivo. Posteriormente, com o avanço das técnicas moleculares, a estirpe não patogênica foi identificada como *Guignardia mangiferae*, um fungo endofítico e com ampla gama de hospedeiro (BAAYEN et al., 2002; GLIENKE-BLANCO, 2002).

2.1.3 Sintomatologia

Quatro sintomas diferentes da MPC são relatados no mundo (KOTZÉ, 2000): (I) Mancha dura é o sintoma mais comum e típico da doença e em geral aparece quando os frutos iniciam a maturação. Em frutos verdes um halo amarelado aparece circundando as lesões, enquanto que no caso de frutos maduros um halo verde aparece ao redor das lesões, que apresentam o centro deprimido com bordas salientes. No interior dessas lesões aparecem pequenas pontuações negras, que são os picnídios do fungo. (II) Mancha sardenta caracteriza-se por apresentar pequenas lesões deprimidas e avermelhadas, que podem conter picnídios. Esse tipo de sintoma é mais frequente em frutos maduros e em pós-colheita. (III) Mancha virulenta caracteriza-se pela coalescência das lesões dos diferentes tipos de sintomas, atingindo grandes áreas da superfície dos frutos. Tais lesões são mais frequentes nas áreas dos frutos mais expostas ao sol. (IV) Mancha de falsa melanose se expressa enquanto os frutos ainda apresentam-se verdes, e não apresentam corpos de frutificação, caracteriza-se por apresentar lesões escuras e pequenas, com cerca de 2 mm de diâmetro, circundadas por numerosos pontos escuros semelhantes às de melanose, doença fúngica causada por *Diaporthe citri*. Além dos sintomas descritos anteriormente, no Brasil ainda foram descritos os sintomas de mancha trincada e de mancha rendilhada. A mancha trincada está associada aos danos causados pelo ácaro da falsa ferrugem *Phyllocoptruta oleivora* (GÓES et al., 2000); as lesões são irregulares, superficiais, de tamanho variado, ocorrendo em frutos ainda verdes. Com a maturação dos frutos as lesões apresentam trincas em sua superfície, não apresentando corpos de frutificação. A mancha rendilhada apresenta lesões superficiais que atingem grandes áreas dos frutos, quando estes ainda apresentam-se verdes, e não apresentam corpos de frutificação. Sintomas em folhas e ramos são menos frequentes (FEICHTENBERGER et al., 2005).

A expressão dos sintomas pode ser influenciada pela radiação solar combinada com altas temperaturas, pelo estresse hídrico, pela idade do fruto e pela condição nutricional da planta (KOTZÉ, 1981). Os sintomas são restritos ao flavedo dos frutos (MCONIE, 1967) e não interferem na qualidade interna dos mesmos (FAGAN; GÓES, 2000). Na África do Sul, o período crítico de suscetibilidade dos

frutos varia de quatro a cinco meses (KOTZÉ, 1981), enquanto que no Brasil os frutos são suscetíveis durante todo o período de crescimento (AGUIAR et al. 2012).

A causa da diversidade de sintomas nos frutos não é bem compreendida. Marques et al. (2012) relataram que os sintomas de falsa melanose e de mancha dura estão relacionados a alterações celulares e histológicas distintas nos frutos, indicando que esses sintomas são independentes. Para Kotzé (1981), o sintoma de falsa melanose é a expressão precoce da doença no fruto. Almeida (2009) relatou que os tipos de sintomas estão relacionados com a concentração de esporos depositados no fruto. Frutos de laranja inoculados com suspensão de *P. citricarpa* na concentração de 10^4 conídios.mL⁻¹ expressaram sintomas de mancha dura, enquanto que frutos inoculados com suspensão de *P. citricarpa* na concentração de 10^8 conídios.mL⁻¹ expressaram sintomas de falsa melanose.

2.1.4 Epidemiologia e ciclo da doença

O fungo apresenta as duas fases do ciclo reprodutivo e, tanto os ascósporos como os picnidiósporos, têm um importante papel no estabelecimento da doença (KOTZÉ, 1981; SPÓSITO et al., 2011). Na África do Sul e na Austrália a fase sexuada é a de maior importância epidemiológica, sendo os ascósporos a principal fonte de inóculo, já que não há sobreposição de frutos devido ao período de floração ser bem definido (KIELY, 1948; KOTZÉ, 1981). No Brasil, a fase assexual é a mais importante epidemiologicamente, uma vez que os picnidiósporos são a principal fonte de inóculo para o aumento da incidência de frutos doentes no campo, pois, devido à floração desuniforme, há sobreposição de frutos de diferentes estádios fenológicos (SPÓSITO et al., 2008, 2011).

Os pseudotécios são produzidos em folhas em decomposição e o desenvolvimento dos ascósporos é favorecido pela alternância entre os períodos secos e úmidos (KOTZÉ, 1981). Na África do Sul, o tempo de desenvolvimento dos ascósporos de *G. citricarpa* varia de 40 a 180 dias após a queda das folhas (KOTZÉ, 2000), enquanto que em Gana os ascósporos se desenvolvem entre 30 e 50 dias (BRENTU et al., 2012). Quando há umidade disponível e os pseudotécios estão maduros, ocorre a liberação ativa dos ascósporos, que são disseminados pelas correntes de ar. Quando os ascósporos entram em contato com o fruto, em condições ambientais favoráveis, eles germinam, produzem um tubo germinativo e

um apressório e a partir do *peg* de penetração invadem ativamente a cutícula, permanecendo latentes até a maturação dos frutos (McONIE, 1967).

Os conídios de *P. citricarpa* formados nas lesões dos frutos não apresentam mecanismos de liberação ativa como os ascósporos. Os conídios são disseminados por respingos de água das chuvas que, ao entrarem em contato com a lesão, os carregam para os frutos mais próximos (KOTZÉ, 1981). Após o contato dos conídios com o tecido suscetível do fruto e, em condições ambientais favoráveis, estes germinam, produzem um tubo germinativo e um apressório, pelo qual penetram ativamente a cutícula e permanecem latentes até a maturação dos frutos (KOTZÉ, 1981).

2.1.5 Manejo da mancha preta dos citros

De acordo com Reis, Forcelini e Reis (2007) o controle mais eficiente de doenças de plantas nunca é resultante de uma prática isolada, mas sim do somatório de medidas de controle disponíveis. Através do manejo cultural e do controle químico, várias práticas podem ser adotadas visando o controle de *P. citricarpa*, porém nem sempre os resultados atingem os níveis desejados, principalmente quando o destino da fruta colhida é o comércio *in natura* (SILVA-PINHATI et al., 2009).

Algumas técnicas de manejo podem minimizar os prejuízos causados por *P. citricarpa*. Dentre elas estão a retirada de restos de material vegetal de veículos, máquinas e outros equipamentos antes de entrarem na propriedade (FUNDECITRUS, 2005; SILVA-PINHATI et al., 2009), principalmente as folhas, que podem servir como fonte de inóculo para o ciclo primário da doença (FUNDECITRUS, 2005); a poda de ramos secos, visando a eliminação de fonte de inóculo; a adequação do sistema de irrigação, geralmente por gotejo, evitando o molhamento da copa das árvores; o controle do mato, geralmente com o uso de roçadeira ecológica, que joga o mato roçado sobre as folhas de citros caídas sob as copas das árvores, fonte de ascósporos e a antecipação da colheita, com o objetivo de se reduzir a queda precoce dos frutos e evitar a contaminação de frutos pequenos que estão em formação, especialmente nas variedades tardias (SPÓSITO, 2006; SILVA-PINHATI et al., 2009). Para prevenir a introdução de mancha preta em novas áreas é recomendado o uso de mudas saudáveis, adquiridas

de viveiros certificados, pois em folhas de laranjeiras-doces não são observados sintomas da mancha preta, o que impossibilita o produtor identificar se a muda tem ou não a doença (FUNDECITRUS, 2005). Além das medidas descritas acima, o controle químico faz-se imprescindível (SILVA-PINHATI et al., 2009). As aplicações podem variar de duas a seis vezes por ano, iniciando após a queda das pétalas e terminando no final do período chuvoso (abril/maio). Geralmente as duas primeiras aplicações são realizadas com fungicidas cúpricos, visando também o controle de verrugose (*Elsinoe falcettii*) e melanose (*Diaporthe citri*) (FUNDECITRUS, 2015).

2.2 Compostos fenólicos e defesa da planta

As plantas são constantemente atacadas por microrganismos. Para se defender destes ataques, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos. Esses mecanismos podem ser pré ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2008). Os mecanismos de defesa estruturais constituem-se de barreiras físicas, que agem no intuito de impedir a entrada do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos constituem-se de substâncias tóxicas capazes de inibir o desenvolvimento do mesmo no interior da planta (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2008; PASCHOLATI, 2011).

No mecanismo de defesa bioquímico pré-formado as substâncias já estão presentes nas plantas, antes do contato desta com o patógeno. Dentre estas substâncias estão os compostos fenólicos, que representam um extenso grupo de substâncias que possuem pelo menos uma hidroxila ligada a um anel aromático. Nesse grupo estão os ácidos fenólicos, os flavonoides (flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas e as antocianidinas) e as quinonas (MANACH et al., 2004; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2008). Estes compostos são produzidos via metabolismo secundário das plantas e são encontrados em frutos, sementes, caules, folhas e flores e estão envolvidos em diversas atividades biológicas, como a proteção contra radiação ultravioleta (KOES; QUATTROCCHIO; MO, 1994; SHIRLEY, 1996) e o ataque de microrganismos (DE LANGE et al., 1976; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; ORTUÑO et al., 2011). Os primeiros compostos fenólicos isolados e correlacionados com resistência contra patógenos foram o ácido protocatecólico e o catecol (LINK; ANGELL; WALKER, 1929; LINK;

WALKER, 1933). Walker (1925) observou que, em campos de cebola infestados por *Colletotrichum circinans*, as variedades de cebola que tinham a casca amarela ou vermelha eram resistentes ao patógeno, enquanto que a variedade com casca branca era suscetível. Esse autor ainda observou que quando as cascas secas das variedades coloridas eram retiradas, os bulbos se tornavam igualmente suscetíveis à infecção pelo fungo. Mais tarde Link, Angell e Walker (1929) e Link e Walker (1933) isolaram o ácido protocatecólico e o catecol das cascas secas das variedades de cebola coloridas e atribuíram a esses compostos a resistência contra o patógeno.

As concentrações dos compostos fenólicos variam dependendo da localização e do estágio fenológico da planta (NDUBIZU, 1976; CASTILLO; BENAVALTE; DEL RIO, 1992; DING et al., 2001). A concentração desses compostos na superfície dos frutos também influencia a duração do período latente de alguns patógenos em determinados hospedeiros (CHAKRAVARTY, 1957; VERHOFF, 1974; DROBY et al., 1986). Ndubizu (1976) relatou a diminuição na concentração de ácidos fenólicos em maçãs à medida que estas amadureciam, e observou que o período de maior suscetibilidade dos frutos à podridão causada por *Botrytis cinerea* coincidia com o período em que os frutos apresentavam menores concentrações de fenóis. Em um trabalho mais detalhado, Droby et al. (1986) isolaram o composto resorcinol da casca de frutos verdes e maduros de manga e obtiveram que a concentração desse composto na casca de frutos verdes foi de 200 µg/g de tecido e, em frutos maduros, diminuiu para 100 µg/g de tecido fresco. Eles ainda observaram que a concentração efetiva desse composto para inibição do fungo *Alternaria alternata* foi de 120 µg/mL. Os autores concluíram que a latência do fungo está diretamente relacionada com a diminuição da concentração desse composto na casca.

Em citros, os principais compostos fenólicos encontrados são os flavonóides, as antocianinas e as cumarinas (HOROWITZ, 1961; ZHENG et al., 2009; HE et al., 2011). O grau de suscetibilidade das variedades de citros para um determinado patógeno pode estar relacionado com as diferentes concentrações dos flavonóides presentes nessas variedades (KIM et al., 2011; ORTUÑO et al., 2011; LIU et al., 2013). Ortuño et al. (2011) observaram que as variedades de frutas cítricas que apresentavam altas concentrações de hesperedina, naringina e diosmina eram mais resistentes à infecção por *Penicillium digitatum* que as variedades que apresentavam baixas concentrações desses mesmos compostos.

Já foram identificados flavonoides e cumarinas atuando na defesa de várias espécies cítricas contra *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora parasitica*, *P. digitatum*, *Geotrichum* sp., *Guignardia citricarpa*, *Diaporthe citri* e *Xylella fastidiosa* (DE LANGE et al., 1976; DEL RIO et al., 1998; ORTUÑO et al., 1997, 2011; RIBEIRO et al., 2008).

Na interação citros-*P. citricarpa*, De Lange et al. (1976) detectaram o acúmulo da fitoalexina escoparona em frutos de laranja doce com sintomas de MPC, demonstrando que a infecção do fruto por *P. citricarpa* induz a uma reação da planta. Resultados semelhantes foram obtidos por Cardoso Filho (2003), que detectou um aumento de quatro vezes na concentração de compostos fenólicos em flavedos de frutos com mancha dura em relação a flavedos sadios. O autor ainda detectou concentrações de compostos fenólicos 20 vezes maiores no albedo dos frutos de laranja quando comparado com o flavedo. Esse resultado pode explicar porque as lesões de MPC não afetam o albedo dos frutos. Marques et al. (2012) detectaram, em cortes transversais das lesões de falsa melanose, um acúmulo de fenóis nas câmaras subestomáticas dos frutos e Brigati (2009) detectou acúmulo de fenóis na epiderme de frutos verdes 72 h após a inoculação de *P. citricarpa*.

No mecanismo de defesa bioquímico pós-formado, as substâncias encontram-se ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo ativadas em resposta à presença do patógeno ou produzidas a partir de um precursor remoto (PASCHOLATI, 2011). Nesta categoria encontram-se as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese e espécies reativas de oxigênio. As fitoalexinas são compostos de baixo peso molecular, sintetizados em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Apresentam grande diversidade de estruturas e são classificadas em diferentes classes de compostos químicos como cumarinas, diterpenos e flavonóides (SMITH, 1996). A indução para produção de fitoalexinas pode ocorrer em resposta à penetração fúngica e pelo tratamento com elicitores bióticos e abióticos (STANGARLIN et al., 2011). Afek e Szejnberg (1988) compararam o acúmulo da fitoalexina escoparona entre espécies de citros resistentes e suscetíveis a infecção por *P. citrophthora*. Quatro dias após a inoculação, plantas resistentes acumularam 100 vezes mais escoparona do que as plantas suscetíveis.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Obtenção e preparo da suspensão de *Phyllosticta citricarpa*

O isolado de *P. citricarpa* utilizado nos experimentos foi obtido de frutos de laranja 'Valência' com sintomas típicos de MPC e, após caracterização molecular com os primers específicos GCP1 5'-AAGTGTGAGTGTCTCGAAGGTGG-3' e GcP2 5'-GACGACTCGTTTTTCTACGGC-3', o isolado foi repicado para meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Para o preparo da suspensão de conídios o isolado foi cultivado, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, a 28°C por 20 dias, sob luz contínua. Após esse período, 5mL de água destilada esterilizada foi adicionada em cada placa e, com o auxílio da alça de Drigalsky, raspou-se a superfície da cultura para a remoção dos conídios. Após filtragem em gaze, a suspensão obtida teve sua concentração calibrada para duas concentrações: 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹. Cinco placas de Petri contendo a colônia fúngica foram utilizadas, em média, para o preparo do inóculo.

2.3.2 Inoculação de *Phyllosticta citricarpa* em laranjas em diferentes estádios fenológicos

O experimento foi realizado no Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), em Araraquara - SP. Foram utilizados frutos de laranjeiras enxertadas sobre limoeiro Cravo, com sete anos de idade, mantidas em caixas d'água de 100 L contendo solo de campo, dentro de casa de vegetação.

O experimento foi composto por três variedades de laranja doce (Hamlin, Valência e Pêra), quatro diâmetros de frutos (1,5, 3,0, 5,0 e 7,0 cm) e duas concentrações de inóculo (10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹). Para cada combinação de variedade e concentração de inóculo, foram inoculados 15 frutos com 1,5 cm de diâmetro e 10 frutos para os diâmetros de 3,0, 5,0 e 7,0 cm. Cada combinação foi repetida duas vezes.

Em 15 plantas de cada variedade de laranja foram marcados 150 frutos com 1,0 cm de diâmetro. À medida que os frutos de cada variedade se desenvolviam e atingiam os diâmetros de 1,5, 3,0, 5,0 e 7,0 cm, eram marcados, avaliados quanto à coloração da casca e, em seguida, inoculados com suspensão de *P. citricarpa*.

Para a inoculação dos frutos foi utilizada espuma adesiva para vedação, com 2,5 cm de comprimento x 2,5 cm de largura x 1,5 cm de espessura. As espumas utilizadas para a inoculação dos frutos foram furadas com o auxílio de vazadores de aço, com 0,5 cm de diâmetro para frutos de 1,5 cm e vazadores com 1,0 cm de diâmetro para os demais tamanhos de frutos. A impermeabilização do interior do orifício da espuma foi feita com esmalte incolor. Antes da fixação da espuma adesiva, a superfície dos frutos foi limpa com água corrente e esponja. Após a fixação das espumas nos frutos, adicionou-se 300 μ L da suspensão de inóculo no interior da espuma, para os frutos de 1,5 cm de diâmetro e 500 μ L nos demais diâmetros. Após a inoculação, a superfície da espuma foi tampada com fita adesiva por 48 horas para evitar a evaporação da suspensão (Figura 1).

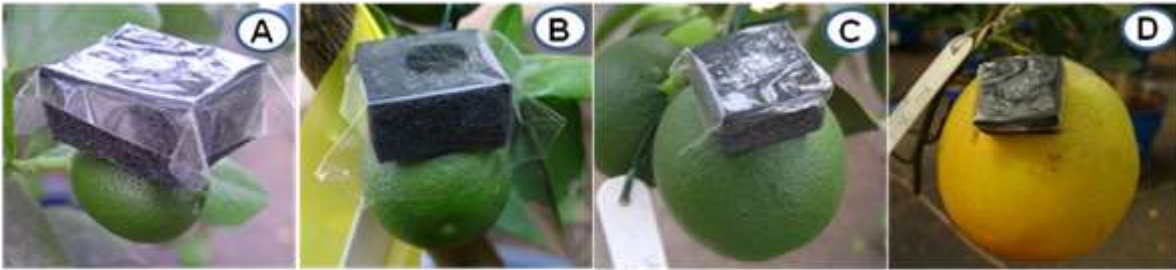


Figura 1- Inoculação de *Phyllosticta citricarpa* em frutos de laranja doce com 1,5 (A), 3,0 (B), 5,0 (C) e 7,0 (D) centímetros de diâmetro

Como testemunha cinco frutos de todas as variedades receberam as mesmas quantidades de água destilada. Após 48h as espumas foram retiradas e o local da inoculação foi delimitado com caneta permanente (Figura 2). As avaliações foram realizadas mensalmente e o período de incubação foi determinado a partir do primeiro sintoma observado.

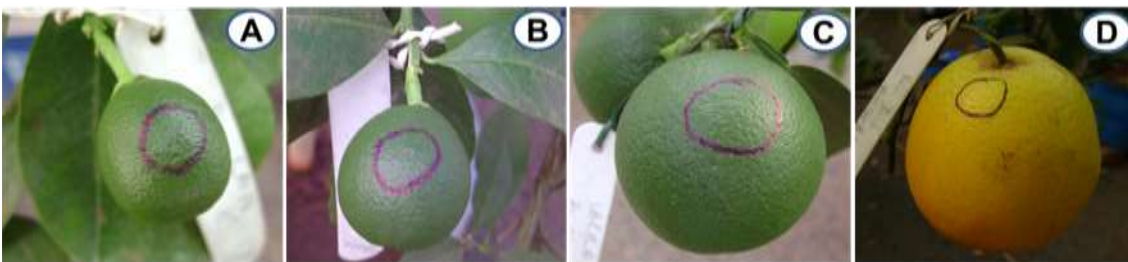


Figura 2 - Delimitação do local da inoculação, após 48 horas de câmara úmida, em frutos de laranja doce com 1,5 (A), 3,0 (B), 5,0 (C) e 7,0 (D) centímetros de diâmetro

2.3.3 Inoculação múltipla de *Phyllosticta citricarpa*, no mesmo fruto, em diferentes diâmetros

As inoculações foram realizadas em frutos de plantas de laranja doce das variedades Hamlin, Valência e Pêra enxertadas sobre citrumelo Swingle, com nove anos de idade, mantidas em caixas d'água de 100 L contendo solo de campo, dentro de casa de vegetação. Quinze frutos de cada variedade, com diâmetros de 3,0 cm, foram marcados e inoculados como descrito no item 2.3.2, com suspensão de conídios de *P. citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹. A partir da primeira inoculação os frutos foram acompanhados semanalmente e, conforme atingiam os diâmetros de 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 cm, eram inoculados com suspensões de *P. citricarpa* (Figura 3). Como testemunha, cinco frutos receberam água destilada. O experimento foi repetido duas vezes. As avaliações foram realizadas mensalmente e o período de incubação foi determinado a partir do primeiro sintoma observado.

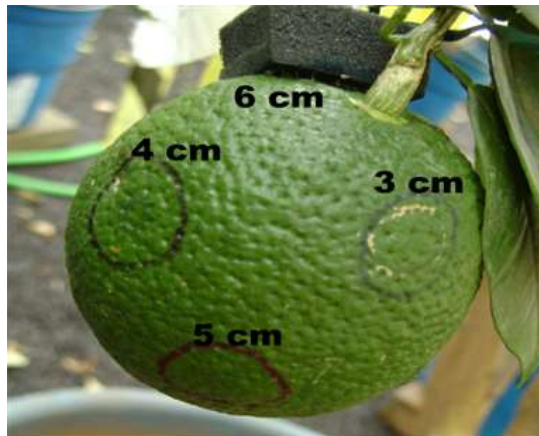


Figura 3 - Inoculações múltiplas de suspensão de *Phyllosticta citricarpa* em diferentes diâmetros do mesmo fruto de laranja Pêra

2.3.4 Determinação do índice de cor (IC) da casca dos frutos

A determinação do IC da casca dos frutos foi realizada com a utilização de colorímetro portátil (Konica Minolta CR-400). A leitura da cor da casca resultou em três parâmetros (a , b , L), sendo a a variação entre a cor verde e a vermelha; b , a variação entre a cor azul e a amarela, e L , a luminosidade. O índice de cor foi calculado pela fórmula: $IC = 1000 \times a / (L \times b)$.

2.3.5 Germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* na superfície de frutos de laranja, em diferentes estádios fenológicos, observadas em microscopia eletrônica de varredura

Frutos da variedade Pêra com 1,5, 3,0, 5,0 e 7,0 cm de diâmetro foram inoculados com suspensão de *P. citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, utilizando a mesma metodologia descrita no item 2.3.2. Após 48h de câmara úmida, o local onde ocorreu a inoculação foi seccionado com o auxílio de um bisturi e a amostra foi fixada em solução de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído, 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M com pH 7,2 e CaCl₂ 0,001M). Em seguida as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de acetona (30, 50, 70, e 100%) por 10 min cada e, após a concentração de 100%, procedeu-se à secagem das amostras utilizando o aparelho de ponto crítico de CO₂ (Balzers CP040). Após a secagem, as amostras foram coladas em suportes de alumínio (STUBs), com auxílio de fita de carbono dupla face e metalizadas com ouro em metalizador Balzers MED 010 (BalzersUnions, Lichtenstein), a 50 mA por 3 min. As amostras foram então analisadas no microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP) do Núcleo de Apoio à Pesquisa de Microscopia Eletrônica (NAP/MEP) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

2.3.6 Detecção de compostos fenólicos, presentes no flavedo de frutos de laranja doce, em diferentes estádios fenológicos

2.3.6.1 Inoculação dos frutos com *Phyllosticta citricarpa* e preparo das amostras

Para esse experimento foram utilizados frutos de laranjeiras da variedade 'Pêra' com três anos de idade, mantidas em vasos de 20L contendo substrato comercial, em casa de vegetação.

Frutos com 1,5, 3,0, 5,0 e 7,0 cm de diâmetro foram inoculados com suspensão de *P. citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, como descrito no item 2.3.2. Para cada diâmetro foram realizadas três repetições, sendo que cada repetição foi composta por 10 frutos com 1,5 cm de diâmetro e cinco frutos para os demais diâmetros. Nas testemunhas aplicou-se água destilada. Após 48h de câmara úmida, as amostras foram extraídas com auxílio de vazadores de aço, sendo

utilizado um vazador de 0,5 cm de diâmetro para frutos de 1,5 cm de diâmetro e vazadores de 1,0 cm para os demais diâmetros. As amostras foram retiradas da área inoculada, extraíndo-se apenas o flavedo dos frutos, em seguida foram acondicionadas em nitrogênio líquido para cessar as reações metabólicas e, após esse procedimento, foram secas em estufa a 40°C por duas semanas, trituradas em almofariz e armazenadas em tubos tipo Eppendorf® em freezer a -20°C até a realização das análises.

2.3.6.2 Extração dos compostos fenólicos presentes no flavedo dos frutos

A extração dos compostos fenólicos foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

Pesou-se 0,1 g do flavedo triturado em tubo falcon de 15 mL e adicionou-se 1mL de metanol 100%. Em seguida os tubos foram imersos em um banho de ultrassom, para otimizar a extração dos compostos e após 30 minutos foram centrifugados por 15 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C e o sobrenadante recuperado em novo tubo. O resíduo sólido foi submetido novamente a outra extração, acrescentando-se mais 0,5 mL de metanol 100%, banho de ultrassom por 15 minutos e centrifugação por 15 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante da segunda extração foi recuperado e misturado com o da primeira extração.

2.3.6.3 Quantificação de compostos fenólicos por meio de HPLC-ESI-MS/MS

Os padrões dos flavonoides daidzina, daidzeina, diosmina, eriocitrina, hesperedina, isoquercitrina, miricetina, naringina, naringenina, nobiletina, quercetina, tangeretina e rutina; das cumarinas aurapteno, citropteno, escoparona, ostole e umbeliforona; das furanocumarinas bergapteno, bergamotina e psoraleno e das chalconas hesperedina metil-chalcona e naringina di-hidrochalcona foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A análise de HPLC foi conduzida em um HPLC Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), com uma coluna de C₁₈ (150 mm x 2,1 mm). A fase móvel consistiu em 0,5% de ácido acético em água deionizada (solvente A) e

0,5% de ácido acético em acetonitrila (solvente B). As análises foram realizadas no modo gradiente de eluição como descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Gradiente de eluição dos solventes ácido acético em água deionizada (solvente A) e ácido acético em acetonitrila (solvente B)

Tempo (min)	Solvente A (água)	Solvente B (acetonitrila)
0	80	20
12	60	40
15	20	80
30	0	100
35	0	100

A taxa de vazão da fase móvel foi de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. Foram injetados 5 μL das amostras e a temperatura usada na coluna foi de 35°C. Após a separação cromatográfica, 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ foram direcionados para um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray APITM 2000 (AB/MDS Sciex, MA, USA)

Os parâmetros do espectrômetro de massa foram otimizados através da inserção direta de cada analito, separadamente, numa concentração de 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e fluxo de 10 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, de onde foram obtidos os parâmetros otimizados (APÊNDICE A).

2.3.6.4 Parâmetros quantitativos

Foram preparados seis frascos de solução estoque com metanol grau MS: o primeiro frasco com os padrões escoparona, psoraleno, bergapteno, citropteno e umbeliforona na concentração de 1 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ (5 mL), o segundo com hesperedina metil-chalcona, hesperedina, naringina, narigenina e naringinadi-hidrochalcona na concentração de 1 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ (5 mL), o terceiro com quercetina, rutina tri-hidratada, isoquercitrina e miricetina na concentração de 2 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ (2 mL), o quarto com eriocitrina, ostole, daidzina e daidzeina na concentração de 1 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ (2 mL), o quinto com nobiletina, bergamotina, tangeretina e aurapteno na concentração de 1

mg.mL⁻¹ (2 mL), e o sexto frasco com diosmina na concentração de 2 mg.mL⁻¹ (2 mL). As soluções estoque foram misturadas e diluídas em um balão volumétrico para formar a solução de trabalho na concentração de 100 µg.mL⁻¹. As soluções para a construção da curva de calibração foram preparadas pela diluição da solução de trabalho em 0,5; 1,0; 5,0; 10; 20; 30; 40 e 50 µg.mL⁻¹ em metanol 100%. Todas as soluções foram preparadas em triplicatas. O limite de quantificação (LOQ) foi escolhido como a menor concentração da solução padrão com um desvio-padrão relativo (DPR) inferior a 2%. O limite de detecção foi definido como a concentração igual ou menor que 50% do LOQ.

2.3.7 Análises estatísticas

Como as avaliações foram realizadas mensalmente, não foi possível obter o tempo exato até o aparecimento dos sintomas de falsa melanose e da mancha dura. Para determinar o período de incubação da falsa melanose e da mancha dura foi utilizada a análise de sobrevivência. Para verificar se o diâmetro do fruto, a concentração de inóculo e a variedade de laranja influenciam no período de incubação da MPC, foram obtidas as estimativas de Kaplan-Meier para cada uma das combinações diâmetro, concentração e variedade. A comparação dos períodos de incubação da doença em cada combinação foi testada pelo Teste de Log-rank ao nível de 5% de significância. As análises foram realizadas no software R utilizando o pacote Interval.

Para a proporção de frutos com sintomas de falsa melanose e mancha dura, foi realizada análise da deviance ajustando um modelo linear generalizado (MLG) com distribuição binomial e função de ligação “logit”. Em caso de diferenças significativas, contrastes de Tukey foram realizados para as médias das variáveis. O software estatístico R foi utilizado para esta análise. O índice de cor dos frutos foi analisado pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para a aquisição e a análise dos dados do espectrômetro de massa foi utilizado o software Analyst v.1.5.2 (AB/MDS Sciex, MA, USA). As interações entre os compostos nos frutos inoculados e não inoculados, nos diferentes diâmetros, foram analisadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

2.4 Resultados

2.4.1 Inoculação de *Phyllosticta citricarpa* em frutos de laranjas em diferentes estádios fenológicos

Sintomas típicos de MPC foram observados nos frutos de todos os diâmetros das variedades Hamlin, Valência e Pêra, independentemente da concentração de inóculo. O primeiro sintoma observado foi o da falsa melanose. Esse tipo de sintoma foi observado apenas nos frutos inoculados com 1,5, 3,0 e 5,0 cm de diâmetro (Figura 4).

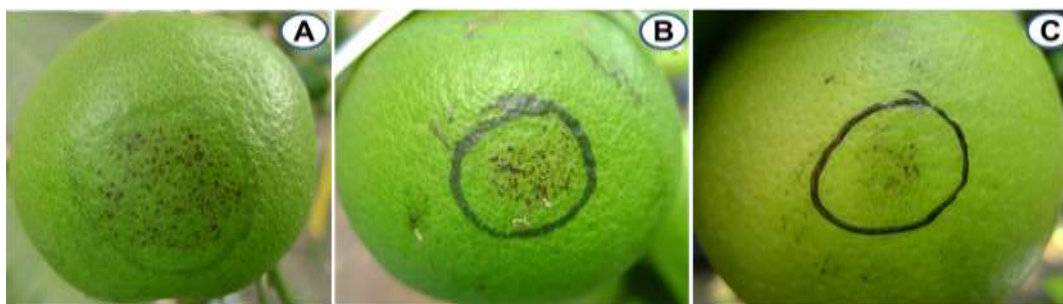


Figura 4 - Sintomas de falsa melanose em frutos inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, quando ainda estavam com 1,5 (A), 3,0 (B) e 5,0 (C) cm de diâmetro

Nos frutos inoculados com suspensão de conídios de *P. citricarpa* na concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹, foram observados sintomas de falsa melanose apenas nos frutos inoculados com 1,5 e 3,0 cm de diâmetro, enquanto que, nos frutos inoculados com suspensão de conídios de *P. citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, sintomas de falsa melanose foram observados nos frutos inoculados com 1,5, 3,0 e 5,0 cm de diâmetro. Não foram observadas diferenças na incidência de frutos com sintomas de falsa melanose entre as variedades e as concentrações de inóculo. O diâmetro dos frutos teve efeito significativo para a incidência de falsa melanose, sendo observada uma maior porcentagem de sintomas nos frutos inoculados com 1,5 cm do que nos frutos com 3,0 e 5,0 cm de diâmetro respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem de frutos com sintomas de falsa melanose, inoculados com 1,5, 3,0 e 5,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹

Variedade	10^3 conídios.mL ⁻¹				10^5 conídios.mL ⁻¹			
	1,5 cm	3,0 cm	5,0 cm	7,0 cm	1,5 cm	3,0 cm	5,0 cm	7,0 cm
Hamlin	64,0 a*	25,0 b	0	0	85,7 a	26,3 b	11,1 b	0
Valência	86,2 a	30,0 b	0	0	74,0 a	26,3 b	16,6 b	0
Pêra	82,0 a	20,0 b	0	0	96,5 a	30,0 b	23,4 b	0

*Letras diferentes representam diferenças significativas em contraste de Tukey a 5% de significância

O período de incubação da falsa melanose para as variedades Hamlin, Valência e Pêra foi de 67, 64 e 61 dias respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Tempo médio (dias) para a expressão dos sintomas de falsa melanose, nos frutos, das variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculadas com *Phyllosticta citricarpa*. Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos e duas concentrações de inóculo

Variedade	Tempo médio (dias)
Hamlin	67 ^{ns} (35-170)*
Valência	64 (35-122)
Pêra	61 (35-180)

^{ns} - Não significativo pelo teste de Log-rank a 5% de significância

*Período de incubação mínimo e máximo para a expressão da falsa melanose nos frutos inoculados

O período de incubação da falsa melanose para as três variedades variou de 61 a 67 dias, porém os primeiros sintomas foram observados nos frutos das três variedades aos 35 dias e se estenderam até aproximadamente 170 dias (Tabela 3, Figura 5).

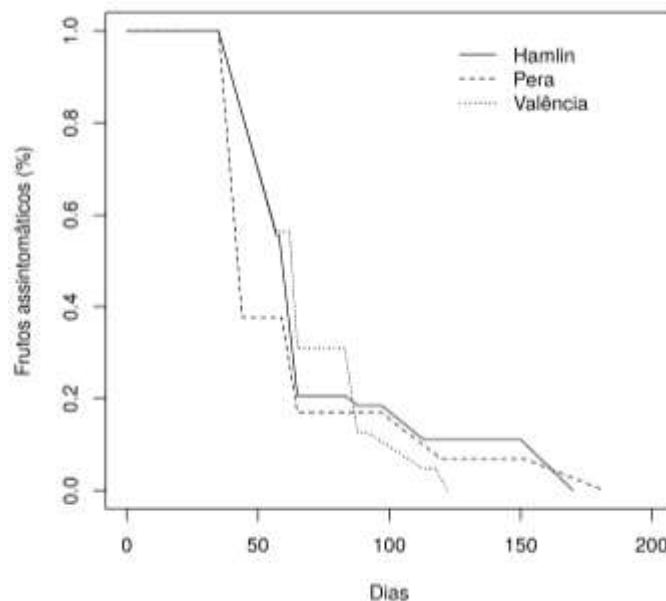


Figura 5 - Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo de aparecimento de sintomas de falsa melanose, nas variedades Hamlin, Pera e Valência. Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos e duas concentrações de inóculo

Quando se comparou a influência da concentração de inóculo no período de incubação da falsa melanose, foi observado que os frutos inoculados com suspensão de *P. citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, apresentaram tempos inferiores para a expressão dos sintomas, quando comparado com os frutos inoculados com suspensão de *P. citricarpa* na concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4 - Tempo médio (dias) para a expressão de sintomas de falsa melanose em frutos inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹. Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos nas três variedades

Concentração de inóculo (conídios.mL ⁻¹)	Expressão de falsa melanose (dias)
10^3	81 b*
10^5	60 a

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Log-rank a 5% de significância

Foram observadas diferenças no período de incubação da falsa melanose nos frutos inoculados nos diferentes diâmetros, para as duas concentrações de inóculo.

Frutos inoculados com diâmetros maiores levaram mais tempo para expressarem sintomas de falsa melanose do que frutos menores (Tabela 5).

Tabela 5 - Tempo médio (dias) para a expressão dos sintomas de falsa melanose em frutos de diferentes diâmetros, inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹. Dados representam a média das três variedades utilizadas no experimento

Diâmetro do fruto (cm)	Concentração de esporo (conídios.mL ⁻¹)	
	10^3	10^5
1,5	70 a*	40 a
3,0	116 b	65 b
5,0	-	156 c

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Log-rank a 5% de significância.

- ausência de frutos com sintomas

No experimento com inoculação de *P. citricarpa* na concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹ (Figura 6A), 74% dos frutos inoculados com 1,5 cm de diâmetro apresentaram sintoma da falsa melanose no intervalo entre 35 e 65 dias e 26% dos frutos, os sintomas apareceram entre 90 e 113 dias. Nos frutos inoculados com 3,0 cm de diâmetro, 70% apresentaram sintomas no intervalo entre 83 e 113 dias e 30% entre 140 e 170 dias.

No experimento com inoculação de *P. citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹ (Figura 6B), os tempos para a expressão dos sintomas foram menores. O período de incubação da falsa melanose para os frutos de 1,5 cm de diâmetro foi de 40 dias. Para os frutos com 3,0 cm de diâmetro, o período de incubação foi de 65 dias, e para os frutos com 5,0 cm de diâmetro, o período de incubação foi de 156 dias.

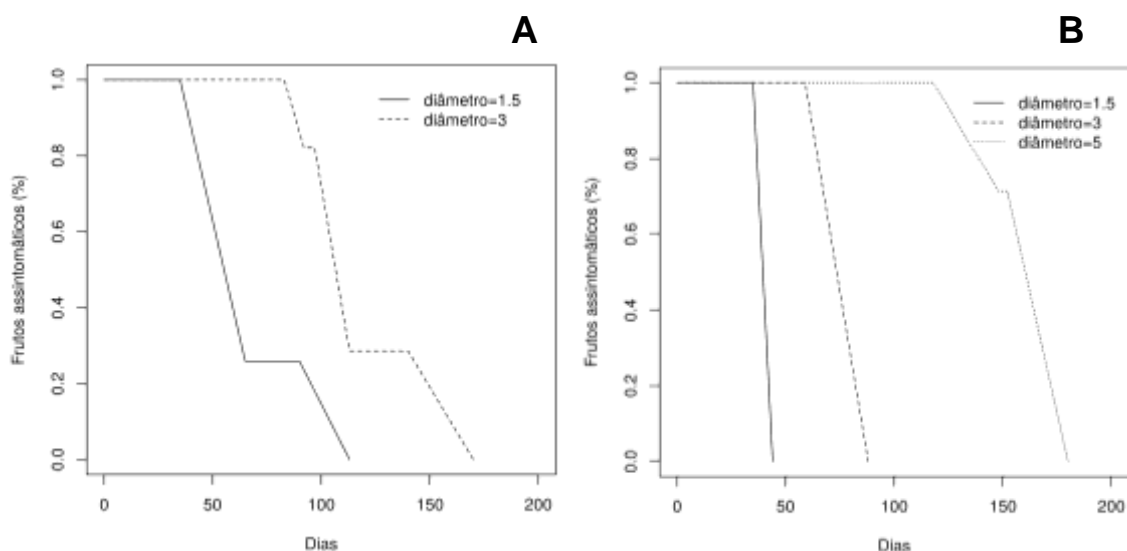


Figura 6 - Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo de aparecimento de sintomas de falsa melanose nos diferentes diâmetros dos frutos, inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* nas concentrações de 10^3 (A) e 10^5 (B) conídios.mL⁻¹. Dados representam a média do experimento das três variedades

Sintomas de mancha dura foram observados nos frutos de todos os diâmetros inoculados (Figura 7), porém picnídios foram observados somente nos frutos inoculados com 1,5, 3,0 e 5,0 cm de diâmetro.

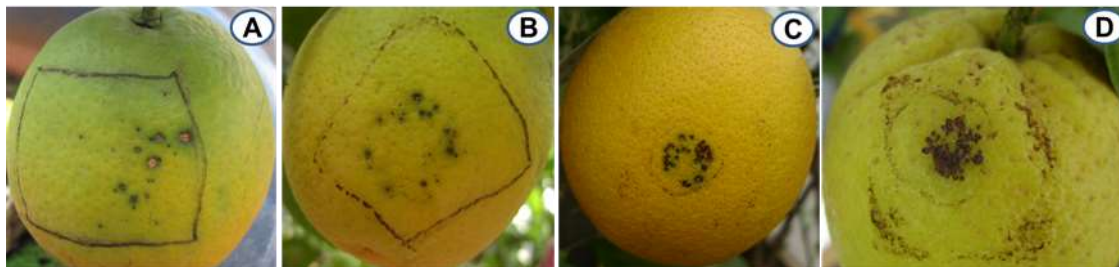


Figura 7 - Sintomas de mancha dura em frutos inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* com 1,5 (A), 3,0 (B), 5,0 (C) e 7,0 (D) cm de diâmetro, aos 270 dias após a inoculação

Nos frutos inoculados com suspensão de *P. citricarpa* na concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹, não foi possível quantificar a incidência de mancha dura nos frutos de 5,0 cm de diâmetro, de todas as variedades, e nos frutos de 7,0 cm de diâmetro da variedade Valência, em função da perda das parcelas experimentais. Nos frutos inoculados com suspensão de *P. citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, foram observados sintomas de mancha dura em todos os diâmetros inoculados. De forma semelhante ao observado para os frutos com sintomas de falsa melanose, não houve diferença na incidência de frutos com sintomas de mancha dura entre as

variedades e as concentrações de inóculo. Apenas o diâmetro dos frutos teve efeito significativo na incidência de mancha dura nos frutos inoculados (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem de frutos de laranja doce com sintoma de mancha dura, inoculados em diferentes diâmetros, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹

Variedade	10^3 conídios.mL ⁻¹			10^5 conídios.mL ⁻¹			
	1,5 cm	3,0 cm	7,0 cm	1,5 cm	3,0 cm	5,0 cm	7,0 cm
Hamlin	68,0 a*	25,0 b	30,0ab	71,4 a	26,3 b	27,7 b	48,1ab
Valência	72,0 a	50,0 b	-	52,0 a	42,1 b	22,2 b	33,3ab
Pêra	45,0 a	40,0 b	16,6ab	58,6 a	30,0 b	29,4 b	59,0ab

*Letras diferentes representam diferenças significativas em contraste de Tukey a 5% de significância

Não foram observadas diferenças significativas no tempo de aparecimento do sintoma de mancha dura quando se compararam as inoculações com suspensão de inóculo nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹ (Tabela 7).

Tabela 7 - Tempo médio (dias) para a expressão de sintomas de mancha dura em frutos inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹. Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos nas três variedades

Concentração de inóculo (conídios.mL ⁻¹)	Expressão de falsa melanose (dias)
10^3	234 ^{ns}
10^5	215

^{ns} - Não significativo pelo teste de Log-rank a 5% de significância

Independentemente da concentração de inóculo utilizada, o tempo para o aparecimento dos sintomas de mancha dura nos frutos das três variedades foi superior a 100 dias. O período de incubação da mancha dura foi significativamente menor na variedade Valência do que nas demais variedades. O período de incubação da mancha dura para a variedade Valência foi de 174 dias, enquanto que para as variedades Hamlin e Pêra foi de 236 e 251 dias respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8- Tempo médio (dias) para a expressão dos sintomas de mancha dura, das variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculadas com *Phyllosticta citricarpa*. Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos e as duas concentrações de inóculo

Variedade	Tempo médio(dias)
Pêra	251 a* (144-341)**
Hamlin	250 a (117-360)
Valência	174 b (107-279)

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Log-rank a 5% de significância

**Período de incubação mínimo e máximo para a expressão da mancha dura nos frutos inoculados

Para a variedade Valência, os primeiros sintomas começaram a aparecer no intervalo de 107 a 113 dias, enquanto que para as variedades Hamlin e Pêra os primeiros sintomas foram observados no intervalo de 117 a 145 e 144 a 148 dias respectivamente (Figura 8).

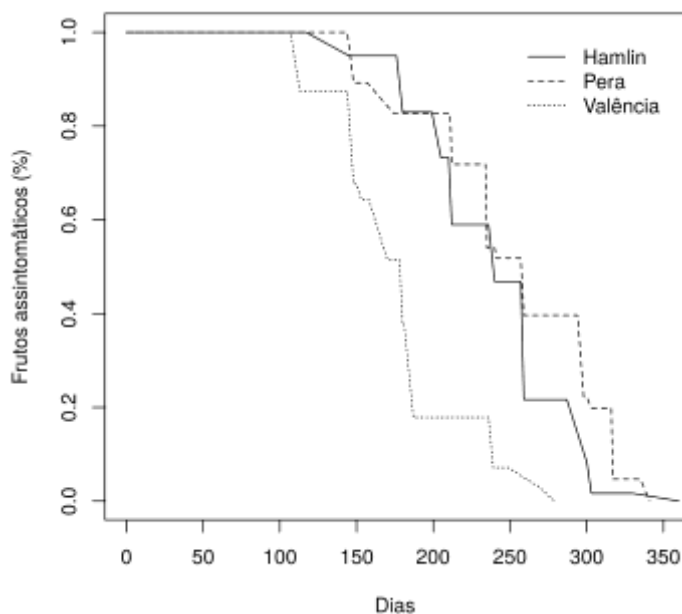


Figura 8 - Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo de aparecimento dos sintomas de mancha dura nas variedades Hamlin, Valência e Pêra. Dados representam a média do experimento, considerando todos os diâmetros dos frutos e as duas concentrações de inóculo

Foi observada diferença no período de incubação da mancha dura quando se comparou os frutos inoculados com diferentes diâmetros O período de incubação da

mancha dura nos frutos inoculados com 1,5, 3,0, 5,0 e 7,0 cm de diâmetro, foi de 240, 217, 176 e 197 dias, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Tempo médio (dias) para a expressão de sintomas de mancha dura, nos diferentes diâmetros, inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹. Dados representam a média das três variedades utilizadas no experimento

Diâmetro do fruto (cm)	Tempo médio (dias)
1,5	240 a* (123-341)**
3,0	217 ab (100-330)
5,0	176 c (100-267)
7,0	197 bc (119-300)

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Log-rank a 5% de significância

** Período de incubação mínimo e máximo para o aparecimento da mancha dura nos frutos inoculados

O tempo para a expressão dos sintomas foi longo em todos os diâmetros inoculados. Os primeiros frutos com sintomas de mancha dura começaram a aparecer aproximadamente aos 120 dias após a inoculação. Com exceção dos frutos inoculados com 5,0 cm, o aparecimento de sintomas de mancha dura prolongou-se por um amplo período, até um ano após a inoculação (Figura 9).

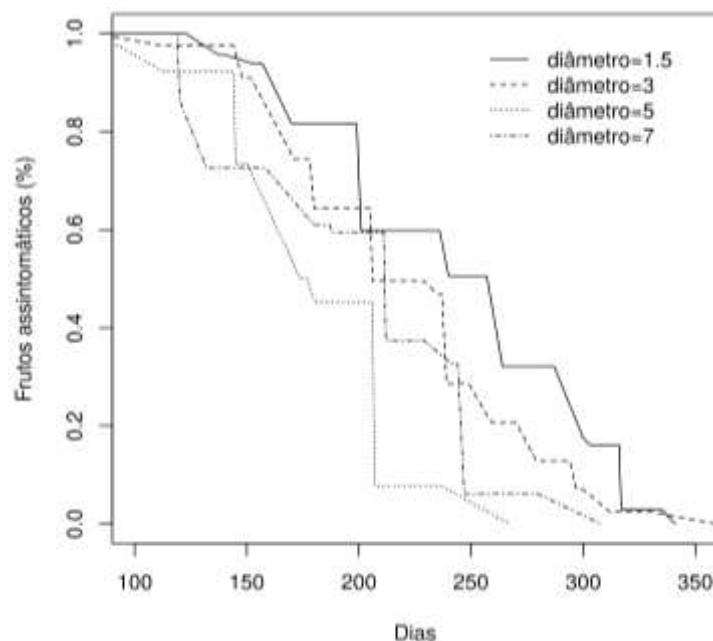


Figura 9 - Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo de aparecimento de sintomas de mancha dura nos frutos de diferentes diâmetros. Dados representam a média do experimento das três variedades nas duas concentrações de inóculo

O índice de cor dos frutos no momento da expressão dos sintomas de falsa melanose foi menor nos frutos de 5,0 cm de diâmetro, do que nos frutos de 1,5 e 3,0 cm de diâmetro (Tabela 10). O índice de cor dos frutos no momento da expressão dos sintomas de mancha dura foi similar nos frutos com 1,5 e 7,0 cm de diâmetro, porém diferiu daqueles dos frutos de 3,0 e 5,0 cm de diâmetro (Tabela10).

Tabela 10 - Índice de cor dos frutos das três variedades nos diferentes diâmetros, no momento da inoculação e da expressão dos sintomas de falsa melanose e mancha dura

Diâmetro (cm)	Índice de cor*		
	Dia da inoculação	Falsa melanose	Mancha dura
1,5	-17,42 a**	-16,31 a	-0,78 a
3,0	-18,24 a	-15,63 a	-3,23 b
5,0	-15,63 b	-6,27 b	-3,88 b
7,0	-2,52 c	-	1,06 a

*Média do índice de cor dos frutos das três variedades

**Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pela análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

- ausência de frutos com sintomas

Quando se comparou o índice de cor dos frutos e os tempos para a expressão dos sintomas da MPC nos diferentes diâmetros, observou-se que os sintomas de falsa melanose só se expressaram em frutos verdes enquanto que os sintomas de mancha dura só se expressaram com a maturação dos frutos (Figura 10).

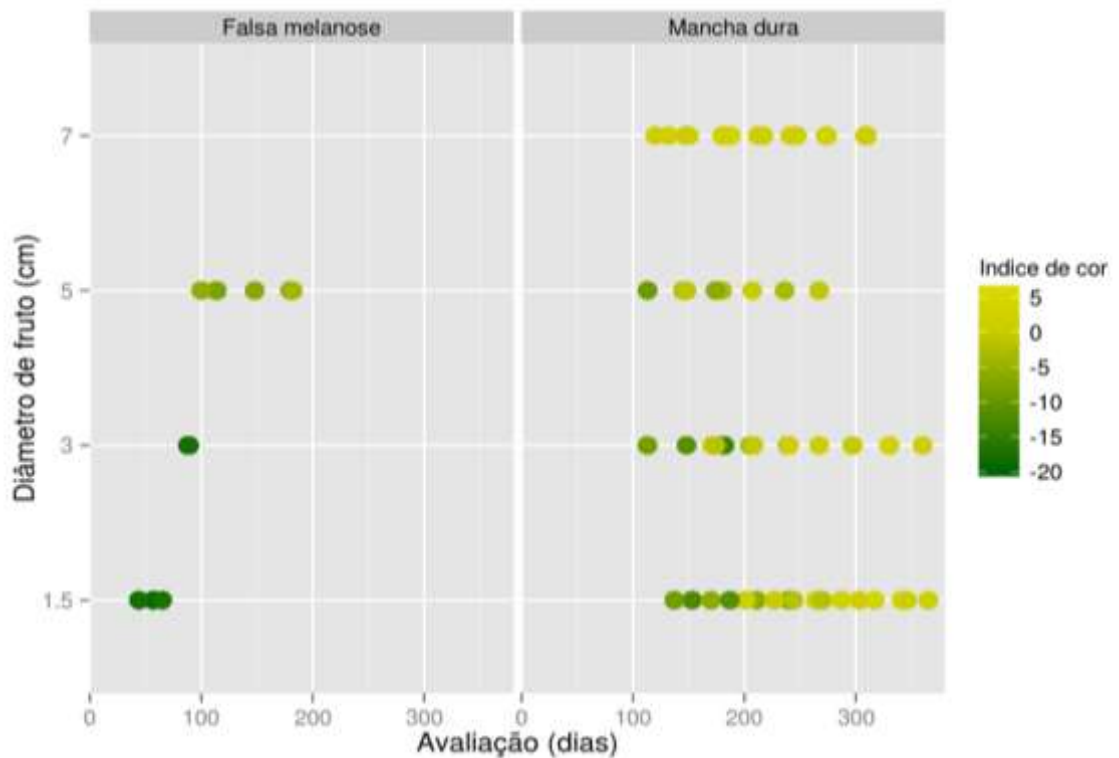


Figura 10 – Índice de cor dos frutos e tempo médio para a expressão de sintoma de falsa melanose e mancha dura em frutos de 1,5, 3,0, 5,0 e 7,0 cm de diâmetro, inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* nas concentrações de 10^3 e 10^5 conídios.mL⁻¹. Dados representam a média das três variedades utilizadas no experimento

Nos frutos inoculados com 1,5 e 3,0 cm de diâmetro os sintomas de falsa melanose e de mancha dura apareceram no local da inoculação independentemente uns dos outros (Figuras 11 e 12). Nos frutos inoculados com 5,0 cm de diâmetro não foram observados os dois tipos de sintomas conjuntamente, embora ambos tenham se expressado em diferentes frutos (Figura 4C e Figura 13). Nos frutos inoculados com 7,0 cm de diâmetro foi observado somente sintomas de mancha dura (Figura 14).

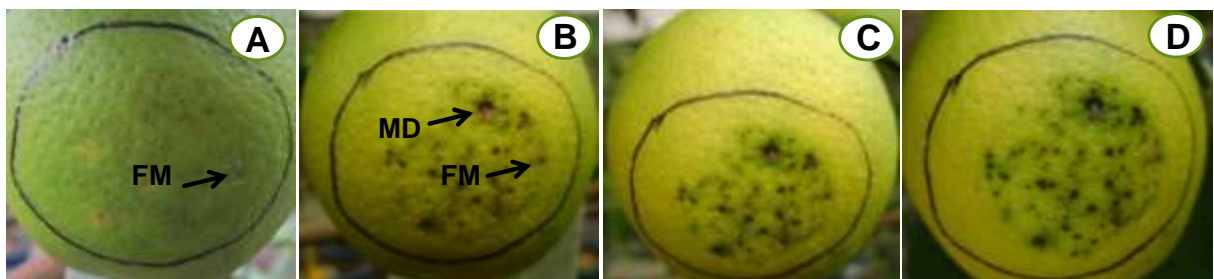


Figura 11 - Evolução dos sintomas de mancha preta dos citros em fruto de laranja 'Valência' inoculado com 1,5 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, aos 160 (A), 200 (B), 230 (C) e 260 (D) dias após a inoculação. Note que os sintomas de falsa melanose (FM) e mancha dura (MD) são distintos um do outro

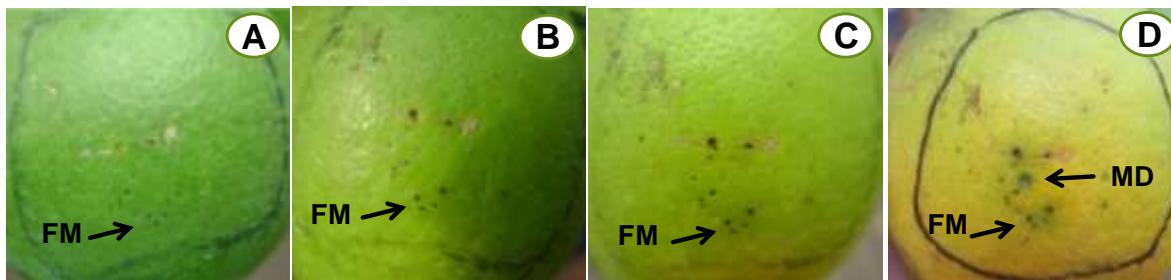


Figura 12 - Evolução dos sintomas de mancha preta dos citros em fruto de laranja 'Pêra' inoculado com 3,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, aos 120 (A), 150 (B), 180 (C) e 240 (D) dias após a inoculação. Note que os sintomas de falsa melanose (FM) e mancha dura (MD) são distintos um do outro

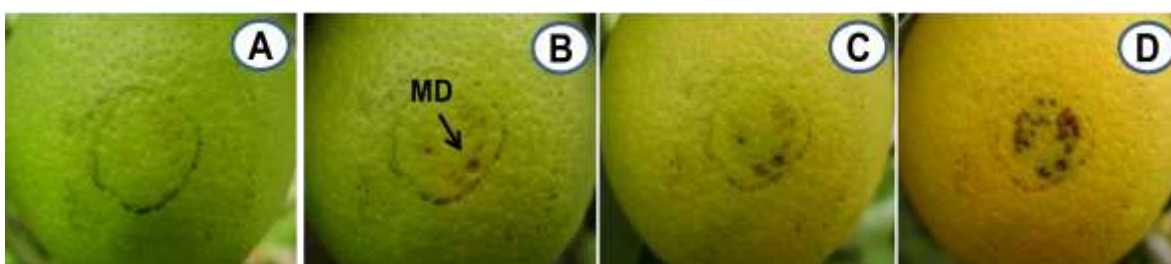


Figura 13 - Evolução dos sintomas de mancha preta dos citros em fruto de laranja 'Hamlin' inoculado com 5,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, aos 110 (A), 140 (B), 170 (C) e 200 (D) dias após a inoculação

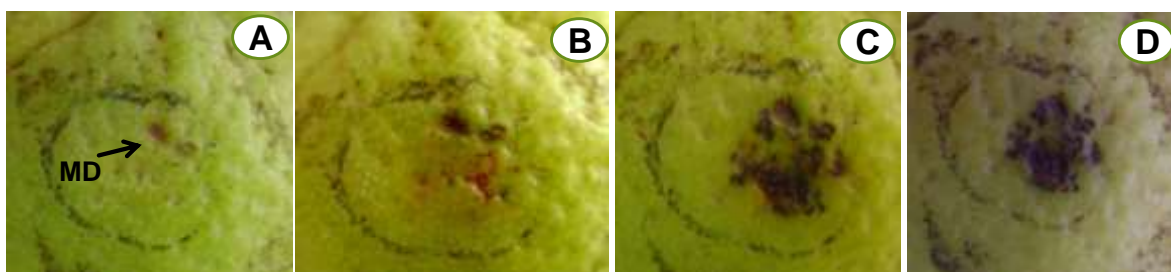


Figura 14 - Evolução dos sintomas de mancha preta dos citros em fruto de laranja 'Hamlin' inoculado com 7,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, aos 150 (A), 180 (B), 210 (C) e 240 (D) dias após a inoculação

2.4.2 Inoculação múltipla de *Phyllosticta citricarpa*, no mesmo fruto, em diferentes estádios fenológicos

Foram observados sintomas típicos de MPC nas inoculações realizadas nos frutos aos 3,0, 4,0 e 5,0 cm de diâmetro (Figura 15). Porém devido à baixa porcentagem de frutos com sintomas não foi possível realizar análise estatística.



Figura 15 - Sintomas típicos de mancha preta dos citros em frutos de 'Valência' inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* aos 3,0 (A), 4,0 (B) e 5,0 (C) cm de diâmetro, 210 dias após a inoculação

O primeiro sintoma observado foi o da falsa melanose. Esse sintoma foi observado nos frutos inoculados nos diâmetros de 3,0, 4,0 e 5,0 cm para as variedades Hamlin e Valência e nos diâmetros de 3,0 e 4,0 cm para a variedade Pêra. Para os frutos inoculados aos 3,0 cm de diâmetro das três variedades, a expressão dos sintomas de falsa melanose foi superior a 150 dias. Para os frutos inoculados aos 4,0 e 5,0 cm de diâmetro, a expressão dos sintomas ocorreu aproximadamente aos 120 dias (Figura 16).

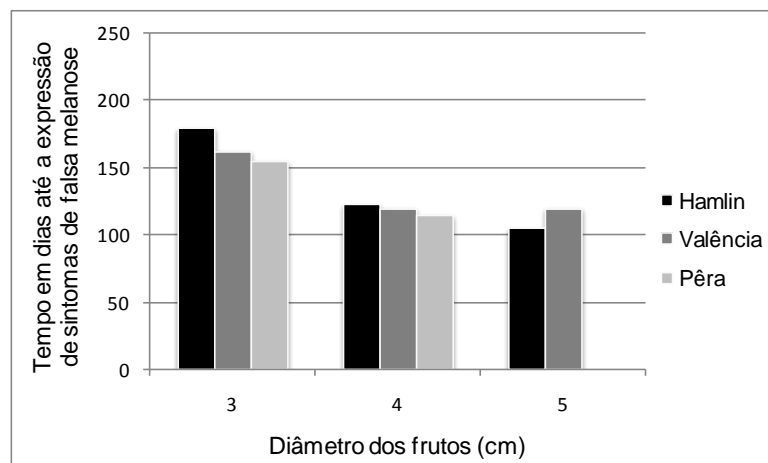


Figura 16 - Tempo médio para o aparecimento de sintomas de falsa melanose nos frutos de laranja das variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculados aos 3,0, 4,0 e 5,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹

Foram observados sintomas de macha dura nos frutos inoculados aos 3,0, 4,0 e 5,0 cm de diâmetro nas três variedades. Para os frutos inoculados aos 3,0 e 4,0 cm de diâmetro, o tempo para o aparecimento dos sintomas de mancha dura foi superior a 200 dias. Para os frutos inoculados aos 5,0 cm de diâmetro, os sintomas apareceram após 140, 150 e 160 dias nas variedades Hamlin, Pêra e Valência respectivamente (Figura 17).

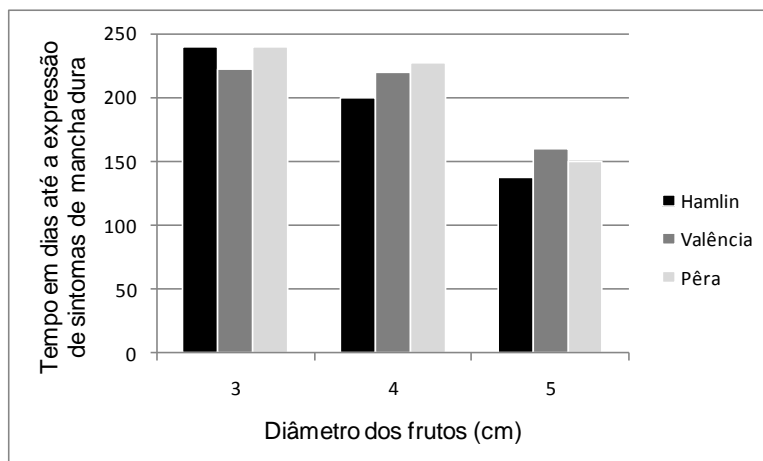


Figura 17 - Tempo médio para o aparecimento de sintomas de mancha dura nos frutos de laranja das variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculados aos 3,0, 4,0 e 5,0 cm de diâmetro com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹

Foram observados sintomas atípicos de MPC somente nos frutos inoculados com 5,0 e 6,0 cm de diâmetro, nas três variedades, e nos frutos inoculados aos 7,0 cm de diâmetro nas variedades Hamlin e Valência (Figura 18).



Figura 18 - Sintomas atípicos de MPC observados em frutos inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa*, na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹ aos 5,0 (A), 6,0 (B) e 7,0 (C) cm de diâmetro, 200 dias após a inoculação

O tempo para o aparecimento desse tipo de sintoma nos frutos inoculados foi superior a 100 dias. Nos frutos de 7,0 cm de diâmetro da variedade Valência o tempo foi de 150 dias (Figura 19).

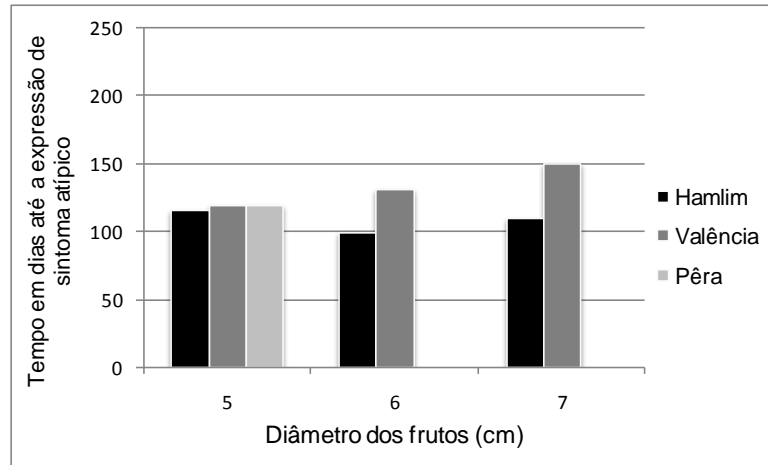


Figura 19 - Tempo médio para o aparecimento de sintomas atípicos de mancha preta dos citros, nas variedades Hamlin, Valência e Pêra, inoculados aos 5,0, 6,0 e 7,0 cm de diâmetro, com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹

2.4.3 Germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* na superfície de frutos de laranja, em diferentes estádios fenológicos, observadas em microscopia eletrônica de varredura

Não foram observadas diferenças na porcentagem de germinação dos conídios de *P. citricarpa*, na superfície dos frutos de laranja Pêra, nos diferentes diâmetros avaliados (Tabela 11).

Tabela 11 - Porcentagem de conídios de *Phyllosticta citricarpa* germinados na superfície de frutos de laranja 'Pêra', nos diferentes diâmetros, após 48 h de câmara úmida

Diâmetro do fruto (cm)	Conídios germinados (%)
1,5	59 ^{ns}
3,0	62
5,0	61
7,0	64

^{ns} – Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de significância

Não foram observadas diferenças no padrão de germinação do fungo em relação aos diferentes diâmetros inoculados. Conídios germinados e apressórios formados foram observados, na superfície dos frutos inoculados nos diferentes diâmetros, após 48h de câmara úmida (Figura 20).

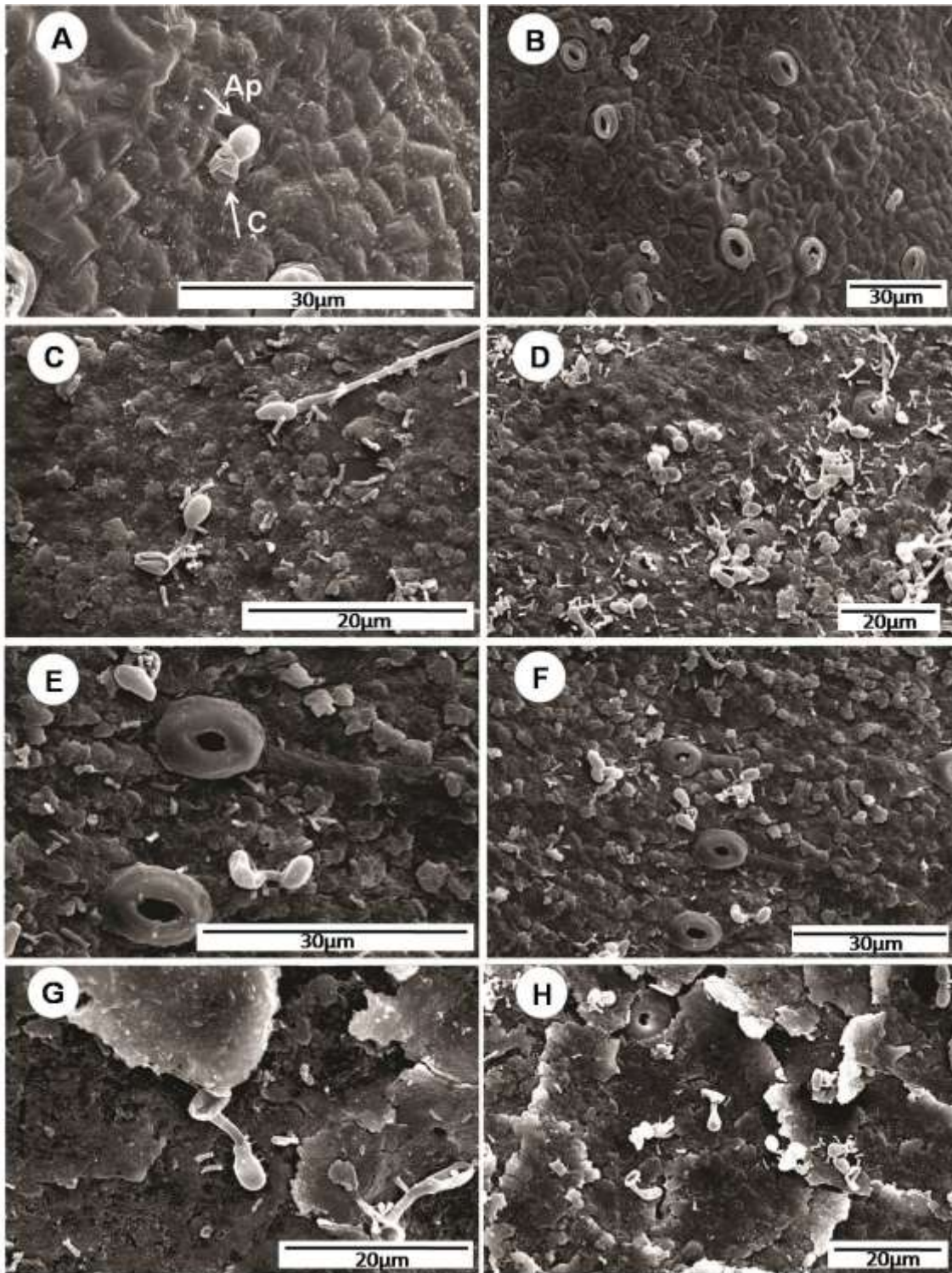


Figura 20 - Eletromicrografias da germinação de conídios e formação de apressórios (setas) de *Phyllosticta citricarpa* na superfície de frutos de laranja 'Pêra' com 1,5 (A, B), 3,0 (C, D), 5,0 (E, F) e 7,0 (G, H) cm de diâmetro, após 48 h de câmara úmida

2.4.4 Detecção de compostos fenólicos presentes no flavedo de frutos de laranja doce em diferentes estádios fenológicos

Dos 24 compostos fenólicos analisados foram detectados e quantificados os flavonoides hesperidina, diosmina, nobiletina, tangeretina, naringenina, eriocitrina e rutina e a chalcona hesperidina chalcona (Figura 21).

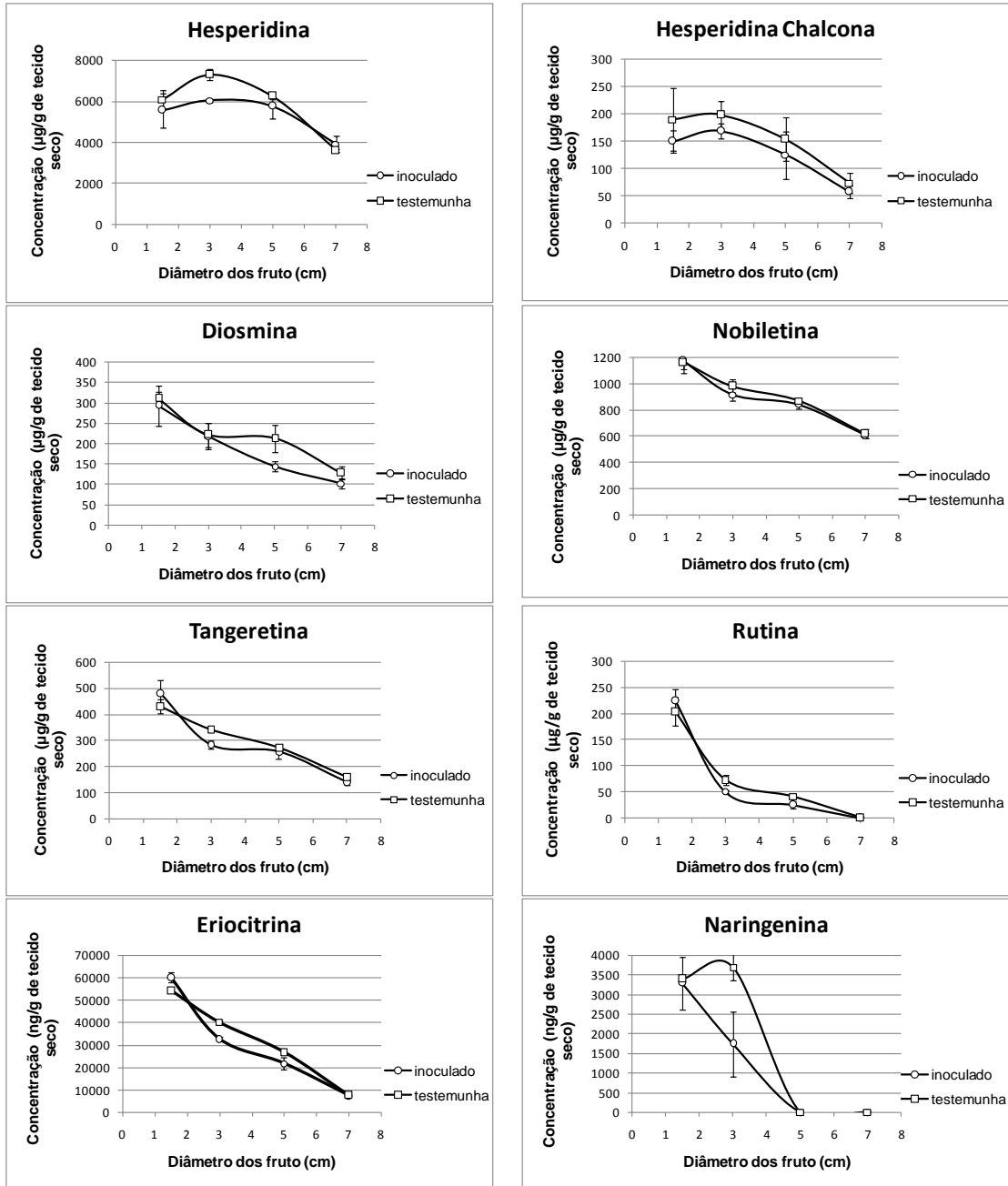


Figura 21 - Concentração dos compostos fenólicos presentes no flavedo de frutos de laranja 'Pêra', nos diferentes diâmetros, inoculados e não inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, após 48 h de câmara úmida

Os compostos, hesperidina, hesperidina chalcona, diosmina, nobiletina, tangeretina e rutina não apresentaram diferenças de concentração no flavedo dos frutos inoculados e não inoculados após 48h de câmara úmida (Tabela 12). Ao se comparar a concentração dos compostos fenólicos no flavedo dos frutos inoculados e não inoculados, nos diferentes diâmetros, as concentrações dos compostos diminuíram à medida que os frutos aumentaram de tamanho. Os compostos hesperidina e hesperidina chalcona não apresentaram diferenças de concentrações no flavedo dos frutos com 1,5 e 3,0 cm de diâmetro. Para os demais compostos, os frutos com 1,5 cm de diâmetro foram os que apresentaram as maiores concentrações no flavedo dos frutos seguido pelos frutos de 3,0, 5,0 e 7,0 cm de diâmetro. (Tabela 11).

Tabela 12 – Concentração média dos compostos fenólicos no flavedo de frutos de laranja 'Pêra', inoculados e não inoculados com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, nos diferentes diâmetros após 48 h de câmara úmida

Diâmetro dos frutos (cm)	Concentração dos compostos fenólicos (µg/g de tecido seco)*					
	Hesperidina	Hesperidina chalcona	Diosmina	Nobiletina	Tangeretina	Rutina
1,5	5821a**	169 a	301 a	1169 a	454 a	215 a
3,0	6673 a	183 a	219 b	950 b	324 b	61 b
5,0	6010 a	139 ab	177 bc	857 b	263 b	33 bc
7,0	3759 b	65 b	114 c	611 c	149 c	0,66 c

* Médias das concentrações dos compostos nos frutos inoculados e não inoculados nos diferentes diâmetros

** Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

A concentração do flavonoide eriocitrin no flavedo dos frutos apresentou diferenças entre os frutos inoculados e não inoculados após 48h de câmara úmida, quanto em relação aos diâmetros. As diferenças na concentração de eriocitrin no flavedo dos frutos inoculados e não inoculados foram observadas nos frutos de 1,5, 3,0 e 5,0 cm de diâmetro, não sendo observada diferença de concentração nos frutos de 7,0 cm de diâmetro (Tabela 13).

Tabela 13 - Concentração de eriocitrin no flavedo de frutos de laranja 'Pêra', inoculados e não inoculados, com suspensão de conídios de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, após 48 h de câmara úmida

Diâmetro dos frutos (cm)	Eriocitrin (ng/g de tecido seco)	
	Inoculado	Não inoculado
1,5	60302A*a**	54484 Ba
3,0	32736 Bb	40193 Ab
5,0	21722 Bc	26975 Ac
7,0	7764 Cd	7368 Cd

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

**Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

O flavonoide naringenina apresentou apenas diferença de concentração entre os frutos inoculados e não inoculados aos 3,0 cm de diâmetro. Naringenina não foi detectado nos frutos inoculados e não inoculados aos 5,0 e 7,0 cm de diâmetro (Tabela 14).

Tabela 14 - Concentração de naringenina no flavedo de frutos de laranja 'Pêra', inoculados e não inoculados, com suspensão de conídios de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹, após 48 h de câmara úmida

Diâmetro dos frutos (cm)	Naringenina (ng/g de tecido seco)	
	Inoculado	Não inoculado
1,5	3287,03 A*a**	3395,34 Aa
3,0	1740,76 Bb	3694,84 Ab
5,0	0	0
7,0	0	0

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

**Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

2.5 Discussão

Duas características da MPC que a diferenciam de outras doenças são o longo período de incubação e os diferentes tipos de sintomas nos frutos. Nos experimentos de inoculação de *P. citricarpa* em frutos com diferentes diâmetros, os primeiros sintomas observados foram o da falsa melanose e esse tipo de sintoma foi observado somente nos frutos inoculados com 1,5, 3,0 e 5,0 cm de diâmetro. Kotzé (1981) e Góes (1998) também observaram a presença desse tipo de sintomas em frutos de laranja verdes. No presente estudo e considerando apenas os sintomas de falsa melanose, os frutos mais novos foram os que apresentaram menor período de incubação e maior porcentagem de doença, sendo que o período de incubação foi influenciado pela concentração de inóculo, diâmetro dos frutos e temperatura. Na inoculação dos frutos com suspensão de *P. citricarpa* na concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹, uma das repetições ocorreu no inverno, e isso fez com que se prolongasse o período de incubação para essa repetição. Wadia e Butler (1994) estudaram o efeito da temperatura no período de incubação de *Puccinia arachidis*, *Phaeoisariopsis personata* e *Cercospora arachidicola* em amendoim e relataram que os períodos de incubação desses patógenos podem ter uma variação de até 37 dias dependendo da temperatura no momento da inoculação.

Frutos inoculados com suspensão mais concentrada de *P. citricarpa* expressaram sintomas de falsa melanose mais rapidamente do que os frutos inoculados com suspensão menos concentrada. A concentração de inóculo afetando o período de incubação da doença também já foi relatada em outros patossistemas (DILLARD, 1989; MORAL; BOUHMIDI; TRAPERO, 2008). Hong e Hwang (1998) relataram uma diminuição de três dias no período de incubação da antracnose em pimenta quando utilizaram alta concentração de inóculo. O aumento do diâmetro dos frutos influenciou no aumento do período de incubação e na redução da incidência de frutos sintomáticos. Resultados semelhantes foram observados por Hoffman et al. (2002) em videira infectada por *Guignardia bidwellii*. Da mesma forma que no presente estudo, esses mesmos autores também observaram uma diminuição na incidência da doença à medida que os frutos se tornavam mais velhos, sugerindo que estes se tornavam mais resistentes. Por outro lado, no presente estudo, foram detectadas maiores concentrações dos flavonoides no flavedo dos frutos de 1,5 e 3,0 cm de diâmetro e, à medida que estes aumentaram de diâmetro, houve uma

redução na quantidade dos mesmos. Os flavonoides quantificados neste trabalho já foram relatados inibindo o crescimento de diversos patógenos (DEL RÍO et al., 1998, 2004; ORTUÑO et al., 2006). De acordo com Ortuño et al. (1999) a colonização de patógenos apenas nos frutos próximos à maturidade fisiológica está relacionada com a diminuição dos compostos fenólicos na superfície dos frutos à medida que estes amadurecem. Esses mesmos autores demonstraram que, em frutos de tangelo, os flavonoides nobiletina, sinensetina e tangeretina foram reduzidos em 50, 33 e 32%, respectivamente, nos frutos maduros quando comparados com os frutos mais novos. Os autores relataram ainda que a localização desses compostos na superfície dos frutos pode estar relacionada com a proteção contra patógenos.

Uma das funções dos compostos fenólicos é atuar na defesa da planta (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2008). Os flavonoides quantificados nesse trabalho provavelmente são constitutivos dos frutos, já que também foram encontrados nos frutos sadios. Esse resultado indica que esses flavonoides podem estar relacionados aos mecanismos de defesa pré-formados da planta, uma vez que esses flavonoides já foram relatados tendo ação contra patógenos. Além de atuar como mecanismo de defesa pré-formado, os fenóis também podem atuar como mecanismo de defesa pós-formado. Brigati (2009) e Marques et al. (2012) detectaram acúmulo de fenóis na epiderme de frutos inoculados com *P. citricarpa*, e nas câmaras subestomáticas de frutos com sintomas de falsa melanose. Os resultados deste trabalho e os de Brigati (2009) corroboram com Marques et al. (2012), que relataram que os sintomas de falsa melanose estão relacionados com reação de defesa do hospedeiro.

Os primeiros sintomas de mancha dura apareceram com a mudança de coloração da casca e se estenderam até o amadurecimento completo do fruto. Esses dados estão de acordo com os encontrados na literatura, que relaciona o aparecimento da mancha dura com o período de amadurecimento dos frutos (FEICHTENBERGER, 1996; KOTZÉ, 2000). Não foram observadas diferenças no período de incubação da mancha dura nos frutos, das três variedades, nas duas concentrações de inóculo, demonstrando que os sintomas de mancha dura não estão relacionados à concentração do inóculo, mas sim ao estágio fenológico do fruto no momento da inoculação. Resultados semelhantes foram obtidos por Aguiar et al. (2012), quando inocularam frutos de 'Valência', com diferentes diâmetros, com suspensão de *P. citricarpa* nas concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios.mL⁻¹.

Para doenças influenciadas pela fenologia do hospedeiro, Bergamin Filho e Amorim (2002) recomendam que maior ênfase seja dada para estudos que visem identificar a época mais provável de ocorrência da infecção, para definir a melhor estratégia de manejo. Após o contato com o tecido suscetível, os conídios de *P. citricarpa* germinam e penetram ativamente a cutícula do fruto, produzindo uma massa de micélio que permanece quiescente na região subcuticular até o início da maturação (MCONIE, 1967). Fungos que permanecem quiescentes durante o desenvolvimento do hospedeiro já foram relatados em outros patossistemas (VERHOEFF, 1974; DICKMAN; ALVAREZ, 1983; DROBY et al., 1986). Conídios de *Colletotrichum musae* quando inoculados em bananas verdes permanecem quiescentes, na forma de apressório, até o amadurecimento dos frutos (MUIRHEAD; DEVERALL, 1981).

O período de incubação da mancha dura foi menor na variedade Valência do que nas variedades Hamlin e Pêra, contudo, este período foi longo nas três variedades. A MPC é considerada uma doença monocíclica e, portanto, o período de incubação tem pouca relevância para a dinâmica temporal da doença (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2002). Quando se comparou a incidência de frutos com sintomas, as três variedades apresentaram o mesmo nível de suscetibilidade. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por Spósito, Bassanezi e Amorim (2004) que avaliaram a resistência de frutos das variedades Hamlin, Valência e Pêra à MPC, através da comparação das curvas de progresso da doença, e concluíram que as três variedades possuem o mesmo nível de suscetibilidade. Nos frutos da variedade Valência foi observado um amarelecimento precoce da casca em relação às variedades Hamlin e Pêra. Esse amarelecimento pode ter sido a causa do menor período de incubação observado na variedade Valência. A coloração da casca e a maturação interna dos frutos são controladas por mecanismos distintos (AGUSTÍ, 2003). Normalmente esses dois processos ocorrem simultaneamente e ambos são influenciados pelo ambiente e pelos genótipos das plantas. O desenvolvimento dos frutos segue uma curva sigmoïdal com três fases distintas e o índice de maturação é expresso pelo aumento dos sólidos solúveis e a redução da acidez total; enquanto que a mudança da coloração da casca ocorre devido à degradação enzimática da clorofila por temperaturas altas, e à síntese de carotenoides, influenciada por temperaturas baixas (AGUSTÍ, 2003; MEDINA et al., 2005).

Os tempos médios para o aparecimento dos sintomas de mancha dura foram menores para os frutos de 5,0 e 7,0 cm, seguido pelos frutos de 3,0 e 1,5 cm de

diâmetro. Essa variação no período de incubação pode estar relacionada à resistência de frutos imaturos à colonização pelo patógeno. Mudanças fisiológicas ocorrem nos frutos durante o processo de amadurecimento (VERHOEFF, 1974), podendo ativar a infecção do patógeno (PRUSKY, 1996). Como observado anteriormente, houve uma redução na quantidade dos compostos fenólicos com a maturação dos frutos. Frutos de manga inoculados com *Alternaria alternata*, em diferentes estágios de amadurecimento, apresentaram diferenças no tempo de aparecimento de sintomas de mancha de alternaria. (PRUSKY; JACOBY; GOLDMAN, 1986).

Não houve diferenças quantitativas e nem qualitativas na germinação de conídios e na formação de apressórios de *P. citricarpa* na superfície dos frutos de laranja 'Pêra', nos diferentes diâmetros, após 48 h. Portanto, nenhum composto presente na casca do fruto foi capaz de inibir os processos de pré-penetração do patógeno. Moraes, Escanferla e Massola Jr. (2015) também não observaram diferença na porcentagem de germinação de conídios e formação de apressórios de *C. gloeosporioides* na superfície de frutos de goiaba 48 h após a inoculação. Porém, o *peg* de penetração foi influenciado pela idade do fruto, sendo observado apenas nos frutos de goiaba com 85 e 110 dias.

Na superfície dos frutos de laranja 'Pêra' de 7,0 cm de diâmetro, inoculados e não inoculados, foram observadas placas de ceras. A superfície do fruto de laranja é recoberta por uma camada contínua de cera, que tem como função evitar a perda de água por evaporação. Naturalmente esta camada de cera se rompe formando grandes placas que se desprendem da superfície (LADAMIYA, 2008). No presente estudo, foram observados conídios de *P. citricarpa* germinados e apressórios formados em cima das placas de cera que podem estar atuando como barreira física, atrasando a penetração do fungo, isso pode ser provavelmente correlacionado ao elevado período de incubação dos frutos de 7,0 cm de diâmetro

O sintoma de falsa melanose não evolui à medida que os frutos amadurecem, enquanto que o sintoma de mancha dura evolui com o amadurecimento dos frutos. Resultados semelhantes foram observados no campo, onde 100 frutos com sintomas de falsa melanose foram marcados e avaliados quinzenalmente (dados não mostrados). Todos os sintomas de mancha dura foram observados em locais distintos daqueles em que se observou falsa melanose (APÊNDICE C). Marques et

al. (2012), através de estudos anatômicos, relataram que sintomas de falsa melanose e mancha dura apresentam características distintas de colonização.

Os resultados dos experimentos de inoculações múltiplas foram semelhantes aos experimentos descritos anteriormente. Os primeiros sintomas observados foram os da falsa melanose seguidos pelos sintomas de mancha dura, e o período de incubação da falsa melanose foi menor em frutos com 4,0 cm de diâmetro. Para a mancha dura a diminuição no período de incubação foi observada na inoculação realizada aos 5,0 cm de diâmetro, entretanto, não foi possível saber se essa diminuição de tempo entre as inoculações foram significativas. Já para a inoculação nos frutos com 5,0, 6,0 e 7,0 cm de diâmetro das três variedades ocorreu o aparecimento de sintomas atípicos, mas os isolamentos desses sintomas caracterizaram *P. citricarpa*. Esse tipo de sintoma parece estar relacionado à reação de defesa da planta, pois quando os frutos foram inoculados com 5,0, 6,0 e 7,0 cm de diâmetro, estes ainda estavam verdes (-16, -12 e -6,0 de índice de cor respectivamente). Diferentemente dos outros experimentos, os frutos utilizados para o experimento de inoculações múltiplas foram provenientes de plantas enxertadas em citrumelo swingle. Porta enxertos diferentes podem induzir alterações nas variedades enxertadas, como precocidade de produção, época de maturação, coloração das cascas e alterações na composição química (SCHÄFER; BASTIANEL; DORNELLES, 2001). Logo, os resultados observados nesse experimento podem ter sido influenciados pela interação copa-porta enxerto.

Esse trabalho foi o primeiro a estudar separadamente os períodos de incubação dos diferentes sintomas da MPC e relacionar os sintomas com as diferentes idades dos frutos. Embora tenha sido observada uma alta porcentagem de frutos com sintomas de falsa melanose, este tipo de sintoma, não tem importância epidemiológica, pois como observado, não formam corpos de frutificação e os sintomas não evoluem. Por outro lado, os sintomas de mancha dura são os mais importantes epidemiologicamente, pois formam corpos de frutificação. Por mais que o período de incubação médio da mancha dura tenha sido longo, foi observado, no entanto, que os primeiros sintomas apareceram com aproximadamente 120 dias após a inoculação. Dependendo da finalidade da produção dos frutos, mercado interno, indústria ou exportação, diferentes estratégias de manejo devem ser adotadas, como por exemplo, estender o calendário de pulverização ou até mesmo antecipar a colheita dos frutos.

3 CONCLUSÕES

O período de incubação e o tipo de sintoma da mancha preta dos citros são variáveis em função da fenologia dos frutos.

O sintoma de falsa melanose só ocorre em frutos verdes e pode estar relacionado à defesa da planta.

A idade do fruto não interfere na porcentagem de germinação de conídios de *P. citricarpa*.

O sintoma de mancha dura está relacionado ao amadurecimento dos frutos, porém, não é suficiente para explicar o longo período de incubação nos frutos.

REFERÊNCIAS

- AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Accumulation of Scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 1678-1682, 1988.
- AGUIAR, R.L.; SCALOPPI, E.M.T.; GÓES, A. de; SPÓSITO, M.B. Período de incubação de *Guignardia citricarpa* em diferentes estádios fenológicos de frutos de laranja 'Valência'. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.37, n. 2, p. 155-158, 2012.
- AGUSTÍ, M. **Citricultura**. Madrid: Mundi-Prensa, 2003.422p.
- ALMEIDA, T.F. **Mancha preta dos citros: expressão dos sintomas em frutos pela inoculação com conídios e controle do agente causal (*Guignardia citricarpa*)**. 2009. 66 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
- BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER, A.A.; H.A.; WEERDT, M.; BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI JR, W.; GLIENKE-BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 464-477, 2002.
- BALDASSARI, R.B.; REIS, R.F.; GÓES, A. de. Relato de mancha preta do citros em pomares do estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27., 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Paulista de Fitopatologia, 2004. p. 126.
- _____. Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 337-341, 2006.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Doenças com período de incubação variável em função da fenologia do hospedeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 561-565, 2002.
- BRENTU, F.C.; OFFEI, K.A.O.S.K.; ODAMTTEN, G.T.; VICENT, A.; PERES, N.A.; TIMMER, L.W. Crop loss, aetiology, and epidemiology of citrus black spot in Ghana. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 3, p. 657-670, 2012.
- BRIGATI, J.B. **Análise anatômica e molecular do albedo de frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra' na interação com *Guignardia citricarpa***. 2009. 107 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- CARDOSO FILHO, J.A. **Efeito de extrato de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e**

***Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (telemorfo: *Guignardia citricarpa*).** 2003. 125 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CASTILLO, J.; BENAVENTE, O.; JOSE A. DEL RIO, J.A. Naringin and neohesperidin levels during development of leaves, flower buds, and fruits of *Citrus aurantium*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 99, n. 1, p. 67-73, 1992.

CHAKRAVARTY, T. Anthracnose of banana (*Gloeosporium musarum* Cke. & Masee) with special reference to latent infection in storage. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 40, n. 3, p. 337-345, 1957.

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; ARLEU, R.K.J.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Ocorrência da pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 205, 2003. Suplemento.

DE LANGE, J.H.; VICENT, A.P.; DU PLESSIS, L.M.; VAN WYK, P.J.; ACKERMAN, L.G.J. Scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) induced in citrus peel by black spot, *Guignardia citricarpa* Kiely. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 8, p. 83-84, 1976.

DEL RÍO, J.A.; ARCAS, M.C.; BENAVENTE-GARCIA, O.; ORTUÑO, A. Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum* and *Geotrichum* species **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4423-4428, 1998.

DEL RÍO, J.A.; GÓMEZ, P.; BAIDEZ, A.G.; ARCAS, M.C.; BOTÍA, J.M.; ORTUÑO, A. Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (Cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 7, p. 1913-1917, 2004.

DICKMAN, M.B.; ALVAREZ, A.M. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n.7, p. 748-750, 1983.

DILLARD, H.R. Effect of temperature, wetness duration, and inoculum density on infection and lesion development of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 10, p. 1063-1066, 1989.

DING, C.K.; CHACHIN, K.; UEDA, Y.; IMAHORI, Y.; WANG, C.Y. Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2883-2888, 2001.

DOIDGE, E.M. Some disease of citrus prevalent in South Africa. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 26, p. 320-325, 1929.

DROBY, S.; PRUSKY, D.; JACOBY, B.; GOLDMAN, A. Presence of antifungal compounds in the peel of mango fruits and their relation to latent infections of

Alternaria alternata. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, n. 2, p. 173-183, 1986.

EMBRAPA. Levantamento da ocorrência da pinta-preta-dos-citros (*Guignardia citricarpa*) em Rondônia – primeira atualização. Rondônia, 2012. 4 p. (Comunicado Técnico, 380). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/975532/1/cot380citros.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

FAGAN, G.; GÓES, A.de. Efeito da mancha preta dos frutos cítricos, causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutas de laranja 'Natal' e 'Valência'. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, p. 122, 2000.

FEICHTENBERGER, E. Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 93-108, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A.; (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239-269.

FUNDECITRUS. **Manual de pinta preta**. Araraquara, 2015. 12 p.

GASPAROTTO, L.; GÓES, A. de; PEREIRA, J.C.R.; BALDASSARI, R.B. Ocorrência da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado do Amazonas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 126, 2004. Suplemento.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A.V.; AZEVEDO, J.L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 251-255, 2002.

GÓES, A.de.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (Mc Alp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 318, 1993.

GÓES, A.de. Controle da mancha preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 9, n. 2, p. 305-320, 1998.

GÓES, A.de.; BALDASSARI, R.B.; FEICHTENBERGER, E.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; SPÓSITO, M.B. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Orlando, v. 2, n. 1, p. 1001-1002, 2000.

HE, D.; SHAN, Y.; WU, Y.; LIU, G.; CHEN, B.; YAO, S. Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, Washington, v. 127, n. 2, p. 880-885, 2011.

HOFFMAN, L.E.; WILCOX, W.F.; GADOURY, D.M.; SEEM, R.C. Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwellii* and its incubation period length. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 10, p. 1068-1076, 2002.

HONG, J.K.; HWANG, B.K. Influence of inoculums density, wetness duration, plant age, inoculation method, and cultivar resistance on infection of pepper plants by *Colletotrichum coccodes*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 10, p. 1079-1083, 1998.

HOROWITZ, R.M. The citrus flavonoids. In: SINCLAIR, W.B. (Ed.). **The orange: its biochemistry and physiology**. Riverside: University of California, 1961. chap. 11, p. 334-372.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, Sidney, v. 93, p. 249-292, 1948.

KIELY, T.B. Black spot of citrus in New South Wales coastal orchards. **Agricultural Gazette of New South Wales**, Sidney, v. 60, p. 17-20, 1949.

KIM, H.G.; KIM, G-S.; LEE, J.H.; PARK, S.; JEONG, W.Y.; KIM, Y-H.; KIM, J.H.; KIM, S.T.; CHO, Y.A.; LEE, W.S.; LEE, S.J.; JIN, J.S. Determination of the change of flavonoid components as the defence materials of *Citrus unshi* Marc. fruit peel against *Penicillium digitatum* by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 128, n. 1, p. 49-54, 2011.

KIM, J.J.; BEN-YEHOSHUA, S.; SHAPIRO, B.; HENIS, Y.; CARMELI, S. Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* sacc. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 97, n. 3, p. 880-885, 1991.

KOES, R.E.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J.N.M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **BioEssays**, Weinheim, v. 16, n. 2, p. 123-132, 1994.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, n. 12, p. 945-950, 1981.

_____. Black spot. In: TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAN, J.H. (Ed.). **Compendium of citrus disease**. SaintPaul: APS Press, 2000. p. 23-25.

LADAMIYA, M. **Citrus fruit: biology, technology and evaluation**. Madrid: Elsevier, 2008. 568p.

LINK, K.P.; WALKER, J.C. The isolation of catechol from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 100, n. 2, p. 379-383, 1933.

LINK, K.P.; ANGELL, H.R.; WALKER, J.C. The isolation of protocatechuic acid from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 81, p. 369-375, 1929.

- LIU, E-H.; ZHAO, P.; DUAN, L.; ZHENG, G-D.; GUO, L.; YANG, H.; LI, P. Simultaneous determination of six bioactive flavonoids in *Citri reticulata* epericarpium by rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadruple electrospray tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 141, n. 4, p. 3977-3983, 2013.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Maryland, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MARQUES, J.P.R.; SPÓSITO, M.B.; MELLO, A.F.S.; AMORIN, L.; MONDIN, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histopathology of black spot symptoms in sweet oranges. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 2, p. 439-448, 2012.
- MCONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 54, p. 40-43, 1964.
- MCONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, p. 743-746, 1967.
- MEDINA, C.L.; RENA, A.B.; SIQUEIRA, D.L.; MACHADO, E.C. Fisiologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: FUNDAG, 2005. p. 149-184.
- MORAES, S.R.G.; ESCANFERLA, M.E.; MASSOLA JR, N.S. Prepenetration and Penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* into Guava Fruit (*Psidium guajava* L.): Effects of Temperature, Wetness Period and Fruit Age. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v. 163, p. 149-159746, 2015.
- MORAL, J.; BOUHMIDI, K.; TRAPERO, A. Influence of maturity, cultivar susceptibility, and inoculation method on infection of olive fruit by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 92, n. 10, p. 1421-1426, 2008.
- MUIRHEAD, I.F.; DEVERALL, B.J. Role of appressoria in latent infection of banana by *Colletotrichum musae*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 19, n. 1, p. 77-84, 1981.
- NDUBIZU, T.O.C. Relations of phenolic inhibitors to resistance of immature apple fruits to rot. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 51, n. 3, p. 311-320, 1976.
- NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, H. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, 1992.

ORTUÑO, A.; ARCAS, M.C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL RÍO, J.A. Evolution of polymethoxy flavones during development of tangelo Nova fruits. **Food Chemistry**, London, v. 66, n. 2, p. 217-220, 1999.

ORTUÑO, A.; DÍAZ, L.; ALVAREZ, N.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A.; DEL RÍO, J.A. Comparative study of flavonoid and scoparone accumulation in different Citrus species and their susceptibility to *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, London, v. 125, n. 1, p. 232-239, 2011.

ORTUÑO, A.; BÁIDEZ, A.; GÓMEZ, P.; ARCAS, M.C.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A.; DEL RÍO, J.A. *Citrus paradise* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, London, v. 98, n. 2, p. 351-352, 2006

ORTUÑO, A.; REYNALDO, I.; FUSTER, M.D.; BOTÍA, J.; PUIG, D.G.; SABATER F.; LIDÓN, A.G.; PORRAS, I.; DEL RÍO, J.A. Citrus cultivars with high flavonoid contents in the fruits. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, p. 231-236, 1997.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L., REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 593-633.

PODILA, G.K.; ROGERS, L.L.; KOLATTUKUDY, P.E. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 103, p. 267-272, 1993

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 413-434, 1996.

PRUSKY, D.; KEEN, N.T.; SIMS, J.J.; MIDLAND, S.L. Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 12, p. 1578-1582, 1982.

REIS, E.M.; FORCELINI, C.A.; REIS, A.C. **Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas**. 5.ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2007. 153 p.

RIBEIRO, A.B.; ABDELNUR, P.V.; GARCIA, C.F.; BELINI, A.; SEVERINO, V.G.P.; SILVA, M.F.D.G.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; CARVALHOS, A.D.; SOUZA, A.A.S.; MACHADO, M.A. Chemical characterization of *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* and the effect of some isolated compounds on the growth of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 17, p. 7815-7822, 2008.

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L.D. A mancha preta dos frutos cítricos causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 3, p. 455, 1980.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.

SCHUBERT, T.; DEWDNEY, M.; PERES, N.; PALM, M.; JEYAPRAKASH, A.; SUTTON, B.; MONDAL, S.; WANG, N.Y.; RASCOE, J.; PICTON, D. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 9, p. 1225, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. 4. ed. Piracicaba: FEALQ, 2008.p. 227-247.

SHIRLEY B.W. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 1, n. 11, p. 377-382, 1996.

SILVA, S.X.B.; SANTOS-FILHO, H.P.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARBOSA, C.J.; ABREU, K.C.L.M. Presença de *Guignardia citricarpa* (Kiely, 1949) no Recôncavo altera *status* fitossanitário da citricultura baiana. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, p. 203-206, 2012.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha preta dos citros: epidemiologia e manejo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 30, n. 1/2, p. 45-64, 2009.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus responses system. **New Phytologist**, Cambridge, v. 132, n. 1, p. 1-45, 1996.

SPÓSITO, M.B.; BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L. Resistência à mancha preta dos citros avaliadas por curvas de progresso da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 532-537, 2004.

SPÓSITO, M.B. Mancha ou pinta-preta dos citros. In: ZAMBOLIM, L.; BASSANEZI, R.B. (Ed.). **Doenças quarentenárias dos citros**. Viçosa: UFV, DFP, 2006. p. 93-108.

SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R.B.; BERGAMIN FILHO, A.;HAU, B. Spatial pattern of black spot incidence within citrus tree related to disease severity and pathogen dispersal. **Plant Pathology**, London, v. 30, n. 1, p. 103-108, 2008.

SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; CZERMAINSKI, A.B.C. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. **Crop Protection**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 1546-1552, 2011.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

THE CENTRE FOR BIOSCIENCES AND AGRICULTURE INTERNATIONAL.
Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/26154>>. Acesso em: 12 jun. 2015.

VERHOEFF, K. Latent infections by fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 99-110, 1974.

WADIA, K.D.R.; BUTLER, D.R. Relationships between temperature and latent periods of rust and leaf-spot disease of groundnut. **Plant Pathology**, London, v. 43, n. 1, p. 121-129, 1994.

WALKER, J.C. Studies on disease resistance in the onion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 11, n. 3, p.183-189, 1925.

ZHENG, G.;YANG, D.;WANG, D.;ZHOU, F.;YANG, X.;JIANG, L. Simultaneous determination of five bioactive flavonoids in pericarpium *Citri reticulatae* from china by high-performance liquid chromatography with dual wavelength detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 15, p. 6552-6557, 2009.

APÊNDICES

Apêndice A - Parâmetros ótimos do espectrômetro de massa utilizados em cada analito para o método HPLC-ESI-MS/MS

DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (V)	CEP (V)	CXP (V)	IS (V)
22	350	8	50	-20	4	4500
Horiz	Vert	CUR (psi)	CAD (psi)	GS1 (psi)	GS2 (psi)	T (°C)
3.0	4.0	40	6	35	45	300

Sendo: DP - potencial de desagregação

FP - potencial de focalização

EP - potencial de entrada

IS - voltagem do turboion spray®

CAD - energia do gás de colisão

CE - energia de colisão

CEP e CXP - potenciais de entrada e saída da célula respectivamente

Vert e Horiz - parâmetros dependentes da fonte como a altura e distância da sonda do turboion spray® respectivamente

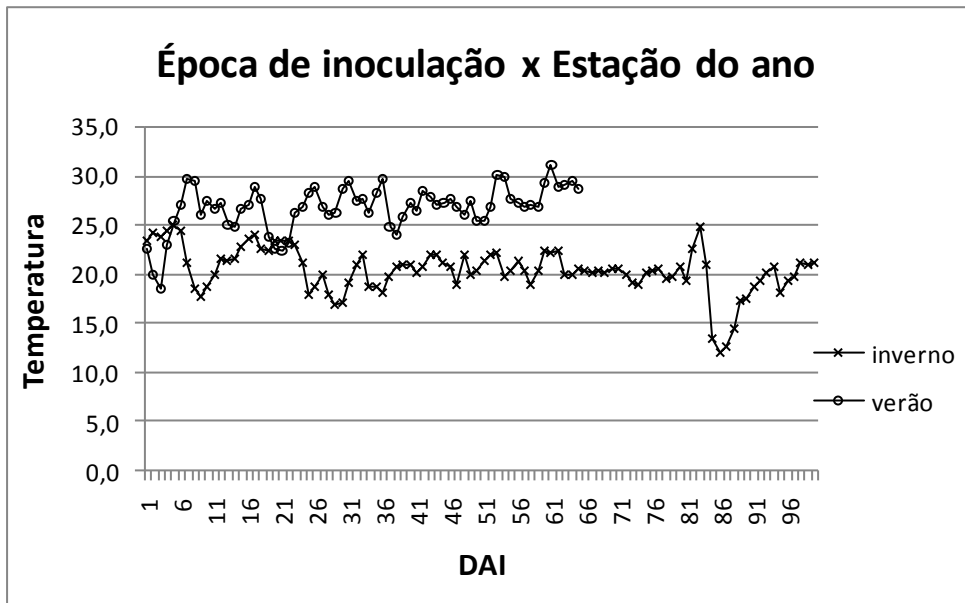
CUR - gás de cortina

GS1 - gás nebulizador

GS2 - gás de aquecimento

T (°C) - temperatura da fonte

Apêndice B- Influência da estação do ano no período de incubação da falsa melanose



Apêndice C - Evolução dos sintomas de mancha preta dos citros em fruto de laranja 'Valência' ao 0 (A), 15 (B), 30 (C), 45 (D) e 60 (E) dias e sintoma de macha dura com picnídios (F). Note que os sintomas de mancha dura apareceram em local diferente da falsa melanose

