

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

**Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros, em plantas daninhas**

**Guilherme Fernando Frare**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia**

**Piracicaba  
2011**

Guilherme Fernando Frare  
Biólogo

**Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros, em plantas daninhas**

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dra. **LILIAN AMORIM**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba  
2011**

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

Frare, Guilherme Fernando  
Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros,  
em plantas daninhas / Guilherme Fernando Frare. - - Piracicaba, 2011.  
71 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Frutas cítricas 2. Fungos fitopatogênicos 3. Plantas daninhas 4. Plantas hospedeiras  
5. Podridão - Doença de Planta I. Título

CDD 634.3  
F839s

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

A Deus, que tornou tudo isso possível

**OFEREÇO**





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

“À minha irmã, Vanessa Cristina Frare, pelo apoio incondicional nos momentos difíceis, pela amizade, confiança, por me incentivar em todos os momentos e por me mostrar a beleza da Fitopatologia”

“À Marcela Coelho, pelos bons momentos que passamos juntos, pelo carinho, pela ajuda nos experimentos e compreensão nos momentos difíceis”

**DEDICO**



## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao Prof. Dr. Marcel Bellato Spósito pelo apoio e confiança;

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

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia pela oportunidade de realização do curso;

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

À Profa. Dra. Simone da Costa Mello do Departamento de Produção Vegetal;

À Dra. Maisa Boff Ciampi pela amizade e ajuda na área molecular;

À Dra. Maria Heloisa Duarte de Moraes, pela amizade e convívio;

A todos os colegas da Pós Graduação da Fitopatologia;

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia Ana Raquel Soares, Caroline Rabello, Júlio Barbosa, Juliana Baggio, Renata Mesquini, em especial aos amigos Alécio Moreira, Antônio Fernandes, Fabrício Packer Gonçalves e Geraldo J. Silva Junior pela amizade e pela valiosa contribuição no meu trabalho;

Aos amigos Isabela Primiano e Timóteo Scheidt pela amizade e ajuda nos experimentos;

A Silvia de Afonseca Lourenço e seu marido Ortiz pela amizade e pelos bons momentos de descontração;

A Maria Cândida G. Gasparoto, pela amizade, apoio e incentivo;

Aos amigos Vitor R. dos Santos, Fernando (Biro), João e Alexandre Uehara pelas risadas e pelos bons momentos compartilhados;

Aos meus grandes amigos Diogo Pavan e Marcio Bortolotti, pelos bons momentos que passamos juntos;

Aos amigos Luis Montesino, Mateus Almeida, Julio Cesar, Sidnei Alkimin e Fabrício J. Jaciani pela companhia divertida e preocupações divididas;

Ao inesquecível amigo Fabrício (*in memoriam*) pelas ideias de uma vida inteira.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

***“Todos pensam em mudar a humanidade  
e ninguém pensa em mudar a si mesmo.”***

**Liev Tolstói**



## SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT .....	15
LISTA DE FIGURAS .....	17
LISTA DE TABELAS .....	19
1 INTRODUÇÃO .....	21
2 DESENVOLVIMENTO .....	23
2.1 A citricultura no Brasil.....	23
2.1.1 Histórico .....	23
2.1.2 Importância.....	24
2.2 <i>Colletotrichum acutatum</i> e a Podridão Floral dos Citros .....	25
2.2.1 Histórico .....	25
2.2.2 Etiologia.....	25
2.2.3 Sintomatologia.....	27
2.2.4 Ciclo das relações patógeno-hospedeiro .....	28
2.2.5 Controle.....	30
2.3 Plantas daninhas como hospedeiras de <i>Colletotrichum</i> spp .....	31
2.4 Material e Métodos .....	34
2.4.1 Obtenção e cultivo de plantas daninhas.....	34
2.4.2 Inoculação de <i>Colletotrichum acutatum</i> em folhas de plantas daninhas .....	35
2.4.3 Preparo da solução de extrato floral.....	38
2.4.4 Isolamento de <i>Colletotrichum acutatum</i> das folhas inoculadas .....	38
2.4.5 Testes de patogenicidade .....	39
2.4.6 Análise estatística .....	40
2.5 Resultados .....	41
2.5.1 Germinação de conídios de <i>Colletotrichum acutatum</i> em plantas daninhas .....	41
2.5.2 Isolamento de <i>Colletotrichum acutatum</i> das folhas inoculadas .....	44
2.5.3 Testes de patogenicidade .....	46
2.6 Discussão.....	49
3 CONCLUSÕES .....	55



REFERÊNCIAS .....	57
APÊNDICES .....	65

## RESUMO

### **Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros, em plantas daninhas**

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo e, embora o cultivo ocorra em todos os estados brasileiros, o Estado de São Paulo é o maior produtor, responsável por 80% da produção nacional. Dentre as doenças que podem limitar a produção dos citros encontra-se a podridão floral do citros (PFC), causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds. Os sintomas desta doença são caracterizados pela presença de lesões necróticas marrons ou alaranjadas nas pétalas e queda dos frutos recém formados, os cálices e os pedúnculos permanecem retidos nos ramos. Em citros, *C. acutatum* pode sobreviver aderido à superfície das folhas, na forma de apressório quiescente, por pelo menos um mês. As plantas daninhas podem atuar como hospedeiras alternativas de diversos patógenos, servindo como fontes de inóculo e desempenhando um importante papel na epidemiologia das doenças. O objetivo deste trabalho foi verificar se plantas daninhas, comuns em pomares de citros no Estado de São Paulo, podem servir como fonte de inóculo de *C. acutatum* para esta cultura. Sete espécies de plantas daninhas foram inoculadas com uma suspensão de conídios de *C. acutatum*, calibrada a  $10^5$  conídios/mL. Após a inoculação, estas foram mantidas em câmara úmida por 36 horas e, em seguida, amostras de todas as plantas foram coletadas e observadas em microscópio óptico para verificar a germinação dos conídios. Trinta, sessenta e noventa dias após as inoculações realizou-se o isolamento de *C. acutatum* das folhas inoculadas. Para isso, amostras de folhas de cada espécie de planta daninha foram coletadas, desinfestadas superficialmente e transferidas para placas de Petri, onde receberam 70 µL de extrato floral de citros sobre o local da inoculação, para estimular a germinação dos apressórios ali presentes. As folhas permaneceram incubadas por 24 horas a 23°C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, as áreas inoculadas das folhas foram cortadas e transferidas para placas de poliestireno contendo meio de Martin. Após o surgimento das primeiras colônias de *C. acutatum*, discos de quatro milímetros de diâmetro foram transferidos para meio BDA, para a obtenção de colônias puras. Em seguida foi realizado um teste de patogenicidade em flores de laranja doce de três anos de idade. Os dados de porcentagem de isolamento foram analisados análise de variância e testes não paramétricos. Foram observadas a germinação e a formação de apressórios de *C. acutatum* na superfície de todas as folhas inoculadas, após 36 horas de câmara úmida. Não houve diferença estatística na sobrevivência de *C. acutatum* ao longo dos 30, 60 e 90 dias e não foi observado nenhum tipo de sintoma nas folhas inoculadas. *C. acutatum* foi isolado de todas as plantas daninhas analisadas, embora o tempo de sobrevivência tenha variado em função da espécie de daninha. Todos os isolados obtidos das plantas daninhas apresentaram sintomas típicos de PFC em todas as flores inoculadas. Os resultados obtidos demonstraram que as plantas daninhas avaliadas podem servir como hospedeiras alternativas de *C. acutatum*, resultando em fonte de inóculo primário e secundário deste patógeno para a cultura do citros.

Palavras-chave: Hospedeiros alternativos; Fungo; Citros; Isolamento



## ABSTRACT

### **Survival of *Colletotrichum acutatum*, the causal agent of postbloom fruit drop, on weeds**

Brazil is the major orange producer in the world, and although the cropping occurs all over the Brazilian States, the São Paulo State is the major producer, responsible for 80% of the national production. Postbloom fruit drop (PFD), caused by the fungus *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds is an important disease that can cause yield reduction. The symptoms of this disease are characterized by the presence of brown or orange necrotic lesions in the petals and the drop of young fruits; the calyces and peduncles remain in the branches after fruit drop. In citrus, *C. acutatum* can adhere to the surface of the leaves, in the form of quiescent appressoria, for at least one month. The weeds can act as alternative hosts of diverse pathogens, serving as inoculum sources and playing an important role in the disease epidemiology. The purpose of this research was to verify if weeds, common in citrus orchards in São Paulo State, may serve as inoculum source of *C. acutatum* for this crop. Seven weed species were inoculated with a conidial suspension of *C. acutatum*, calibrated with  $10^5$  conidia/mL. After the inoculation, the weeds were kept in humidity chamber for 36 hours. Samples of all weeds were collected and observed in optical microscope to verify the conidia germination. Thirty, sixty and ninety days after inoculation, *C. acutatum* was isolated from the inoculated leaves. For this purpose, leaves of each weed species were collected, superficially disinfested and transferred to Petri dishes. The leaves received 70  $\mu$ L of citrus flower extract over the inoculation area to stimulate the appressoria germination. The leaves were incubated for 24 hours at 23°C, with 12 hours of photoperiod. After this period, the inoculated areas were cut and transferred to polystyrene dishes with Martin medium. After the appearance of the first colonies of *C. acutatum*, discs of four millimeters of diameter were transferred to PDA medium to obtain pure colonies. A pathogenicity test was carried out in three years old sweet orange flowers. The percentage of pathogen isolation was analyzed by variance analysis or non-parametric analysis. Conidia germination and appressoria formation of *C. acutatum* in all inoculated leaves were observed, after 36 hours of humidity chamber. There was no statistical difference in the *C. acutatum* survival during 30, 60 e 90 days and no type of symptom was observed in the inoculated leaves. *C. acutatum* was isolated from every weed analyzed, although the survival period varied among the weed species. Every isolated obtained from the weeds presented typical PFD symptoms in every inoculated flowers. The results showed that weeds can serve as alternative hosts of *C. acutatum*, contributing in primary and secondary inoculum source of this pathogen to the citrus crop.

Keywords: Alternative host; Fungus; Citrus; Isolation



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Plantas daninhas em fase de germinação, mantidas em câmaras de crescimento Conviron<sup>®</sup> sob ambiente controlado, com temperatura constante de 27°C e fotoperíodo de 12 h..... 35
- Figura 2 - Isolado de *Colletotrichum acutatum* repicado em meio de cultura BDA contendo discos de papel de filtro estéril (A); meio de cultura BDA após a remoção dos discos (B); tubos tipo Eppendorf<sup>®</sup> contendo os discos de papel de filtro com *C. acutatum* e sílica, para preservação (C) ..... 36
- Figura 3 - Inoculação de *Colletotrichum acutatum* em plantas daninhas: (A) parte aérea das plantas de *Brachiaria decumbens* fixadas em isopor; (B) desinfestação superficial das folhas de *Panicum maximum* com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 0,5%; (C) áreas do limbo foliar de *Panicum maximum* marcadas e inoculadas com 50 µL da suspensão de conídios; (D) folhas de *Commelina benghalensis* marcadas e inoculadas, sem a necessidade de fixação em isopor; (E) câmara úmida aplicada às folhas inoculadas e (F) plantas daninhas mantidas em casa de vegetação após inoculação ..... 38
- Figura 4 - Metodologia para isolamento de *Colletotrichum acutatum* de plantas daninhas: (A) desinfestação superficial das folhas; (B) adição de 70 µL de extrato floral de citros sobre as áreas demarcadas; onde realizou-se a inoculação; (C) fragmentos de folha transferidas para meio de cultura semi-seletivo; (D) colônia de *C. acutatum* em meio de Martin; (E) transferência das colônias para meio de cultura BDA e (F) colônias puras. .... 40

Figura 5 - Formação de apressórios (Ap) de *Colletotrichum acutatum* na superfície das folhas de plantas daninhas: (A) *Digitaria insularis*, (B) *Brachiaria plantaginea*, (C) *Cenchrus echinatus*, (D) *Brachiaria decumbens*, (E) *Panicum maximum*, (F) *Bidens pilosa* e (G) *Commelina benghalensis*. Imagens obtidas de microscópio óptico no aumento de 400 x após coloração das folhas inoculadas com safranina. ....41

Figura 6 - Flores de citros com sintomas de podridão floral após inoculação com *Colletotrichum acutatum* isolados no primeiro experimento das diferentes plantas daninhas e após diferentes meses de incubação: *C. acutatum* isolado de *Commelina benghalensis* após 1 (A), 2 (B) e 3 (C) meses; *C. acutatum* isolado de *Panicum maximum* após 1 (D), 2 (E) e 3 (F) meses; *C. acutatum* isolado de *Brachiaria decumbens* após 1 (G), 2 (H) e 3 (I) meses; *C. acutatum* isolado de *Cenchrus echinatus* após 1 (J) e 2 (K) meses; *C. acutatum* isolado de *Brachiaria plantaginea* após 1 (L) e 2 (M) meses; *C. acutatum* isolado de *Digitaria insularis* após 1 mês (N); *C. acutatum* isolado de *Bidens pilosa* após 1 mês (O) .....47

Figura 7 - Flores de citros com sintomas de podridão floral após inoculação com *Colletotrichum acutatum* isolados no segundo experimento das diferentes plantas daninhas e após diferentes meses de incubação: *C. acutatum* isolado de *Brachiaria decumbens* após 1 (A), 2 (B) e 3 (C) meses; *C. acutatum* isolado de *Digitaria insularis* após 1 (D) e 2 (E) meses; *C. acutatum* isolado de *Cenchrus echinatus* após 1 (F) e 2 (G) meses; *C. acutatum* isolado de *Panicum maximum* após 1 (H) e 2 (I) meses; *C. acutatum* isolado de *Brachiaria plantaginea* após 1 (J) e 2 (K) meses; *C. acutatum* isolado de *Bidens pilosa* após 1 (L) e 2 (M) meses; *C. acutatum* isolado de *Commelina benghalensis* após 1 (N) e 2 (O) meses .....48

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Germinação de conídios (%) de *Colletotrichum acutatum* em placas de poliestireno e na superfície das folhas de diferentes plantas daninhas, 36 h após a inoculação, observada nos dois experimentos e cálculo da porcentagem de redução da germinação nas placas em relação às folhas inoculadas..... 42
- Tabela 2 - Formação de apressórios (%) de *Colletotrichum acutatum* em placas de poliestireno e na superfície das folhas de diferentes plantas daninhas, 36 h após a inoculação, observada nos dois experimentos e cálculo da porcentagem de redução da germinação nas placas em relação às folhas inoculadas..... 43
- Tabela 3 - Isolamento de *Colletotrichum acutatum* de folhas de plantas daninhas aos um, dois e três meses após a inoculação..... 45
- Tabela 4 - Porcentagem média de isolamento de *Colletotrichum acutatum*, nas diferentes espécies de plantas daninhas, nos três períodos de avaliação ..... 46





## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo e grande parte da sua produção destina-se à indústria de suco concentrado. Em 2009 o Brasil exportou aproximadamente 2,9 milhões de toneladas de suco de laranja concentrado, com um faturamento de 14,6 bilhões de dólares (NEVES et al., 2010). Embora o cultivo ocorra em todos os estados brasileiros, o Estado de São Paulo é responsável por 80% da produção nacional (FNP, 2011). As regiões Norte e Nordeste do Estado contribuem com aproximadamente 65% da produção de laranja.

Nos últimos anos a citricultura paulista sofreu intensa migração dessas regiões produtoras para novas áreas ao sudoeste do estado. Esse deslocamento foi motivado não só pelas condições climáticas favoráveis, que dispensam a irrigação, como também pelo baixo valor das terras e menor incidência de doenças que interferem na citricultura, tais como a morte súbita dos citros, a clorose variegada dos citros e o “huanglongbing” (NEVES et al., 2010). Entretanto, as chuvas periódicas, associadas à alta umidade relativa do ar que se estende durante a florada da cultura na região Sudoeste, favorecem a ocorrência da podridão floral dos citros (PFC). Esta doença é de ocorrência esporádica nas demais regiões produtoras de citros do Estado de São Paulo, mas quando as chuvas coincidem com o período de floração, os danos podem chegar a 70% (TIMMER; ZITKO, 1993).

A PFC foi observada pela primeira vez em Belize, em 1956/1957, porém os sintomas e a etiologia da doença só foram descritos na década de 1970 por Fagan (1979), que relatou o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc como seu agente causal. No Brasil, a doença foi observada na década de 70, causando significativas perdas nos pomares do Rio Grande do Sul (PORTO; ROSSETTI; DORNELLES, 1979) e no Estado de São Paulo, onde causou sério prejuízo na safra de 1977/1978 (FEICHTENBERGER, 1991). Na década de 1990 Brown, Sreenivasaprasad e Timmer (1996) reclassificaram o agente causal da PFC e atribuíram a causa da doença ao fungo *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds.

A doença ocorre nas flores dos citros e os sintomas se caracterizam pela presença de lesões necróticas marrons ou alaranjadas nas pétalas, formação de acérvulos contendo conídios envolvidos por mucilagem em condições favoráveis e

queda dos frutos recém formados, deixando os cálices e os pedúnculos retidos nos ramos (AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992). As folhas ao redor das flores infectadas são, eventualmente, pequenas e deformadas (FUTCH; HEBB; SONODA, 1989; TIMMER et al., 1994).

*Colletotrichum acutatum* pode sobreviver entre as floradas aderido à superfície das folhas de citros na forma de apressório (AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992 e ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996). Na presença de extrato floral, o apressório germina, produzindo hifas e conídios sem a formação de acérvulo (TIMMER et al., 1994). O tempo de sobrevivência de *C. acutatum* na forma de apressório e os processos de formação dos conídios secundários ainda não são bem compreendidos. Agostini e Timmer (1994) e Zulfiqar, Brlansky e Timmer (1996), em condições controladas, observaram a sobrevivência do patógeno na forma de apressórios aderidos às folhas de citros por até 30 dias. Em morango, Leandro et al. (2003) relataram com detalhes a sobrevivência de *C. acutatum* na forma de apressórios aderidos as folhas e o processo de conidiação secundária, o qual foi responsável pelo aumento do número de conídios na superfície das folhas. Também foi relatada a sobrevivência *C. acutatum*, agente causal da antracnose do morango, em outras espécies vegetais como tomate, pimenta, berinjela e até em plantas daninhas do gênero *Vicia* e *Conyza* (FREEMAN; HOROWITZ; SHARON, 2001).

Diversos trabalhos já relataram a sobrevivência de espécies de *Colletotrichum*, agente causal de antracnoses, em plantas daninhas (HARTMAN; MANANDHAR; SINCLAIR, 1986; RAID; PENNYPACKER, 1987; BERRIE; BURGESS, 2003; MILÉO et al., 2007; PARIKKA; LEMMETTY, 2009;) porém, ainda não se sabe a importância das plantas daninhas como fonte de inóculo de *C. acutatum* para a cultura dos citros. O presente trabalho teve como objetivo verificar se plantas daninhas, que são comuns em pomares de citros no Estado de São Paulo, podem ser fonte de inóculo de *C. acutatum* para esta cultura.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 A citricultura no Brasil**

#### **2.1.1 Histórico**

Provavelmente a laranja é originária da China. Seu cultivo foi expandido principalmente devido à comercialização entre as nações, chegando à Europa na Idade Média (NEVES et al., 2010).

No ano de 1501 chegavam ao Brasil as primeiras plantas cítricas. Trazidas da Espanha pelos portugueses, com o objetivo de se combater o escorbuto, que dizimava grande parte das tripulações naquela época, as plantas se adaptaram tão bem que foram confundidas com árvores nativas (NEVES et al., 2007).

Em 1889 a citricultura se estabeleceu na região Centro-Sul do País, principalmente devido às condições edafoclimáticas e à proximidade do mercado consumidor. Em 1932 a área citrícola do Rio de Janeiro já era responsável pela exportação de 1,3 milhões de caixas de laranja, superando a de São Paulo, que nesta época exportava apenas 700 mil caixas. Porém, devido à baixa resistência da fruta carioca ao transporte, as empresas exportadoras, que atuavam no Rio de Janeiro, se transferiram para a cidade de Limeira, no Estado de São Paulo (NEVES et al., 2007).

No ano de 1937 foram identificados os primeiros casos de “tristeza”, doença que seria responsável pela eliminação de todas as plantas enxertadas em laranja-azeda no Estado de São Paulo - cerca de 10 milhões de árvores. Em 1957 outra doença surgiu para ameaçar a citricultura paulista: o cancro cítrico (NEVES et al., 2007). Sanados ou minimizados os problemas decorrentes da tristeza, através da mudança de porta-enxerto, e do cancro cítrico, com a erradicação das árvores afetadas, a citricultura voltou a expandir-se.

Em 1963, com a expansão da citricultura para a região de Araraquara, foi instalada a primeira fábrica de suco concentrado e congelado do país. Esta fábrica exportou, já em seu primeiro ano de funcionamento, seis mil toneladas de suco (NEVES et al., 2007).

Em 1977 e 1978 a doença conhecida como podridão floral dos citros (PFC), causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, causou sérios prejuízos (FEICHTENBERGER, 1991), porém, dez anos depois, os produtores paulistas comemoraram a produção de mais de 200 milhões de caixas e em 1997 alcançaram outro recorde, a produção de 428 milhões de caixas (NEVES et al., 2007).

Atualmente, apesar das novas doenças que atingiram a citricultura no Estado de São Paulo como a clorose variegada dos citros, a morte súbita dos citros e o huanglongbing, a produção paulista manteve-se elevada, ao redor de 350 milhões de caixas.

### **2.1.2 Importância**

No Brasil a citricultura é considerada um dos setores mais competitivos e com potencial de crescimento do agronegócio (NEVES et al., 2007). Desde quando começaram as primeiras exportações, a citricultura tem contribuído de forma significativa para o desenvolvimento do País (NEVES et al., 2010), porém, no Estado de São Paulo, a área plantada com laranja vem sofrendo reduções consecutivas e perdendo espaço para o cultivo da cana-de-açúcar (CONAB, 2011). Na década passada foram erradicadas 40 milhões de árvores devido à presença de pragas e doenças, responsáveis por perdas de quase 80 milhões de caixas por ano (NEVES et al., 2010).

O Brasil é responsável por 50% da produção mundial de suco de laranja e exporta 98% do que produz (NEVES et al., 2010). O Estado de São Paulo, maior produtor nacional, possui uma área de 580.574 ha ocupada com pomares de laranja (535.011 ha em produção), com um total de 219.088.794 de árvores e uma produtividade média de 705 caixas/ha, segundo estimativas da Conab (2011). Para a safra 2011/2012 espera-se uma produção de 377.064.567 caixas de 40,8 kg, destas, 324.275.527 serão destinadas à indústria e 52.789.039 serão destinadas à mesa (CONAB, 2011).

Devido à erradicação de pomares improdutivos, houve uma diminuição de 6,38% na área plantada com citros no Estado de São Paulo em relação à safra anterior,

porém, a produtividade média por árvore teve um aumento de 12,94%, com previsão de passar de 1,7 caixa de 40,8 kg/árvore na safra 2010/2011 para 1,92 caixa/árvore na safra 2011/2012. Este aumento de produtividade foi o resultado do clima favorável para o florescimento e inadequado para o desenvolvimento de doenças (CONAB, 2011).

Embora o aumento de produtividade por árvore nesta safra esteja estimado em 12,94%, espera-se um aumento de produção de 18,38%, principalmente devido à redução nas perdas (CONAB, 2011).

## **2.2 *Colletotrichum acutatum* e a Podridão Floral dos Citros**

### **2.2.1 Histórico**

Os primeiros sintomas de PFC foram observados em Belize, em 1956/1957, mas só foram relatados no final da década de 1970 por Fagan (1979), quando o mesmo descreveu sobre a presença de flores com pequenas manchas marrons nas pétalas e um grande número de cálices sem frutos. A doença também foi relatada na Argentina (SCHWARZ; KLEIN; MONSTED, 1978), na República Dominicana, na Colômbia, no Panamá (DENHAM, 1979), em Trindade (FAGAN, 1984), no México (OROZCO SANTOS; GONZALEZ GARZA, 1986), nos Estados Unidos (MCMILLAN; TIMMER, 1989), na Costa Rica e na Jamaica, sendo restrita ao continente americano (TIMMER et al., 1994). No Brasil, a doença foi relatada no Rio Grande do Sul, na década de 70 por Porto, Rossetti e Dornelles (1979). No Estado de São Paulo, a doença causou sérios prejuízos nas safras de 1977/1978, 1990/1991 (FEICHTENBERGER, 1991), 1996 e 1998 (PERES; SOUZA; TIMMER, 2000) e 2009 (SILVA JÚNIOR, 2011) devido à ocorrência de chuvas prolongadas coincidindo com o período de floração das plantas.

### **2.2.2 Etiologia**

A causa da PFC foi originalmente atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (FAGAN, 1979), porém, em estudos comparativos com isolados de *C.*

*gloeosporioides* que causavam antracnose em plantas cítricas, observou-se então a existência de isolados patogênicos e não patogênicos. Foram identificadas três estirpes de *C. gloeosporioides* diferentes em relação à morfologia, coloração da colônia, velocidade de crescimento em meio de cultura e patogenicidade (AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992).

A primeira estirpe foi a FGG (“fast-growing gray”), que possui rápido crescimento micelial em meio de cultura, forma colônia de coloração acinzentada, com temperatura ótima de crescimento a 31°C, apresenta conídios largos, arredondados no ápice e na base, apressórios lobulados e abundante produção de setas, além de ser comumente encontrada na forma saprofítica, causando doenças de pós-colheita e incapaz de causar PFC. A segunda foi a SGO (“slow-growing orange”), de crescimento lento em meio de cultura, com colônia de coloração branca e massa de conídios com coloração alaranjada, com temperatura ótima de crescimento entre 23-27°C, com conídios pequenos com ápice fusiforme, distintos daqueles da estirpe FGG e capaz de causar a podridão floral dos citros. A terceira foi a KLA (“key lime anthracnose”), de características semelhantes às da estirpe SGO, também capaz de causar PFC e ainda responsável pela antracnose do limão galego (AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992).

Com o intuito de isolar o patógeno causador da PFC e diferenciá-lo da estirpe FGG, Agostini e Timmer (1992) desenvolveram um meio de cultura semi-seletivo, acrescentando streptomina e hidróxido de cobre ao meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e utilizando um período de incubação de 4 dias a 18°C e mais um dia a 27°C. Com essas temperaturas foi observada uma maior produção de conídios de coloração alaranjada da estirpe SGO, facilitando a separação das estirpes. Na década de 90, com os avanços da engenharia genética, Brown, Sreenivasaprasad e Timmer (1996) amplificaram as regiões ITS1 do DNA ribossomal das estirpes FGG, SGO e KLA. Através da PCR, com os primers específicos Calnt2 para *Colletotrichum acutatum* e Cglnt para *Colletotrichum gloeosporioides*, as estirpes SGO e KLA foram reclassificadas como *C. acutatum* e a estirpe FGG como *C. gloeosporioides*. Recentemente, Peres et al. (2008), através da utilização de marcadores moleculares, verificaram que as populações de *C. acutatum* isoladas de limão galego e de flores de laranja doce com sintoma de PFC são filogeneticamente distintas.

Um levantamento da incidência de PFC no Estado de São Paulo identificou o patógeno *C. gloeosporioides* causando os mesmos sintomas de PFC. Utilizando primers específicos, Lima et al. (2011) detectou o fungo em 17,3% das 139 amostras coletadas. Todos os isolados de *C. gloeosporioides* foram patogênicos e causaram sintomas de PFC em flores de laranja Valência. A partir desses resultados os autores descreveram o *C. gloeosporioides* como novo agente causal da PFC.

### 2.2.3 Sintomatologia

No Brasil todas as variedades de laranjas doces são afetadas pela doença, sendo as variedades Pêra, Natal e Valência as mais suscetíveis (FEICHTENBERGER, 1991). O sintoma da doença caracteriza-se pela presença de lesões necróticas nas pétalas, sobre as quais o fungo produz acérvulos de coloração alaranjada. Em condições favoráveis essas lesões se desenvolvem rapidamente, comprometendo todo o tecido da pétala (FAGAN, 1979; TIMMER et al., 1994; FEICHTENBERGER et al., 2005). Em condições controladas, flores de tangor Temple Orange (*Citrus reticulata* x *C. sinensis*), quando inoculadas com *C. acutatum*, além de mostrar lesões necróticas nas pétalas também apresentam necrose no pistilo (LIN et al., 2001).

Outro sintoma típico da doença é a queda dos frutos recém formados, deixando os cálices e os pedúnculos retidos nos ramos, formando estruturas que recebem o nome de “estrelinhas” (TIMMER et al., 1994; FEICHTENBERGER, 1991). Os cálices podem permanecer fixados aos ramos por até 18 meses (FUTCH; HEBB; SONODA, 1989; TIMMER et al., 1994). Frequentemente o sintoma de cálice retido é utilizado para confirmar a presença da doença e até quantificá-la, embora não esteja claro se esse sintoma é exclusivo de PFC (LIMA et al., 2011).

As folhas ao redor da inflorescência doente as vezes são pequenas e deformadas, com nervuras grossas, dando aos ramos aparência de roseta (FUTCH; HEBB; SONODA, 1989; AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992; TIMMER et al., 1994). A queda prematura dos frutos, a produção de cálices persistentes e as folhas distorcidas têm sido atribuídas a um desequilíbrio hormonal devido à acentuada expressão dos genes responsáveis pela regulação e biossíntese de hormônios na



planta (CHUNG et al., 2002; LAHEY et al., 2004). Os genes que codificam o etileno, a biossíntese de ácido jasmônico e o ácido indolacético (AIA) são altamente expressos nas flores infectadas, ocorrendo acúmulo dos hormônios AIA e etileno nas mesmas (CHUNG et al., 2002; LAHEY et al., 2004).

#### **2.2.4 Ciclo das relações patógeno-hospedeiro**

Em citros, *C. acutatum* sobrevive entre as floradas na superfície das folhas, na forma de apressório quiescente (AGOSTINI; TIMMER, 1994; ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996). Entretanto, o tempo de sobrevivência do apressório é desconhecido. Em condições controladas, Agostini e Timmer (1994) inocularam folhas de citros com *C. acutatum* e, após utilizar uma técnica de clareamento foliar, observaram 30% de conídios formando apressórios após um mês da inoculação. A sobrevivência desses apressórios foi investigada, em meio de cultura semi-seletivo, através da assepsia e plaqueamento de pedaços de folhas de citros inoculados. Como resultado os autores obtiveram 20% de colônias isoladas e estabeleceram que o fungo pode sobreviver pelo menos um mês na forma de apressório. Resultado semelhante foi obtido por Zulfiqar, Brlansky e Timmer (1996), que obtiveram uma taxa sobrevivência de 30% dos apressórios após um mês da inoculação. Porém, ainda não está esclarecido se essa forma de sobrevivência é eficiente para manter o patógeno viável no período entre as floradas.

Em experimento conduzido em pomares naturalmente infectados, Agostini e Timmer (1994) relataram que, mesmo na época da florada, quando o patógeno está presente nas flores, a população do fungo nas folhas e cálices persistentes é baixa e tende a declinar após a florada. Esses autores ainda relataram que, na presença de extrato floral, os apressórios aderidos às folhas são estimulados a produzir novos conídios, que são denominados conídios secundários. Timmer e Brown (2000) consideram que esses conídios secundários são responsáveis pelo inóculo inicial da PFC. A sobrevivência de *C. acutatum* na forma de apressório também foi relatada por Leandro et al., (2001) em folhas de morango. Neste trabalho os autores descreveram que o fungo foi capaz de formar apressório após nove horas da inoculação e que o

processo de conidiação secundária foi responsável pelo aumento do número de conídios após sete dias da inoculação.

Além das folhas, o solo também tem importância como fonte de inóculo de *C. acutatum*. Eastburn e Gubler (1990) coletaram amostras de solos de viveiros e de plantações de morangos com histórico de antracnose e, por isolamento em meio de cultura semi-seletivo, detectaram o patógeno por um período de até oito meses. Freeman, Shalev e Katan (2002), trabalhando com inoculações artificiais de *C. acutatum*, concluíram que frutos de morango mumificados também podem servir como fonte de inóculo. Os autores relataram que propágulos do patógeno podem permanecer viáveis, por até cinco meses, em frutos mumificados e enterrados em solo a 10 ou 20 cm de profundidade. Esses resultados são importantes uma vez que, na cultura do morango, os diferentes órgãos da cultura estão bem próximos do solo.

Dentre os fatores ambientais, a umidade é a mais importante para germinação dos conídios e formação de apressórios. Testes “in vitro” realizados com *C. acutatum* causador da PFC revelaram que no intervalo de 6 a 72 horas de molhamento maior a germinação dos conídios e formação de apressórios. O intervalo de temperatura ótima para a germinação e formação de apressório é de 22 a 24 °C (LIMA et al., 2011). Estudos realizados com o patossistema *Colletotrichum*-morango verificaram que as temperaturas ótimas para a germinação dos conídios estavam no intervalo de 23 a 27°C; para a formação de apressório de 17,6 a 26,5°C e para a produção de conídios secundários de 21,3 a 32,7°C, com um período de molhamento superior a quatro horas (LEANDRO et al., 2003).

Em condições de molhamento prolongado e presença de nutrientes encontrados em pétalas, o apressório que se encontra na superfície da folha germina e emite uma hifa sobre a cutícula, dando origem aos conídios secundários sem a formação de acérvulo. Com o surgimento de novas flores, esses conídios são dispersos por respingos de água e atingem as pétalas, onde penetram diretamente sem a formação de apressório, formando lesões alaranjadas após três a quatro dias. Em seguida, os conídios de *C. acutatum* são produzidos em abundância nos acérvulos, onde são disseminados principalmente por chuvas associadas com ventos (TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996).

A disseminação da doença é fortemente dependente do regime de chuvas, pois quanto mais distribuídas durante a floração, maior será a incidência da doença (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997). A dispersão de *C. acutatum* em citros foi estudada por Agostini, Gottwald e Timmer (1993) em pequenas parcelas de 25, 49, 81 e 72 plantas, onde a árvore central foi inoculada e a incidência e dispersão da doença foram avaliadas através do tempo nas demais árvores. Estes autores observaram que houve um aumento na incidência da doença nas árvores ao redor do foco principal, após períodos de chuvas; que a dispersão ocorreu na direção do vento prevalente e que houve o surgimento de foco secundário. Para esses autores, a formação de foco secundário indica que fatores como vento ou insetos podem estar contribuindo para a disseminação de *C. acutatum*. Silva Junior (2011) estudou, em condições de campo, a dinâmica temporal e espacial de *C. acutatum* em parcelas de 500 plantas no interior de pomares comerciais e demonstrou um padrão aleatório de distribuição da PFC no início da epidemia, sugerindo a participação de outros agentes além da chuva na dispersão do patógeno.

### **2.2.5 Controle**

Como a PFC somente é severa quando o florescimento das plantas coincide com períodos de chuvas prolongados (FEICHTENBERGER, 1994; GOES et al., 2008), todas as práticas que contribuem para antecipar o florescimento para os períodos mais secos do ano como irrigação e utilização de porta-enxertos que induzem o florescimento precoce, devem ser adotadas (FEICHTENBERGER, 1994). O controle químico tem sido a opção mais utilizada para o controle da doença (GALLI et al., 2002; GOES et al., 2008). As pulverizações com fungicidas devem visar à proteção das flores durante o período em que são suscetíveis, ou seja, antes dos botões florais em expansão atingirem o estágio fenológico denominado de "cotonete". O número de aplicações pode variar em função das condições climáticas e da uniformidade e duração do período de florescimento (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997).

Os primeiros produtos utilizados com eficiência no controle da doença foram o benomyl, o thiabendazole e o captafol (DENHAM; WALLER, 1981). Roberto e Borges

(2001) avaliaram o efeito do fungicida benomyl em flores de laranja “Pera” e “Natal” em diferentes estágios de desenvolvimento, e relataram sua eficiência no controle da PFC em doses de 0,5-0,75 g.L<sup>-1</sup> nos estádios de botões redondos brancos até “cotonetes”. Com a proibição do uso desses fungicidas, houve a necessidade de se encontrar outros produtos que apresentassem resultados satisfatórios (PORTO, 1993). Goes et al. (2008) avaliaram o efeito de fungicidas puros ou em mistura em diferentes estádios de florescimento e verificaram que o carbendazim e o folpet apresentaram os melhores resultados quanto a redução de flores sintomáticas e aumento no número de frutos fixados. O difenoconazole e o mancozeb não foram tão eficientes na redução da doença, mas quando o mancozeb foi combinado com carbendazim ou folpet verificou-se um aumento no controle da PFC. Também foi observado que uma única aplicação em flor aberta não controla a doença, indicando que o fungicida deve ser aplicado antes, nas fases “cabeça-de-fósforo” e “cotonete”.

Atualmente os fungicidas registrados para o controle de *C. acutatum* no Brasil são carbendazim (benzimidazol) e sulfato tribásico de cobre e as misturas tebuconazol (triazol) + trifloxstrobina (estrobilurina) e famoxadona (oxazolidinadiona) + mancozebe (ditiocarbamato) (BRASIL, 2011). O manejo da doença por meio de aplicação de fungicidas não é fácil, pois em anos secos, as aplicações de fungicidas podem ser desnecessárias e em anos muito chuvosos, as aplicações têm que ser realizadas em curto espaço de tempo.

### **2.3 Plantas daninhas como hospedeiras de *Colletotrichum* spp.**

Pitelli (1985) conceitua as plantas daninhas como aquelas que, espontaneamente, emergem nos ecossistemas agrícolas podendo interferir não só na produtividade das plantas cultivadas, mas também na operacionalização do sistema de produção empregado. Essas plantas têm algumas características peculiares como a capacidade de produzir grande número de sementes, apresentarem dormência e germinação desuniforme.

As principais plantas daninhas encontradas nos pomares de citros segundo Durigan (1988) e Victoria Filho (1998) são, dentre as monocotiledôneas: capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitch), capim-colchão (*Digitaria horizontalis* Wild), capim-carrapicho (*Cenchrus echinatus* L.), capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.), grama-seda (*Cynodon dactylon* (L.) Pres.), capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.), capim-favorito (*Rhynchelytrum repens* (Wild.) C.E. Hubb), capim-amargoso (*Digitaria insularis* (L.), grama-batatais (*Paspalum notatum* Flugge.), capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.), capim rabo-de-raposa (*Setaria geniculata* P. Beauv), braquiária humidicola (*Brachiaria humidicola* (Rend.) Schweich), braquiária brizantha (*Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex. A. Rich) Stapf), tiririca (*Cyperus rotundus* L.), trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.). Já dentre as dicotiledôneas, destacam-se: picão-preto (*Bidens pilosa* L.), carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidum* DC.), guanxumas (*Sida* spp.), caruru (*Amaranthus* spp.), falsa-serralha (*Emilia sonchifolia* DC.), mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), picão-branco (*Galinsoga parviflora* Cav.), corda-de-viola (*Ipomea* spp.), beldroega (*Portulaca oleracea* L.), buva (*Conyza bonariensis* L. Cronquist), poaia-branca (*Richardia brasiliensis* L.) e serralha (*Sonchus oleraceae* L.).

A competição é, sem dúvida, a forma mais conhecida de interferência direta das plantas daninhas nas culturas agrícolas, porém, estas também servem como hospedeiras de algumas pragas e doenças (CHIAVEGATO, 1986). Segundo Chaves et al. (2003), as plantas daninhas podem atuar como hospedeiras secundárias de fitopatógenos, servindo com fontes de inóculo e desempenhando um importante papel na epidemiologia das doenças.

Vários trabalhos demonstram a importância das plantas daninhas como hospedeiras alternativas e fonte de inóculo de *Colletotrichum* spp.. Raid e Pennypacker (1987), trabalhando com *Colletotrichum coccodes* causador da antracnose em tomateiro, concluíram que algumas espécies de plantas daninhas servem como fonte de inóculo secundário durante o cultivo e como fonte de inóculo primário entre cultivos de tomate. Os autores constataram que o fungo infectou plantas daninhas de diferentes famílias e que a eficiência na infecção aumentou com a

senescência das plantas. Observaram também que a maioria das plantas infectadas não apresenta sintomas.

Miléo et al. (2007), também observaram a importância das plantas daninhas como fontes de inóculo fúngico. Nas seis áreas cultivadas com guaranazeiro analisadas pelos autores, foram identificadas 47 espécies de plantas daninhas e realizado o isolamento de 1009 isolados fúngicos. Dentre os isolados estava o fungo *Colletotrichum guaranicola*, agente causal da antracnose do guaranazeiro, presente em 11 espécies de plantas daninhas.

Berrie e Burgess (2003) e Parikka e Lemmetty (2009) inocularam diversas espécies de plantas daninhas comumente encontradas em plantações de morangos com *C. acutatum* e concluíram que todas atuavam como hospedeiras e, além disso, serviam como fonte de inóculo primário para o surgimento da antracnose em morango. Freeman, Horowitz e Sharon (2001) isolaram *C. acutatum* de plantas daninhas assintomáticas e estes isolados causaram sintomas de antracnose em plantas de morango. Os resultados obtidos por esses autores sugerem que as plantas daninhas hospedeiras de *C. acutatum* podem servir como fontes de inóculo e permitir a sobrevivência do fungo entre as safras de morango.

Hartman, Manandhar e Sinclair (1986) relatam a ocorrência de *Colletotrichum* spp. em plantas daninhas coletadas de campos de produção de soja e milho. Alguns isolados de *C. truncatum* obtidos de plantas daninhas foram tão patogênicos em plântulas de soja quanto os isolados obtidos da soja. Os autores concluíram que a alta incidência de *Colletotrichum* spp. nas folhas de soja e plantas daninhas sugere que o patógeno está presente desde cedo no campo de produção. Assim como Raid e Pennypacker (1987), Parikka e Lemmetty (2009), Berrie e Burgess (2003) e Hartman, Manandhar e Sinclair (1986) relataram a maior facilidade do fungo em colonizar folhas senescentes e sua presença em plantas daninhas sem sintomas da doença.

Para a cultura do citros, ainda não há trabalhos demonstrando o papel das plantas daninhas como hospedeiras de *C. acutatum*.

## 2.4 Material e métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Epidemiologia e em casas de vegetação dos Departamentos de Fitopatologia e Nematologia e de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP.

### 2.4.1 Obtenção e cultivo de plantas daninhas

Sementes das espécies de plantas daninhas *Digitaria insularis* (capim-amargoso), *Bidens pilosa* (picão-preto), *Brachiaria plantaginea* (capim marmelada), *Commelina benghalensis* (trapoeraba), *Cenchrus echinatus* (capim carrapicho), *Brachiaria decumbens* (braquiaria) e *Panicum maximum* (capim colônia) foram obtidas na empresa Sementes AgroCosmos. Em seguida, para a obtenção de 25 plantas germinadas, foram pesadas 0,10 gramas de sementes de *Digitaria insularis*, 0,18 gramas de *Panicum maximum*, 0,32 gramas de *Bidens pilosa*, 0,50 gramas de *Brachiaria plantaginea*, 2,84 gramas de *Brachiaria decumbens*, 4,00 gramas de *Cenchrus echinatus* e 5,00 gramas de *Commelina benghalensis*. As sementes foram semeadas em vasos de 5 L contendo uma mistura de terra argilosa, matéria orgânica e areia, na proporção de 2:2:1. Esta mistura foi previamente esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos a 1 atm. Os vasos foram mantidos em câmaras de crescimento Conviron<sup>®</sup>, com fotoperíodo de 12 h a temperatura constante de 27°C, e irrigadas diariamente com 100 mL de água por vaso (Figura 1).



Figura 1 – Plantas daninhas em fase de germinação, mantidas em câmaras de crescimento Conviron® sob ambiente controlado, com temperatura constante de 27°C e fotoperíodo de 12 h

Trinta dias após a germinação das sementes as plantas foram transplantadas individualmente para vasos de cinco litros, contendo a mesma mistura de terra e substrato (2:2:1) descrita anteriormente, e mantidas a céu aberto até o momento da inoculação.

Os experimentos foram realizados duas vezes, a primeira de janeiro a junho de 2011 e repetido de maio a novembro de 2011.

#### **2.4.2 Inoculação de *Colletotrichum acutatum* em folhas de plantas daninhas**

Um isolado de *C. acutatum* foi obtido, a partir de flores com sintomas de Podridão Floral dos Citros, de um pomar comercial localizado no município de Santa Cruz do Rio Pardo (S 22°49.726'/ WO 49° 20.346'). Após caracterização molecular, o isolado foi repicado para meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA), contendo discos de papel de filtro estéril na superfície do meio. Após o fungo crescer sobre os discos de papel de filtro, estes foram retirados do meio de cultura e preservados em tubos tipo Eppendorf® contendo sílica, sendo então mantidos a 4°C (Figura 2).



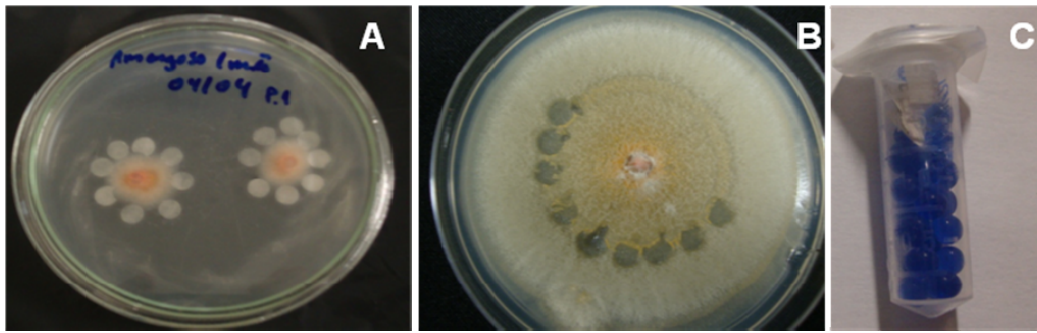


Figura 2 – Isolado de *Colletotrichum acutatum* repicado em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar contendo discos de papel de filtro estéril (A); meio de cultura BDA após a remoção dos discos (B); tubos tipo Eppendorf® contendo os discos de papel de filtro com *C. acutatum* e sílica, para preservação (C)

Para o preparo da suspensão de conídios o isolado, preservado em papel de filtro, foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e as placas foram incubadas a 23°C com fotoperíodo de 12 h, por oito dias. Após esse período acrescentou-se água destilada esterilizada nas placas contendo as colônias, na razão de 20 mL por placa e, com o auxílio da alça de Drigalsky, raspou-se a superfície da cultura para remoção dos conídios. A suspensão de inóculo foi filtrada em gaze e calibrada, com o uso da Câmara de Neubauer, para a concentração de  $10^5$  conídios/mL.

No primeiro experimento foram utilizadas oito plantas de *D. insularis*, *C. echinatus*, e *P. maximum*, sete de *B. plantaginea*, *B. decumbens* e *C. benghalensis* e cinco plantas de *B. pilosa*. No segundo foram utilizadas oito plantas de *D. insularis*, *C. echinatus*, *P. maximum*, *B. plantaginea*, *B. decumbens* e *C. benghalensis* e cinco plantas de *B. pilosa*. Para algumas espécies de plantas daninhas, 20 a 30 folhas foram fixadas em placas de poliestireno expandido (isopor) (Figura 3A) e tiveram a superfície superior desinfestada, primeiramente com álcool 70% e posteriormente com hipoclorito de sódio a 0,5% (3 partes de água para 1 parte de hipoclorito de sódio 2%) (Figura 3B). Em seguida o local de inoculação de cada folha, na superfície superior do limbo foliar, foi delimitado com marcador permanente da marca Sharpie®. Foram feitos de quatro a seis círculos de aproximadamente um centímetro de diâmetro em 24 folhas de cada espécie de planta daninha nos quais foram depositados 70 µL da suspensão de conídios (Figura 3C). Como testemunha seis folhas de cada espécie receberam 70 µL de água destilada esterilizada nos locais marcados do limbo foliar. As plantas de *B. pilosa* e de *C.*

*benghalensis* não foram fixadas em isopor em virtude da arquitetura do dossel destas espécies, procedendo-se apenas a assepsia e a marcação das folhas (Figura 3D). Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 36 horas (Figura 3E) para permitir a germinação dos conídios e formação dos apressórios.

Ao término da câmara úmida amostras de todas as plantas foram coletadas e observadas em microscopia óptica para se confirmar a germinação dos conídios. Para isso foi utilizada a técnica da “impressão da superfície de folhas” modificada, descrito por Dhingra e Sinclair (1995). Uma gota de cola Super Bonder<sup>®</sup> foi depositada sobre uma lâmina e, em seguida, pressionada contra a superfície marcada da folha inoculada. Após a solidificação da cola, em média um minuto, a folha foi cuidadosamente removida da lâmina, a qual foi então corada com safranina para observação em microscópio óptico na magnificação de 400 x. Na sequência, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, onde foram mantidas até a sua senescência (Figura 3F).

Para confirmar a viabilidade da suspensão de conídios, no momento da inoculação das plantas, uma placa de poliestireno foi introduzida dentro da câmara úmida com 70 µL da suspensão usada para a inoculação. Após 36 h depositou-se uma gota de lactoglicerol na área demarcada e, com o auxílio do microscópio óptico na magnitude de 400 x, foi feita a contagem de conídios germinados e não germinados. Também foi estimada, em uma amostra de 100 conídios por placa, a porcentagem de formação de apressórios.

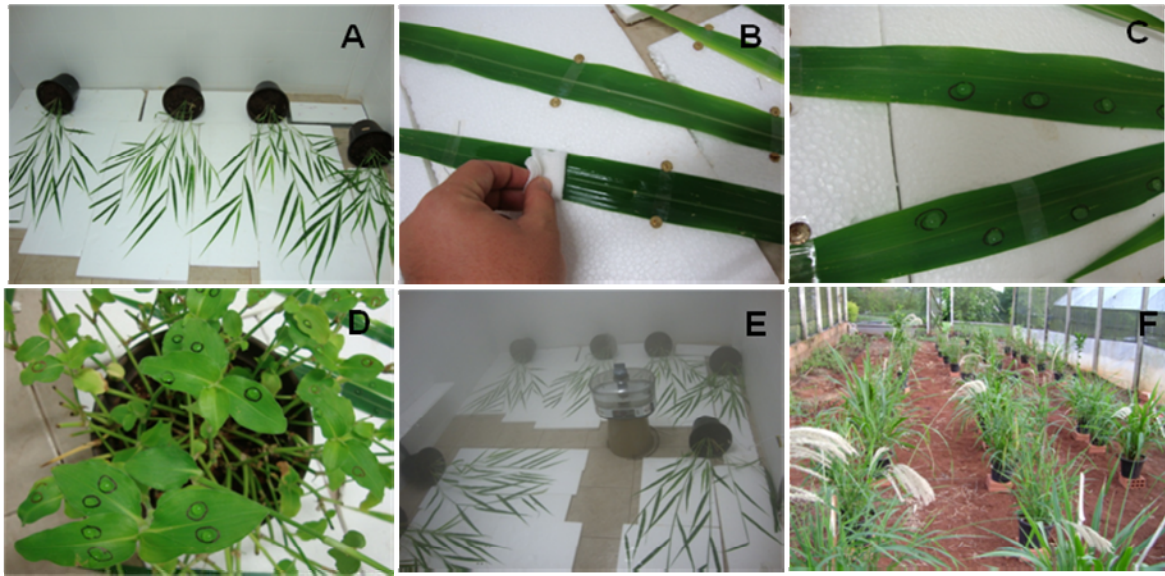


Figura 3 – Inoculação de *Colletotrichum acutatum* em plantas daninhas: (A) parte aérea das plantas de *Brachiaria decumbens* fixadas em isopor; (B) desinfestação superficial das folhas de *Panicum maximum* com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 0,5%; (C) áreas do limbo foliar de *Panicum maximum* marcadas e inoculadas com 70 µL da suspensão de conídios; (D) folhas de *Commelina benghalensis* marcadas e inoculadas, sem a necessidade de fixação em isopor; (E) câmara úmida aplicada às folhas inoculadas e (F) plantas daninhas mantidas em casa de vegetação após a inoculação

### 2.4.3 Preparo da solução de extrato floral

Para se obter o extrato floral destinado à indução da germinação dos apressórios, amostras frescas de botões florais de plantas de laranjas doce assintomáticas foram utilizadas. As flores foram fracionadas em 1,23 g de pétalas, 0,12 g de pólen e 0,97 g de tecido do gineceu, sendo cada fração adicionada em 10 mL de água destilada autoclavada e agitada por dez minutos (SPÓSITO, informação pessoal). Em seguida, as suspensões resultantes foram misturadas em um único Becker e filtrada em membrana milipore 0,22 µm. Logo após esse procedimento, a suspensão foi armazenada em tubos tipo Eppendorf® e preservada a -20°C até o momento do uso.

### 2.4.4 Isolamento de *Colletotrichum acutatum* das folhas inoculadas

Os isolamentos de *C. acutatum* das folhas inoculadas iniciaram-se 30 dias após as inoculações. Para isso, uma folha por planta, de cada espécie de planta daninha, foi

coletada e desinfestada superficialmente pela imersão em álcool 70% por um minuto, seguido por hipoclorito de sódio (0,5%) por um minuto e finalmente por água destilada por 30 segundos (Figura 4a). Após a secagem das folhas em papel de filtro, estas foram transferidas para placas de Petri, onde receberam 70 µL de extrato floral de citros sobre as marcações, para estimular a germinação dos apressórios que ali permaneceram aderidos (Figura 4b), sendo então incubadas por 24 horas a 23°C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, com o auxílio de um bisturi, as áreas demarcadas das folhas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> e transferidos para placas de poliestireno (de quatro a oito fragmentos/placa) contendo meio de Martin (Figura 4c). Após o surgimento das primeiras colônias de *C. acutatum* (Figura 4d), discos de quatro milímetros de diâmetro foram transferidos para meio BDA (Figura 4e) para a obtenção de colônias puras (Figura 4f). Na sequência, o fungo foi preservado em papel de filtro (como descrito anteriormente), para posterior utilização nos testes de patogenicidade.

#### **2.4.5 Testes de patogenicidade**

O teste de patogenicidade foi realizado em plantas de laranja doce de três anos de idade, mantidas em vasos de cinco litros. Um isolado de *C. acutatum* obtido de cada espécie de planta daninha em cada amostragem foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Sete dias após a repicagem, quando a colônia apresentava esporos em abundância, foi preparada uma suspensão de conídios, como descrita anteriormente. Em seguida cada suspensão de conídios foi aplicada, com o auxílio de um atomizador nas flores de citros. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas a 23°C, de maneira semelhante à inoculação das plantas daninhas. Após esse período as flores foram avaliadas diariamente até o aparecimento dos primeiros sintomas.

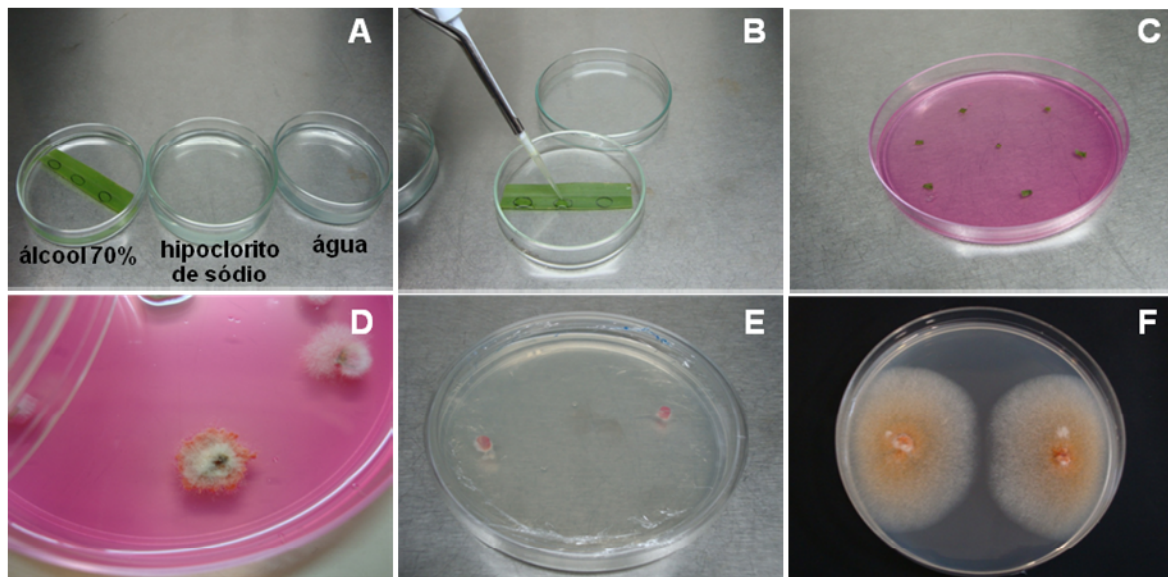


Figura 4 – Metodologia para isolamento de *Colletotrichum acutatum* de plantas daninhas: (A) desinfestação superficial das folhas; (B) adição de 70 µL de extrato floral de citros sobre as áreas demarcadas onde realizou-se a inoculação; (C) fragmentos de folha transferidas para meio de cultura semi-seletivo; (D) colônia de *C. acutatum* em meio de Martin; (E) transferência das colônias para meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar e (F) colônias puras

#### 2.4.6 Análise estatística

Os dados de porcentagem de isolamento de *Colletotrichum acutatum* em meio de cultura (número de frações de folhas que originaram isolados de *C. acutatum* dividido pelo número total de frações de folha colocado em meio de Martin de cada planta daninha em cada período de incubação) no primeiro experimento foram comparados por análise não paramétrica, pelo teste de Kruskal-Wallis com 5% de significância, em razão da falta de homogeneidade das variâncias. Já no segundo experimento, com a transformação  $1/(\text{proporção de isolamento})^2$ , houve normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias. Dessa forma realizou-se a comparação das médias de porcentagem de isolamento pelo teste de Tukey a 5% de significância. Em ambos os casos utilizou-se o programa SAS 9.5<sup>®</sup>. Os dados foram analisados seguindo tratamento fatorial, com 2 fatores: espécie daninha e tempo (meses a partir da inoculação).



## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* em folhas de plantas daninhas

Nos dois experimentos observou-se germinação de conídios e formação de apressórios de *C. acutatum* na superfície de todas as folhas inoculadas, após 36 horas de câmara úmida (Figura 5).

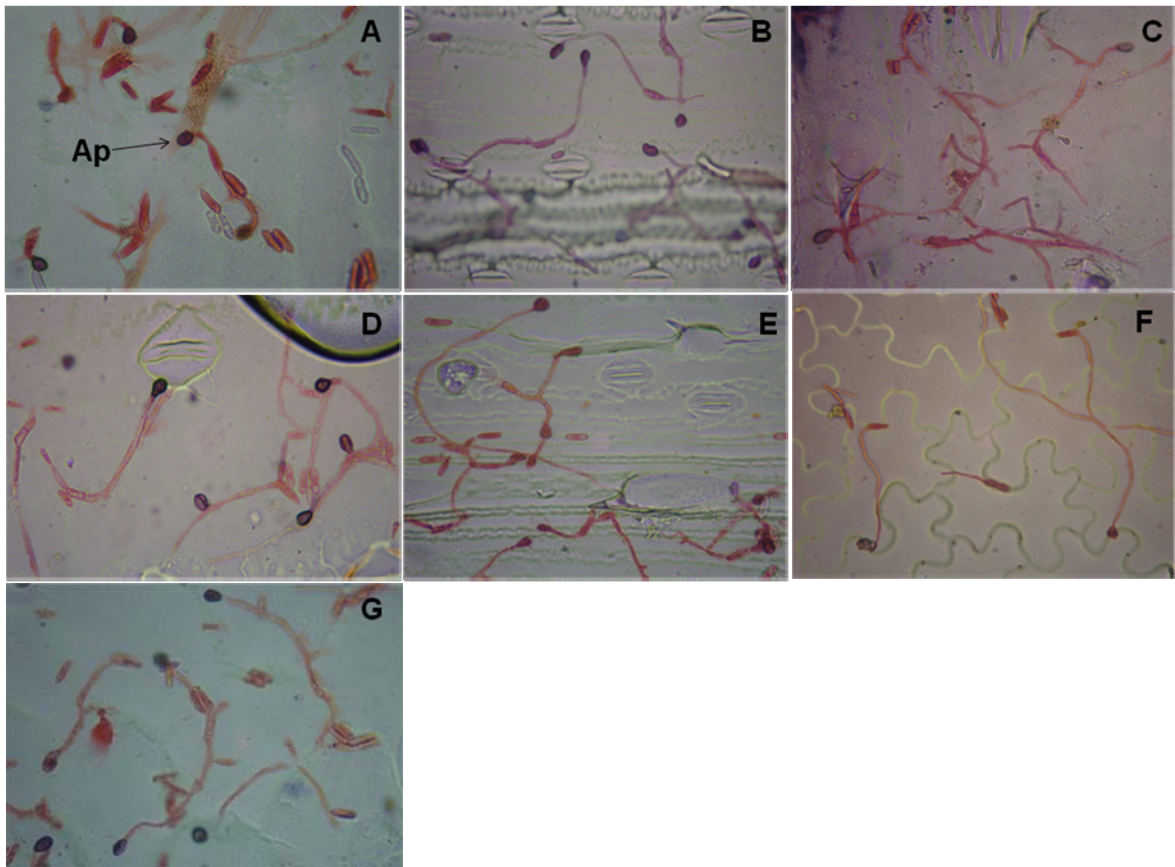


Figura 5 – Formação de apressórios (Ap) de *Colletotrichum acutatum* na superfície das folhas de plantas daninhas: (A) *Digitaria insularis*, (B) *Brachiaria plantaginea*, (C) *Cenchrus echinatus*, (D) *Brachiaria decumbens*, (E) *Panicum maximum*, (F) *Bidens pilosa* e (G) *Commelina benghalensis*. Imagens obtidas de microscópio óptico no aumento de 400 x, após coloração das folhas inoculadas com safranina

No primeiro experimento, as maiores porcentagens de germinação de conídios (78% e 72%) foram observadas em folhas de *B. plantaginea* e *P. maximum*, respectivamente, e as menores (3% e 26%) em folhas de *B. pilosa* e *C. benghalensis*.

No segundo experimento, as maiores porcentagens de germinação de conídios (75%) foram obtidas em folhas de *P. maximum* e *B. decumbens* e as menores (23% e 26%), em folhas de *C. echinatus* e *C. benghalensis* (Tabela 1).

No primeiro experimento as maiores porcentagens de formação de apressórios foram observadas em folhas de *P. maximum* (66%) e *B. plantaginea* (34%) e as menores, em folhas de *B. pilosa* (2%) e *C. echinatus* (17%); no segundo experimento as maiores porcentagens de formação de apressórios foram obtidas em folhas de *B. decumbens* (61 %) e *P. maximum* (47%) e as menores em folhas de *C. echinatus* (7 %) e *C. benghalensis* (21%) (Tabela 2).

Comparando-se as porcentagens de germinação de conídios e formação de apressório obtidas em folhas de *P. maximum* (72% e 66%, respectivamente) com as obtidas em placas de poliestireno (2%), no experimento um, foi possível observar uma redução de 97,2% na germinação de conídios e 96,9% na formação de apressório. No experimento dois, essa redução foi de 84% na germinação de conídios e 74,4% na formação de apressório (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Germinação de conídios (%) de *Colletotrichum acutatum* em placas de poliestireno e na superfície das folhas de diferentes plantas daninhas, 36 h após a inoculação, observada nos dois experimentos e cálculo da porcentagem de redução da germinação nas placas em relação às folhas inoculadas

(continua)

Espécie vegetal	Experimento 1			Experimento 2		
	Placa poliestireno	Folha	% Redução	Placa poliestireno	Folha	% Redução
<i>Panicum maximum</i>	2	72	97,2	12	75	84,0
<i>Digitaria insularis</i>	6	28	78,5	8	55	85,4
<i>Cenchrus echinatus</i>	16	65	75,3	8	23	65,2
<i>Commelina benghalensis</i>	6	26	76,9	6	26	76,9

Tabela 1 – Germinação de conídios (%) de *Colletotrichum acutatum* em placas de poliestireno e na superfície das folhas de diferentes plantas daninhas, 36 h após a inoculação, observada nos dois experimentos e cálculo da porcentagem de redução da germinação nas placas em relação às folhas inoculadas

(conclusão)

Espécie vegetal	Experimento 1			Experimento 2		
	Placa poliestireno	Folha	% Redução	Placa poliestireno	Folha	% Redução
<i>Brachiaria plantaginea</i>	20	78	75,0	2	34	94,1
<i>Brachiaria decumbens</i>	8	48	83,3	-	75	-
<i>Bidens pilosa</i>	-	3	-	-	70	-

Tabela 2 – Formação de apressórios (%) de *Colletotrichum acutatum* em placas de poliestireno e na superfície das folhas de diferentes plantas daninhas, 36 h após a inoculação, observada nos dois experimentos e cálculo da porcentagem de redução da germinação nas placas em relação às folhas inoculadas

(continua)

Espécie vegetal	Experimento 1			Experimento 2		
	Placa poliestireno	Folha	% Redução	Placa poliestireno	Folha	% Redução
<i>Panicum maximum</i>	2	66	96,9	12	47	74,4
<i>Digitaria insularis</i>	6	20	70,0	6	42	85,7
<i>Cenchrus echinatus</i>	8	17	52,9	4	7	42,0
<i>Commelina benghalensis</i>	4	21	80,9	4	21	80,9
<i>Brachiaria plantaginea</i>	10	34	70,5	1	26	96,1



Tabela 2 – Formação de apressórios (%) de *Colletotrichum acutatum* em placas de poliestireno e na superfície das folhas de diferentes plantas daninhas, 36 h após a inoculação, observada nos dois experimentos e cálculo da porcentagem de redução da germinação nas placas em relação às folhas inoculadas

Espécie vegetal	(conclusão)					
	Experimento 1			Experimento 2		
	Placa poliestireno	Folha	% Redução	Placa poliestireno	Folha	% Redução
<i>Brachiaria decumbens</i>	4	22	81,8	-	61	-
<i>Bidens pilosa</i>	-	2	-	-	37	-

### 2.5.2 Isolamento de *Colletotrichum acutatum* das folhas inoculadas

Não foram observados sintomas de qualquer natureza ou estruturas visíveis do patógeno na superfície das folhas inoculadas das plantas daninhas. No primeiro experimento, 30 dias após a inoculação, *C. acutatum* foi isolado de 100% das amostras de folhas de *P. maximum*, de 57% das amostras de *B. decumbens* e *C. benghalensis*, de 50% das amostras de *D. insularis* e *C. echinatus*, de 42,8% das amostras de *B. plantaginea* e de 40% das amostras de *B. pilosa*. Aos 60 dias a porcentagem de recuperação do patógeno foi de 100% para folhas de *C. echinatus*, de 87,5% para *P. maximum*, de 85,7% para *B. decumbens*, de 71,4% para *C. benghalensis* e de 50% para *B. plantaginea*. Noventa dias após a inoculação, *C. acutatum* foi isolado de 100% das amostras de folhas de *P. maximum*, de 83,3% de *B. decumbens* e de 60% de *C. benghalensis*. No segundo experimento, as porcentagens de isolamento do fungo nas plantas daninhas foram de 100% para folhas de *B. pilosa* e *C. echinatus*, de 87,5% para *B. decumbens*, *D. insularis* e *P. maximum*, de 66,6% para *B. plantaginea* e de 62,5% para *C. benghalensis*, 30 dias após a inoculação. Após 60 dias, as porcentagens foram de 100% para folhas de *P. maximum*, *D. insularis* e *C. benghalensis*, de 87,5% para *C. echinatus*, de 75% para *B. decumbens* e de 66,6% para *B. plantaginea* e *B. pilosa*. Aos

noventa dias *C. acutatum* foi recuperado de 100% das amostras de *B. decumbens* (Tabela 3).

Tabela 3 - Isolamento de *Colletotrichum acutatum* de folhas de plantas daninhas aos um, dois e três meses após a inoculação

Espécie vegetal	Experimento 1			Experimento 2		
	1° mês	2° mês	3° mês	1° mês	2° mês	3° mês
<i>Panicum maximum</i>	8/8*	7/8	2/2	7/8	6/6	-
<i>Digitaria insularis</i>	6/8	-	-	7/8	4/4	-
<i>Cenchrus echinatus</i>	4/8	3/3	-	8/8	7/8	-
<i>Commelina benghalensis</i>	4/7	5/7	2/5	5/8	¾	-
<i>Brachiaria plantaginea</i>	3/7	3/7	-	4/6	2/3	-
<i>Brachiaria decumbens</i>	4/7	4/7	5/6	7/8	6/8	6/6
<i>Bidens pilosa</i>	2/5	-	-	5/5	2/3	-

\*total de plantas que apresentaram colônias de *Colletotrichum acutatum* em meio de cultura sobre o total de plantas utilizadas nos experimentos.

Nos dois experimentos foram observadas diferenças significativas na sobrevivência do patógeno entre as diferentes plantas daninhas, porém não houve diferenças entre os meses de incubação do fungo nas plantas (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem média de isolamento de *Colletotrichum acutatum*, nas diferentes espécies de plantas daninhas, nos três períodos de avaliação

Espécie vegetal	Porcentagem de isolamento	
	Experimento 1	Experimento 2*
<i>Panicum maximum</i>	14,6 a**	35,0 a***
<i>Brachiaria decumbens</i>	12,8 a	18,0 bc
<i>Commelina benghalensis</i>	11,0 ab	10,0 c
<i>Bidens pilosa</i>	9,2 ab	13,2 bc
<i>Digitaria insularis</i>	7,3 ab	12,0 c
<i>Brachiaria plantaginea</i>	5,6 b	7,5 c
<i>Cenchrus echinatus</i>	4,2 b	25,8 ab

\*dados transformados pela formula:  $1/(\text{proporção de isolamento})^2$

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

\*\*\*médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

*Colletotrichum acutatum* foi isolado de folhas de todas as plantas daninhas analisadas, independentemente do tempo da inoculação (30, 60 ou 90 dias). No primeiro experimento, *C. acutatum* foi isolado em maior porcentagem de fragmentos de folhas de *P. maximum* e *B. decumbens* (14,6% e 12,8%, respectivamente), diferindo estatisticamente de *B. plantaginea* (5,6%) e *C. echinatus* (4,2%). No segundo experimento, a maior porcentagem de isolamento foi obtida de folhas de *P. maximum* (35%), diferindo estatisticamente das demais plantas, com exceção de *C. echinatus*.

### 2.5.3 Testes de patogenicidade

Todos os isolados obtidos, independentemente da espécie de planta daninha e do tempo da inoculação, apresentaram sintomas típicos de PFC em todas as flores inoculadas, em ambos os experimentos (Figuras 6 e 7).



Figura 6 – Flores de citros com sintomas de podridão floral após inoculação com *Colletotrichum acutatum* isolados no primeiro experimento das diferentes plantas daninhas e após diferentes meses de incubação: *C. acutatum* isolado de *Commelina benghalensis* após 1 (A), 2 (B) e 3 (C) meses; *C. acutatum* isolado de *Panicum maximum* após 1 (D), 2 (E) e 3 (F) meses; *C. acutatum* isolado de *Brachiaria decumbens* após 1 (G), 2 (H) e 3 (I) meses; *C. acutatum* isolado de *Cenchrus echinatus* após 1 (J) e 2 (K) meses; *C. acutatum* isolado de *Brachiaria plantaginea* após 1 (L) e 2 (M) meses; *C. acutatum* isolado de *Digitaria insularis* após 1 mês (N); *C. acutatum* isolado de *Bidens pilosa* após 1 mês (O)



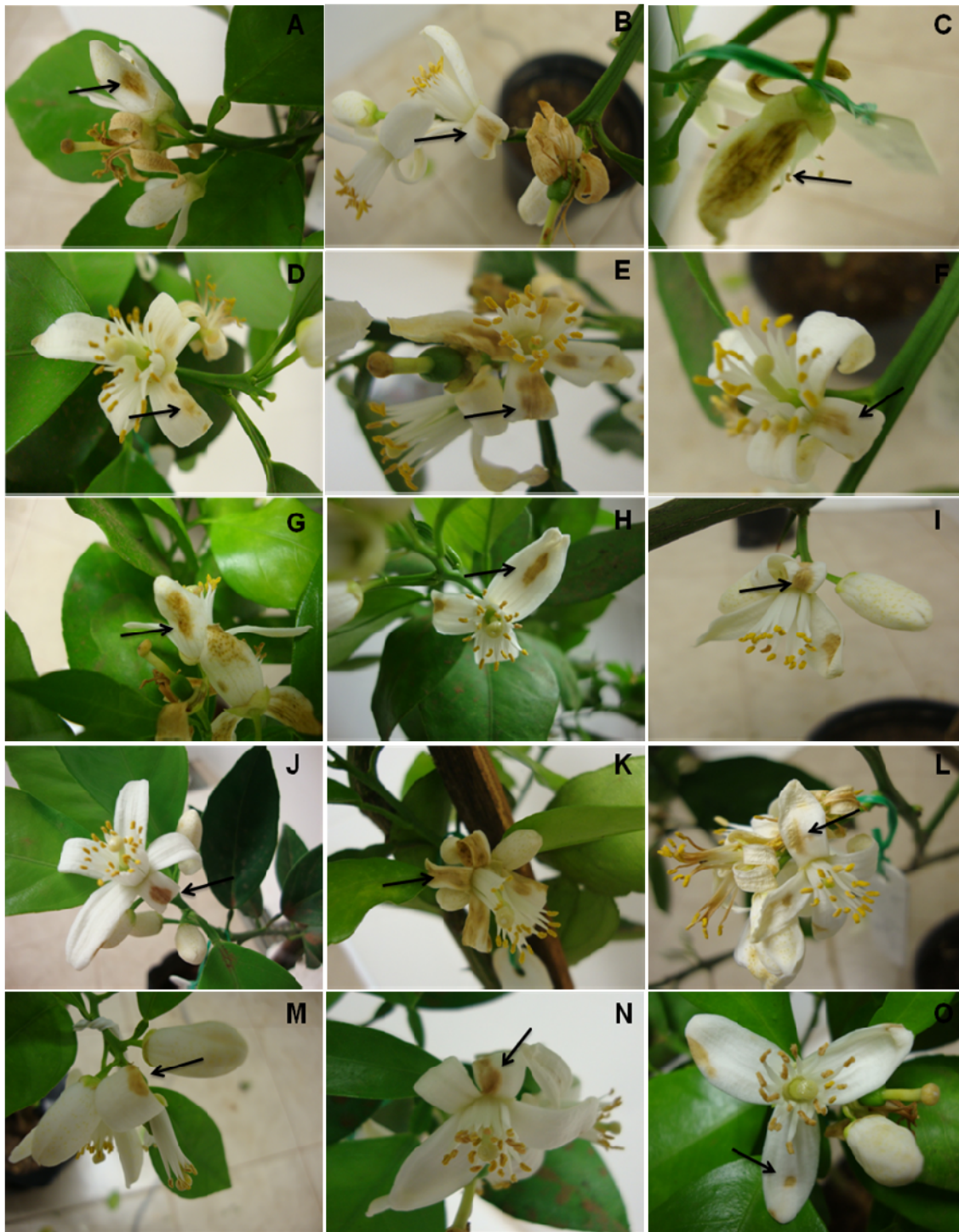


Figura 7– Flores de citros com sintomas de podridão floral após inoculação com *Colletotrichum acutatum* isolados no segundo experimento das diferentes plantas daninhas após diferentes meses de inoculação: *C. acutatum* isolado de *Brachiaria decumbens* após 1 (A), 2 (B) e 3 (C) meses; *C. acutatum* isolado de *Digitaria insularis* após 1 (D) e 2 (E) meses; *C. acutatum* isolado de *Cenchrus echinatus* após 1 (F) e 2 (G) meses; *C. acutatum* isolado de *Panicum maximum* após 1 (H) e 2 (I) meses; *C. acutatum* isolado de *Brachiaria plantaginea* após 1 (J) e 2 (K) meses; *C. acutatum* isolado de *Bidens pilosa* após 1 (L) e 2 (M) meses; *C. acutatum* isolado de *Commelina benghalensis* após 1 (N) e 2 (O) meses

## 2.6 Discussão

O fungo *Colletotrichum acutatum* é um patógeno cosmopolita que possui uma ampla gama de hospedeiros, sendo encontrado em plantas mono e dicotiledôneas, cultivadas e não cultivadas, causando perdas significativas em várias culturas (PERES et al., 2005). Este fungo foi reportado como o agente causal de doenças em 34 gêneros de plantas, pertencentes a 22 famílias (SUTTON, 1992, citado por FREEMAN; HOROWITZ; SHARON, 2001). Dentre as culturas citadas como hospedeiras alternativas de espécies de *Colletotrichum* encontram-se as plantas daninhas. Estas, além de competirem com as plantas cultivadas por nutrientes, têm grande importância como hospedeiras alternativas de diversos patógenos. Essa característica é importante principalmente para culturas anuais, pois as plantas daninhas presentes na área de cultivo permitem a sobrevivência do patógeno na ausência do hospedeiro principal.

Em culturas perenes plantas daninhas não são muito estudadas, uma vez que, de modo geral, o patógeno pode sobreviver no próprio hospedeiro por longos períodos. Mileo et al. (2007) detectaram o fungo *Colletotrichum guaranicola*, agente causal da antracnose do guaranazeiro, em diferentes espécies de plantas daninhas. Estes autores demonstraram que, em áreas onde havia plantas daninhas infectadas, a incidência da doença era maior do que em áreas sem a presença de plantas daninhas. Apesar de vários trabalhos demonstrarem a importância de plantas daninhas como fonte de inóculo primário e secundário para diversas culturas, para a cultura do citros ainda não há relatos da sobrevivência de *C. acutatum*, agente causal da PFC, em plantas daninhas. De acordo com Peres et al. (2005), o papel de hospedeiros alternativos no ciclo das doenças causadas pelo fungo *C. acutatum* ainda não é muito claro.

Neste trabalho demonstrou-se que *C. acutatum* foi capaz de germinar e formar apressórios na superfície de folhas de plantas daninhas, após 36 horas de câmara úmida, em todas as espécies daninhas avaliadas. É sabido que a formação de apressórios é uma característica do gênero *Colletotrichum* (JEFFRIES et al., 1990). Agostini e Timmer (1994) e Zulfiqar, Brlansky e Timmer (1996), quando inocularam folhas de citros, também observaram a germinação de conídios e formação de

apressórios. MacKenzie, Peres e Timmer (2010) relataram que isolados de *C. acutatum*, geneticamente distintos, provenientes de outros hospedeiros, quando inoculados em folhas de tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*), germinaram e produziram apressórios.

Neste trabalho foi observada uma grande redução na germinação dos conídios nas placas de poliestireno, nos dois experimentos, em comparação à germinação nas superfícies das folhas das plantas daninhas. Isto deveu-se, provavelmente, ao fato dos conídios da suspensão permanecerem aglomerados pela mucilagem quando depositados sobre o poliestireno (Apêndice A). A autoinibição de germinação de conídios é um fenômeno comum entre as espécies de *Colletotrichum*. Bergstrom e Nicholson (1999) observaram inibição de germinação de conídios de *Colletotrichum graminicola* pela presença da substância micosporina-alanina encontrada na matriz mucilaginosa. Dessa forma, é preciso cuidado ao examinar dados de germinação de conídios “in vitro”, pois baixas porcentagens de germinação não indicam necessariamente baixa viabilidade do fungo. Não houve diferença estatística na sobrevivência de *C. acutatum* ao longo do período examinado (30, 60 e 90 dias da inoculação). Assumindo que a desinfestação superficial das folhas realizada anteriormente ao isolamento matou os conídios e hifas, as colônias formadas, após o plaqueamento das folhas desinfestadas em meio de cultura, podem ter sido produzidas pelas hifas presentes no interior das células do hospedeiro ou por apressórios presentes na superfície das folhas. Berrie e Burgess (2003) inocularam 35 espécies de plantas daninhas, comumente encontradas em plantações de morango, com o fungo *C. acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro, e relataram que, após um mês, o fungo sobreviveu em todas as plantas inoculadas. Agostini e Timmer (1994) e Zulfiqar, Brlansky e Timmer (1996), compararam, por meio de inoculações artificiais, a sobrevivência de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em folhas de citros. Após avaliarem as habilidades dos fungos de produzirem apressórios e a capacidade de formarem colônias após a assepsia, concluíram que a sobrevivência dos patógenos na superfície das folhas se deu na forma de apressório. No entanto, os autores não conseguiram observar pegs de penetração. Os processos de infecção e colonização de *C. acutatum*, agente causal da antracnose no morango, foram estudados em plantas de morango e

de tomate, berinjela, pimenta e feijão, tidas como plantas não hospedeiras do patógeno, por Horowitz, Freeman e Sharon (2002). Utilizando um isolado de *C. acutatum* geneticamente modificado, expressando uma proteína de fluorescência (green fluorescent protein-GFP), os autores observaram que ao contrário do que ocorreu em morango (planta hospedeira), onde o apressório serviu para a penetração direta e a rápida colonização dos tecidos vegetais, mostrando severos sintomas em poucos dias, em plantas não hospedeiras, o fungo cresceu na superfície da folha, produziu apressório, mas não formou peg de penetração. A penetração, quando ocorreu, foi por uma simples hifa e ficou restrita na camada subcuticular da folha, exibindo um desenvolvimento quiescente e não apresentando sintoma. Recentemente, demonstrou-se que um isolado de *C. acutatum* expressando a proteína de fluorescência foi incapaz de penetrar a epiderme de folhas cítricas e permaneceu como epífita por vários meses quando as plantas foram mantidas sob temperatura de 27°C (Pereira e Tanaka, comunicação pessoal). Aparentemente *C. acutatum*, causador da PFC, não possui a habilidade de sobreviver endofiticamente em folhas (WACULICZ-ANDRADE, 2009). Esta autora estudou a variabilidade genética de fungos endofíticos, em plantas cítricas e em plantas de vegetação espontânea presentes em pomares com relatos de PFC, e constatou que todos os isolados obtidos pertenciam à espécie *C. gloeosporioides*. Huang et al. (2009) estudaram a diversidade de espécies de fungos endofíticos, presentes em três espécies de árvores da família Artemisia, e relataram que os gêneros *Alternaria*, *Phomopsis*, *Xylaria* e *Colletotrichum* foram os endofíticos predominantes nas folhas. Dentre o gênero *Colletotrichum* foram encontrados nove espécies, vivendo endofiticamente, mas nenhum isolado pertencia à espécie *C. acutatum*. É provável, portanto, que a sobrevivência nas plantas daninhas também ocorra de maneira epifítica.

Os dados do isolamento indicam que o patógeno permaneceu viável por até três meses, em plantas daninhas das famílias *Poaceae* (*Brachiaria decumbens*, *Brachiaria plantaginea*, *Digitaria insularis*, *Cenchrus echinatus*, *Panicum maximum*), *Asteraceae* (*Bidens pilosa*) e *Commelinaceae* (*Commelina benghalensis*), comumente encontradas em pomares de laranja, porém sem apresentar sintoma. Dessas, a espécie *P. maximum* foi a mais propícia à sobrevivência, já que o patógeno foi recuperado de todas as folhas



inoculadas em um número significativamente maior de fragmentos que nas demais espécies. As plantas daninhas da família *Poaceae* são monocotiledôneas, gramíneas, que têm como características em comum a capacidade de produzirem sementes em grandes quantidades (LORENZI, 2006) e de infestarem culturas anuais e perenes, bem como ambientes antropizados (MILÉO et al., 2007). Essas características favorecem a disseminação e o estabelecimento dessas plantas em determinadas áreas. *Panicum maximum* é uma planta perene, com porte elevado, em forma de touceira, podendo atingir até dois metros de altura. Suas folhas são longas e finas, com esparsa pilosidade na superfície. *Brachiaria decumbens* também é uma planta perene, entouceirada, ereta e com altura variando de 30 a 100 cm de altura. Suas folhas são finas e longas, com densa pilosidade em toda a superfície. *Brachiaria plantaginea* é uma planta anual, de 50 a 80 cm de altura, com folhas finas, desprovidas de tricomas. *Cenchrus echinatus* é uma planta anual, herbácea, entouceirada, de 20 a 60 cm de altura, com folhas lanceoladas, rígidas e sem tricomas. Uma de suas características é a produção de sementes com cerdas rígidas. *Digitaria insularis* é uma planta perene, entouceirada, com altura entre 50 a 100 cm. Suas folhas são lanceoladas, ligeiramente ásperas e se encontram alternadas no colmo (LORENZI, 2006). A família *Asteraceae* é um dos maiores grupos dentro das angiospermas, apresentando grande variação morfológica (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2004). *Bidens pilosa* é uma planta anual, ereta, de 40 a 120 cm de altura. Apresenta folhas pecioladas, compostas e presença de tricomas. Sua reprodução é exclusivamente por sementes (LORENZI, 2006). A família *Commelinaceae* é representada por plantas monocotiledôneas, herbáceas e perenes (CEAPDESIGN 2011). *Commelina benghalensis* apresenta folhas tenras e suculentas, com tricomas na superfície. Plantas desta espécie podem medir de 30 a 60 cm de altura, apresentando dois tipos de produção de sementes: aérea e subterrânea (LORENZI, 2006).

Uma das características das plantas daninhas é o rápido crescimento da raiz devido à competição com outras plantas por água e nutrientes (BRIGHENTI; OLIVEIRA, 2011). O fato de o patógeno ter sobrevivido por menos tempo em algumas espécies de plantas daninhas e, dos experimentos terem sido conduzidos por até três meses, foi consequência da limitação do crescimento do sistema radicular imposta pelo tamanho

dos vasos. Em curto período de tempo, as raízes das plantas cresceram e ocuparam todos os espaços dos vasos, limitando seu desenvolvimento normal. Com isso, a parte aérea das plantas senesceu em período de tempo mais curto do que provavelmente ocorreria no campo.

No teste de patogenicidade em flores de citros, todos os isolados obtidos, independentemente da espécie de planta daninha e do tempo da inoculação, apresentaram sintomas típicos de PFC em todas as flores inoculadas. Freeman, Horowitz e Sharon (2001) relataram que quando *C. acutatum*, causador da antracnose do morango, foi inoculado em plantas não hospedeiras, essas não desenvolveram sintomas de antracnose, porém, o fungo sobreviveu por três meses nessas plantas.

Raid e Pennypacker (1987) inocularam 18 espécies de plantas daninhas com *Colletotrichum coccodes* e observaram que 13 espécies apresentavam o fungo, mas eram assintomáticas. Com esses resultados os autores confirmaram a hipótese de que algumas plantas daninhas servem como hospedeiras alternativas de *C. coccodes*, ora como fonte de inóculo primário, quando da ausência de plantas de tomate no campo, ora como fonte de inóculo secundário, durante o ciclo da cultura. Berrie e Burgess (2003) inocularam 35 espécies de plantas daninhas com o fungo *C. acutatum* e relataram que o fungo causou sintomas em apenas sete espécies, embora estivesse presente em todas as plantas daninhas inoculadas. Parikka e Lemmetty (2009) inocularam 18 espécies de plantas daninhas com *C. acutatum* e relataram que a presença do fungo resultou em sintomas em apenas duas espécies, *Plantago major* e *Phacelia tanacetifolia*. De acordo com Raid e Pennypacker (1987), a falta de sintomas na maioria das espécies de plantas daninhas estudadas indica um menor nível de suscetibilidade destas plantas em relação às plantas cultivadas. De acordo com Crouch e Beirn (2009), espécies de *Colletotrichum* são responsáveis por causarem doenças em gramíneas e cereais, afetando, pelo menos, 42 gêneros de plantas pertencentes à família Poaceae. Essas espécies de *Colletotrichum* associadas às espécies de gramíneas apresentam conídios de aspecto falcado (CROUCH; BEIRN, 2009), diferentemente de *Colletotrichum acutatum*, causador da PFC, que apresenta conídios pequenos, com ápice fusiforme (AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992).

A sobrevivência de *C. acutatum*, causador da PFC, em diferentes espécies de plantas daninhas, demonstra que estas podem ser potenciais fontes de inóculo do fungo em áreas com cultivo de laranja, garantindo a sobrevivência e a presença do patógeno na área.

### 3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que plantas daninhas, comumente encontradas em pomares de citros no Estado de São Paulo, podem servir como hospedeiras alternativas de *Colletotrichum acutatum*, resultando em fonte de inóculo primário e secundário deste patógeno para a cultura do citros.



## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, Saint Paul, v.76, n.11, p.1176-1178, 1992.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v.84, n.4, p.420-425, 1994.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, n.11, p.1377-1382, 1992.
- AGOSTINI, J.P.; GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, n.5, p.485-490, 1993.
- BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, Saint Paul, v.83, n.7, p.596-608, 1999.
- BERRIE, A.M.; BURGESS, C.M. A review of research on epidemiology and control of blackspot of strawberry (*Colletotrichum acutatum*) with special reference to weeds as alternative hosts. In: GORDON, S.C.; CROSS, J.V. (Ed.) Proceedings of the IOBCWPRS Working Group, International Plant Protection in Orchards. Subgroup Soft Fruits, Dundee: Scotland, 18-21. Sep., 2001. Bulletin – OILS – STROP 26: 163-168. **Proceedings...**Dundee: Scotland 2003. p.163-168.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <[http://www.extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://www.extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 20 ago. 2011.
- BRIGHENTI, A.M; OLIVEIRA, M.F. Biologia das plantas daninhas. In. OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e manejo das plantas daninhas**. Curitiba: Editora Omnipax. v 1, 2011. p. 1-36.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, n.5, p.523-527, 1996.

CEAPDESIGN , Centro de Estudos Ambientais e Paisagísticos. **Famílias botânicas**. Disponível em:<  
[http://www.ceapdesign.com.br/familias\\_botanicas/commelinaceae.html](http://www.ceapdesign.com.br/familias_botanicas/commelinaceae.html)> Acesso em: 17 nov.2011.

CHAVES, A.L.R.; BRAUN, M.R.; EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; GALLETI, S.R. *Erigeron bonariensis*: hospedeira alternativa do *Lettuce mosaic virus* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.3, maio-jun, p.307-311, 2003.

CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.8, p.813-816, 1986.

CHUNG, K.R.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; TIMMER, L.W. Involvement of hormones in symptomatology of postbloom fruit drop (PFD) of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Saint. Paul, v.92, n.6s, p.15, 2002.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: laranja**. Segundo levantamento, agosto de 2011. Disponível em:  
<[www.conab.gov.br/olalaCMS/uploads/arquivos/11\\_09\\_12\\_17\\_44\\_13\\_arquivo\\_editavel\\_capa\\_laranja..pdf](http://www.conab.gov.br/olalaCMS/uploads/arquivos/11_09_12_17_44_13_arquivo_editavel_capa_laranja..pdf)> Acesso em: 04 out. 2011.

CROUCH, J.A.; BEIRN, L.A. Anthracnose of cereals and grasses. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.39, p.19-44, 2009.

DENHAM, T.G. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. **PANS**, London, v.25, p.30-36, 1979.

DENHAM, T.G.; WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v.98, n.1, p.65-77, 1981.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1995. 434p.

DURIGAN, J.C. **Controle químico de plantas daninhas na citricultura**. Jaboticabal: Funep/Fcav-UNESP, 1988. 17p.

EASTBURN, D.M.; GUBLER, W.D. Strawberry anthracnose: Detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.74, n.2, p.161-164, 1990.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v.91, p.13-20, 1979.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: Disease epidemiology. **Turrialba**, Turrialba, v.34, p.173-177, 1984.

FEICHTENBERGER, E. Queda dos frutos jovens de citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja**, Cordeirópolis, v.12, n.2, p.513-521, 1991.

FEICHTENBERGER, E. Podridão floral dos citros: Histórico, sintomatologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v.15, n.1, p.109-128, 1994.

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

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN, A.F.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Ceres, v.2, p. 280-284, 1997.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citros. 2011. In: **Agrianual 2011**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2011. 520p.

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v.91, n.10, p. 986-992, 2001.

FREEMAN, S.; SHALEV, Z.; KATAN, J. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, n.9, p.965-970, 2002.



FUTCH, S.H.; HEBB, J.W.; SONODA, R.M. Effect of removal of persistent calyxes from navel orange trees affected by postbloom fruit drop. In: FLORIDA STATE HORTICULTURAL SOCIETY, 1989, Tampa. **Proceedings...** Tampa: Florida State Horticultural Society, 1989. p.4-5.

GALLI, M.A.; PARADELA, A.L.; SIMA Jr., J.C.; SALVO, S.; SCHERB, C.T. Avaliação de fungicidas no controle da podridão floral (*Colletotrichum acutatum*) em limão Taiti (*Citrus lantifolia*). **Revista Ecosystema**, Pinhal, v.27, n.1/2, p.67-68, 2002.

GOES, A.; GARRIDO, R.B.O.; REIS, R.F.; BALDASSARI, R.B.; SOARES, M.A. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. **Crop Protection**, Oxford, v.27, n.1, p.71-76, 2008.

HARTMAN, G.L.; MANANDHAR, J.B.; SINCLAIR, J.B. Incidence of *Colletotrichum* spp. on soybeans and weeds in Illinois and pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70, n.8, p.780-782, 1986.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and non-pathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.92, n.7, p.743-749, 2002.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; SURVESWARAN, S.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.36, p.69-88, 2009.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M.J.; PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, London, v.39, n.3, p.343-366, 1990.

LAHEY, K.A.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; UENG, P.P.; TIMMER, L.W.; KUAN-REN, C. Induction of phytohormones and differential gene expression in citrus flower infected by the fungus *Colletotrichum acutatum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.17, n.12, p.1394-1401, 2004.

LEANDRO, L.F.S.; GLEASON, M.L.; NUTTER JUNIOR., F.W.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v.91, n.7, p.659-664, 2001.

LEANDRO, L.F.S.; GLEASON, M.L.; NUTTER JUNIOR., F.W.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Influence of temperature and wetness duration on conidia and apleria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v.93, n.4, p.513-520, 2003.

LIMA, W.G.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; MELO DE FILHO, P.A. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.131, p.157-165, 2011.

LIN, Y.; STOVER, E.; SONODA, R.; ROSSKOPF, E. Stigma and style necrosis is associated with postbloom fruit drop in citrus following artificial inoculation. **Hortscience**, Alexandria, v.36, n.6, p.1138, 2001.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**: plantio direto e convencional. 6. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 339 p.

MACKENZIE, S.J.; PERES, N.A.; TIMMER, L.W. Colonization of citrus leaves and secondary conidiation response to citrus flower extracts by non-postbloom fruit drop strains of *Colletotrichum acutatum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.36, n.6, p.333-342, 2010.

McMILLAN JR, R.T.; TIMMER, L.W. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v.73, n.6, p.73, 1989.

MILÉO, L.J.; SILVA, J.F.; BENTES, J.L.S.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Plantas daninhas hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola* em cultivos de guaraná no Estado do Amazonas. **Planta Daninha**, Viçosa, v.25, n.4, p.771-782, 2007.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F.; TROMBIN, V.G.; AMARO, A.A.; NEVES, E.M.; JANK, M.S. **Caminhos para a citricultura**: uma agenda para manter a liderança mundial. São Paulo: Atlas, 2007. 110p.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR, 2010. 137p.

OROZCO SANTOS, M.; GONZÁLES GARZA, R. Caída de frutos pequeños y su control em naranja Valencia Veracruz. **Agricultura Técnica em México**, México, v.12, n.12, p.259-269, 1986.

PARIKKA, P.; LEMMETTY, A. Survival of *Colletotrichum acutatum* on alternative hosts. In: NJF SEMINAR: CHALLENGES IN SUSTAINABLE PLANT PROTECTION IN STRAWBERRIES, 429, 2009, Sweden. **NJF Report...**Sweden: SLU, 2009. 17p.

PERES, N.A.; SOUZA, N.L.; TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop in Brazil and Florida: occurrence and control by fungicides. In: INTERNATIONAL SOCIETY CITRICULTURE, 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society Citriculture, 2000. p.1051-1052.

PERES, N.A.; MACKENZIE, S.J.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus and Key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.98, n.3, p.345-352, 2008.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, n.8, p.784-796, 2005.

PITELLI, R.A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.129, p.16-27, 1985.

PORTO, O.M. Queda anormal de frutos jovens de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.14, n.1, p.341-356, 1993

PORTO, O.M.; ROSSETTI, V.; DORNELLES, C.M.M. Queda de frutos jovens de citros, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande Do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais....** Pelotas, 1979. p.681-692.

RAID, R.N.; PENNYPACKER, S.P. Weeds as host for *Colletotrichum coccodes*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.71, n.1, p.643-645, 1987.

ROBERTO, S.R.; BORGES, A.V. Efeito do estágio de desenvolvimento das flores e da aplicação de fungicidas no controle da podridão floral dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.306-309, 2001.

SCHWARZ, R.E.; KLEIN, E.H.J.; MONSTED, P. Fungal infection of citrus flowers: probable cause of abnormal fruit drop in Parana mist zone of Misiones, Argentina. In: INTERNATIONAL PLANT PATHOLOGY CONGRESS, 3., 1978, Munich. **Abstract...**Munich: International Plant Pathology Society, 1978. p.130.

SILVA JUNIOR, G.J. **Podridão Floral dos citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença.** 2011. 131p. (Tese Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, Saint Paul, v.77, n.5, p.501-504, 1993.

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose disease of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAM, M.B. (Ed). **Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction.** Saint Paul: American Phytopathological Society, 2000. p.300-316.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in Américas. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, n.4, p.329-334, 1994.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422005000100017&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000100017&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 17 nov. 2011

VICTORIA FILHO, R. Manejo de plantas daninhas em citros no Brasil. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE CITROS. TRATOS CULTURAIS, 5., 1998, Bebedouro, SP. **Anais...** Bebedouro: Fundação Cargill, 1998. p.357-376.

WACULICZ-ANDRADE, C.E. **Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas e da vegetação espontânea.** 2009. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

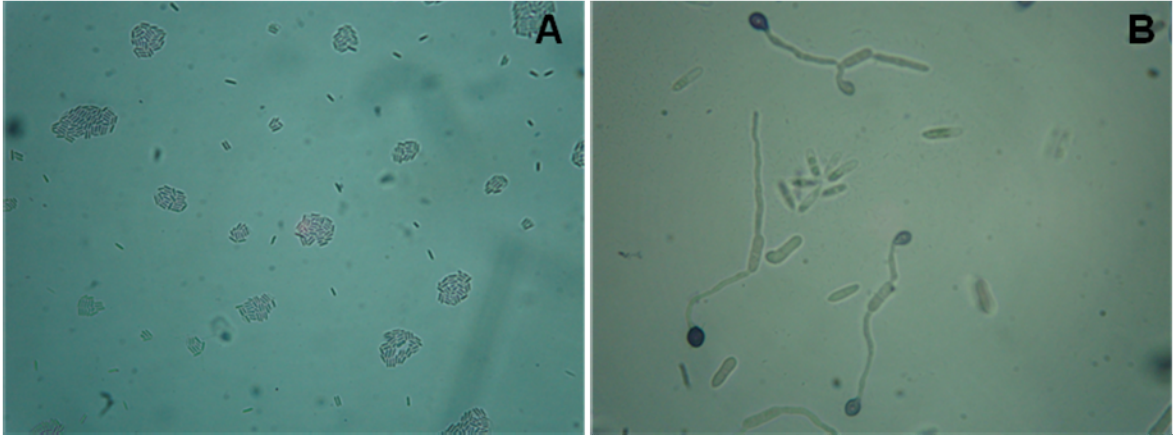
ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, New York, v.88, n.1, p.121-128, 1996.



## APÊNDICES

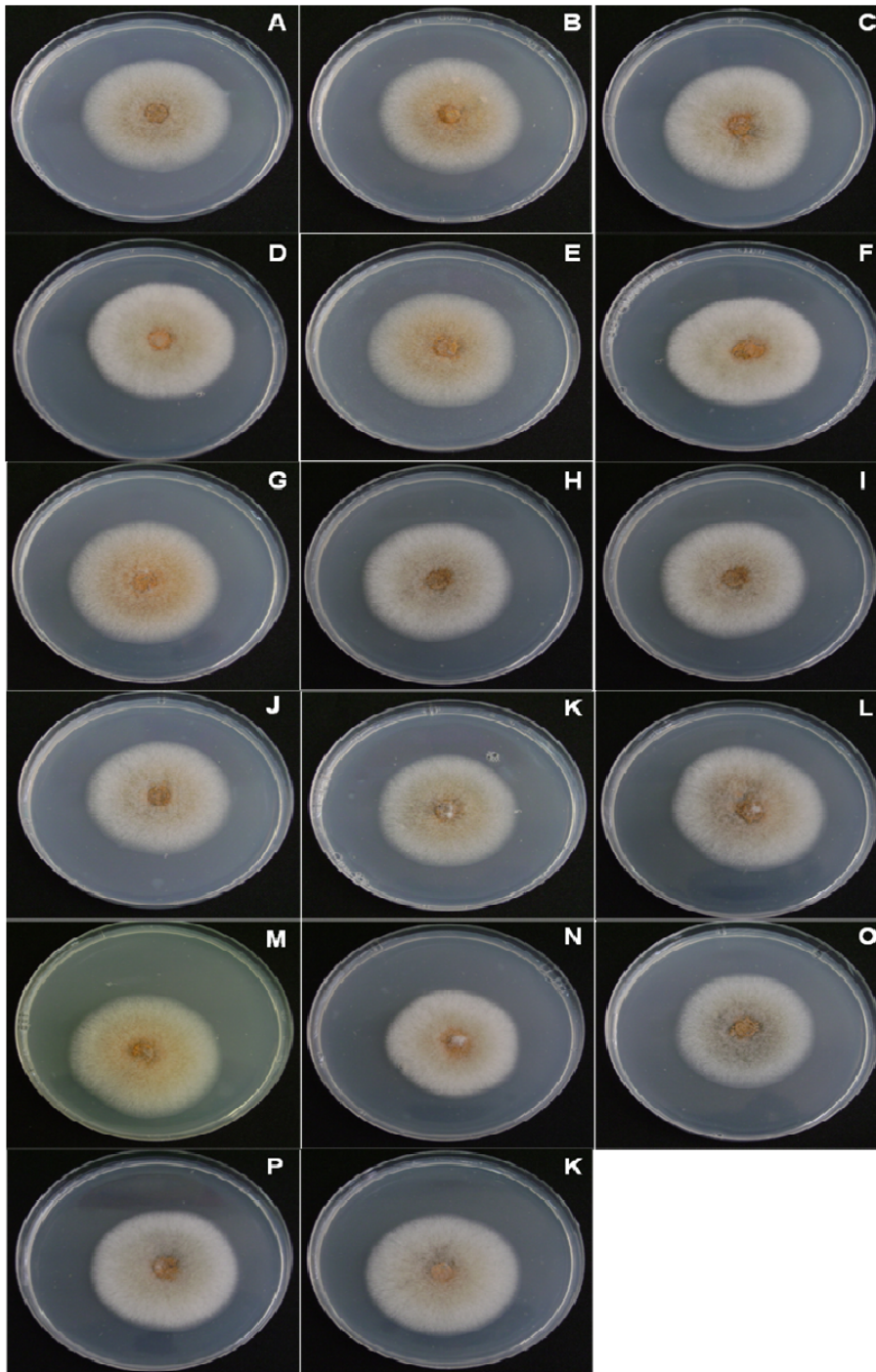


Apêndice A - Teste de germinação de *Colletotrichum acutatum*, em placa de poliestireno, após 36 horas de câmara úmida: (A) conídios aglomerados e não germinados, observados no microscópio óptico - aumento de 100 x e (B) conídios germinados e apressórios formados, observados em microscópio óptico - aumento de 400 x





APÊNDICE B - Colônias de *Colletotrichum acutatum*, isolados das diferentes plantas daninhas após diferentes meses de inoculação crescidos em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar: *C. acutatum* isolado de *Panicum maximum* após 1 (A), 2 (B) e 3 (C) meses; *C. acutatum* isolado de *Brachiaria decumbens* após 1 (D), 2 (E) e 3 (F) meses; *C. acutatum* isolado de *Commelina benghalensis* após 1 (G), 2 (H) e 3 (I) meses; *C. acutatum* isolado de *Digitaria insularis* após 1 (J) e 2 (K) meses; *C. acutatum* isolado de *Cenchrus echinatus* após 1 (L) e 2 (M) meses; *C. acutatum* isolado de *Brachiaria plantaginea* após 1 (N) e 2 (O) meses; *C. acutatum* isolado de *Bidens pilosa* após 1 (P) e 2 (Q) meses



Apêndice C – Isolamentos de *Colletotrichum acutatum* em cada repetição nas sete espécies de plantas daninhas em diferentes meses após a inoculação nos experimentos 1 (Exp1) e 2 (Exp2)

(continua)

Espécie vegetal	Planta	Isolamento*					
		1° mês		2° mês		3° mês	
		Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
<i>Panicum maximum</i>	1	+	+	+	+	S	S
	2	+	+	+	S	S	S
	3	+	+	-	+	S	S
	4	+	-	+	+	S	S
	5	+	+	+	+	+	S
	6	+	+	+	+	S	S
	7	+	+	+	+	S	S
	8	+	+	+	S	+	S
	testemunha	-	-	-	-	-	-
<i>Digitaria insularis</i>	1	+	+	S	+	S	S
	2	+	+	S	+	S	S
	3	+	+	S	S	S	S
	4	+	+	S	+	S	S
	5	-	+	S	+	S	S
	6	+	+	S	S	S	S
	7	-	-	S	S	S	S
	8	+	+	S	S	S	S
	testemunha	-	-	S	-	S	S
<i>Cenchrus echinatus</i>	1	+	+	S	+	S	S
	2	+	+	S	+	S	S
	3	-	+	S	+	S	S
	4	-	+	S	+	S	S
	5	+	+	S	-	S	S
	6	-	+	+	+	S	S
	7	+	+	+	+	S	S
	8	-	+	-	+	S	S
	testemunha	-	-	-	-	S	S
<i>Commelina benghalensis</i>	1	-	+	-	S	-	S
	2	-	+	-	S	+	S
	3	+	+	+	+	+	S
	4	+	-	+	S	+	S
	5	+	+	+	-	S	S
	6	+	-	+	S	-	S
	7	-	+	+	+	S	S
	8	-	-	-	+	-	S
	testemunha	-	-	-	-	-	S

Apêndice C – Resultado dos isolamentos de *Colletotrichum acutatum* nas sete espécies de plantas daninhas em diferentes meses após a inoculação

Espécie vegetal	Planta	(conclusão)					
		Isolamento*					
		1° mês		2° mês		3° mês	
		Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
<i>Brachiaria plantaginea</i>	1	-	-	-	S	S	S
	2	-	+	+	S	S	S
	3	+	+	+	+	S	S
	4	-	S	+	S	S	S
	5	-	S	-	S	S	S
	6	+	+	S	-	S	S
	7	+	+	-	+	S	S
	8				S		S
	testemunha	-	-	-	-	S	S
<i>Brachiaria decumbens</i>	1	+	-	+	+	+	S
	2	+	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	-	-	S
	4	-	+	-	+	+	+
	5	+	+	+	+	S	+
	6	-	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	-	+	+
	8		+		+		+
	testemunha	-	-	-	-	-	-
<i>Bidens pilosa</i>	1	-	+	S	S	S	S
	2	-	+	S	S	S	S
	3	+	+	S	+	S	S
	4	-	+	S	-	S	S
	5	+	+	S	+	S	S
	testemunha	-	-	S	-	S	S

\* + presença e isolamento de *Colletotrichum acutatum*, - ausência de *C. acutatum*, s folhas secas.

Apêndice D – Valores de significância obtidos na análise não paramétrica de Kruskal-Wallis para as diferentes espécies de plantas daninhas no primeiro experimento

Espécie vegetal	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Brachiaria decumbens</i>	<i>Brachiaria plantaginea</i>	<i>Cenchrus echinatus</i>	<i>Commelina benghalensis</i>	<i>Digitaria insularis</i>	<i>Panicum maximum</i>
<i>Bidens pilosa</i>							
	-	0,405 <sup>ns</sup>	0,422 <sup>ns</sup>	0,218 <sup>ns</sup>	0,664 <sup>ns</sup>	0,686 <sup>ns</sup>	0,275 <sup>ns</sup>
<i>Brachiaria decumbens</i>							
	-	-	0,035*	0,029*	0,521 <sup>ns</sup>	0,136 <sup>ns</sup>	0,585 <sup>ns</sup>
<i>Brachiaria plantaginea</i>							
	-	-	-	0,806 <sup>ns</sup>	0,141 <sup>ns</sup>	0,782 <sup>ns</sup>	0,011*
<i>Cenchrus echinatus</i>							
	-	-	-	-	0,083 <sup>ns</sup>	0,633 <sup>ns</sup>	0,009*
<i>Commelina benghalensis</i>							
	-	-	-	-	-	0,365 <sup>ns</sup>	0,265 <sup>ns</sup>
<i>Digitaria insularis</i>							
	-	-	-	-	-	-	0,067 <sup>ns</sup>

\*valores de  $p$  significativos a 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup> valores de  $p$  não significativos a 5% de probabilidade.