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

**Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae e caracterização
do monociclo da podridão apical da goiaba**

Antônio Fernandes Nogueira Júnior

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

**Piracicaba
2012**

Antônio Fernandes Nogueira Júnior
Engenheiro Agrônomo

**Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae e caracterização do
monociclo da podridão apical da goiaba**

Orientadora:
Profª. Drª. **LILIAN AMORIM**

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

**Piracicaba
2012**

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

Nogueira Júnior, Antônio Fernandes

Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae e caracterização do monociclo da podridão apical da goiaba / Antônio Fernandes Nogueira Júnior.- - Piracicaba, 2012.
96 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Fungos fitopatogênicos - Identificação 2. Goiaba 3. Podridão (Doença de planta)
4. Pós-colheita 5. Temperatura 6. Umidade I. Título

CDD 634.421
N778i

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

A Deus, meu porto seguro, guia e companheiro...

OFEREÇO

“Aos meus pais, Antônio Fernandes Nogueira e Maria José Rodrigues Soares Nogueira, e meu irmão Fernando Rodrigo Soares Nogueira, pelo apoio, incentivo e confiança.”

“À Camila Cristina Lage de Andrade, pelo apoio antes e durante toda essa etapa, pelo companheirismo, amor e por ajudar a tornar tudo isso possível!”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado e sempre me socorrer nos momentos difíceis;

À minha família, em especial a Carlos Antônio Nogueira, por sempre me apoiar, escutar e por todos seus conselhos;

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

Ao Dr. Ivan Herman Fischer, pela confiança, apoio e disponibilidade em todas as etapas do trabalho e pela amizade conquistada nesses dois anos;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pelos valiosos ensinamentos e o estímulo ao amadurecimento profissional;

Ao grande companheiro Henrique da Silva Silveira Duarte, por tudo o que me ensinou durante minha graduação e iniciação científica;

À Maisa Boff Ciampi pelos valiosos ensinamentos da biologia molecular;

Ao Prof. Dr. Nelson S. Massola Júnior, pelo apoio e por ceder seu laboratório para a condução do trabalho;

Ao Carlos Augusto Dórea Bragança, pela ajuda incondicional e por todos os ensinamentos repassados;

À Ana Raquel Soares-Colletti, pelo fornecimento de isolados e materiais e por toda a ajuda;

A todos do laboratório de Epidemiologia, estagiários, IC's, Mestrandos, Doutorandos e Pós-doutorandos. Em especial a Alécio Moreira, Júlio Barbosa, Fabrício

Packer Gonçalves e Maria Cândida Gasparoto pelos momentos de descontração, ajuda nos trabalhos e amizade;

Ao meu grande amigo Guilherme Fernando Frare, pelo auxílio na realização dos experimentos, pela amizade, pelos momentos de descontração e força nos momentos difíceis;

A Silvia Lourenço e Ortiz, por toda a ajuda, amizade, pelos bons passeios;

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, pelo excelente convívio e momentos de descontração;

À Fabiana Wolak, pela ajuda, motivação, conselhos e paciência;

A todos os companheiros de república em Piracicaba, Fernando (Sorgo), João, Guilherme (Popeye), Leila e Juan, pelo convívio e amizade;

A todos os amigos de Viçosa e de Florestal, em especial Lucas Faria, Diogo Faria, Arthur Araújo, Pedro Nery, Danival Ricardo, Jonas Alberto e André Campos por todos nossos momentos inesquecíveis;

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho;

Muito Obrigado.

***"You can't always get what you want, but if you try sometimes, you just might
find you get what you need!"***

Keith Richards / Mick Jagger

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	25
2 DESENVOLVIMENTO.....	27
2.1 Revisão Bibliográfica.....	27
2.1.1 A cultura da goiabeira.....	27
2.1.2 Comportamento pós-colheita da goiaba.....	28
2.1.3 Espécies da família Botryosphaeriaceae e a podridão apical	30
2.1.4 Ambiente e doença.....	35
2.2 Material e Métodos.....	37
2.2.1 Origem e obtenção dos isolados de espécies da família Botryosphaeriaceae.....	37
2.2.2 Esporulação, culturas monósporas e preservação dos isolados	38
2.2.3 Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae causadoras da podridão apical em goiabas	39
2.2.3.1 Caracterização morfológica e cultural	39
2.2.3.2 Extração de DNA, amplificação e análises filogenéticas.....	40
2.2.4 Efeito da temperatura no crescimento micelial <i>in vitro</i>	44
2.2.5 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de conídios de espécies de Botryosphaeriaceae <i>in vitro</i>	44
2.2.6 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na infecção e na colonização de espécies de Botryosphaeriaceae em goiabas Kumagai	46
2.3 Resultados	48
2.3.1 Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae causadoras da podridão apical em goiabas	48
2.3.1.1 Caracterização morfológica e cultural	48
2.3.1.2 Extração de DNA, amplificação e análises filogenéticas.....	55
2.3.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial <i>in vitro</i>	57
2.3.3 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de conídios de espécies de Botryosphaeriaceae <i>in vitro</i>	58

2.3.4 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na infecção e na colonização de espécies de Botryosphaeriaceae em goiabas cv. Kumagai	62
3 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICES	93

RESUMO

Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae e caracterização do monociclo da podridão apical da goiaba

Elevados valores de incidência da podridão apical da goiaba vêm sendo observados em levantamentos recentes no Estado de São Paulo. Entretanto, pouco se conhece sobre a etiologia e influência das variáveis ambientais no monociclo dessa doença. O objetivo desse trabalho foi identificar as espécies de Botryosphaeriaceae que causam a podridão apical e estudar as condições ambientais favoráveis, *in vivo* e *in vitro*, para o desenvolvimento do monociclo desses patógenos. Para a identificação das espécies, 56 isolados monospóricos foram obtidos das principais regiões produtoras de goiabas do Estado de São Paulo. Com auxílio da caracterização morfológica e de análises filogenéticas realizadas com dados de sequências de DNA da região ITS e β -tubulina foram identificadas as espécies *Fusicoccum aesculi*, *Neofusicoccum parvum* e *Neofusicoccum ribis*. O crescimento micelial dessas espécies foi avaliado sob as temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C. A germinação de conídios foi avaliada sob temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C com períodos de molhamentos de 4, 6, 12, 24 e 48 horas. Nos experimentos *in vivo* goiabas cv. Kumagai foram inoculadas com suspensões de conídios das três espécies identificadas com auxílio de ferimentos artificiais. Esses frutos foram mantidos sob as temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 °C com períodos de molhamento após a inoculação de 6, 12, 24 e 48 horas. Avaliou-se o período de incubação, o diâmetro da lesão ao sétimo dia após a inoculação e taxa de crescimento da lesão. A temperatura ótima para o crescimento micelial de *N. ribis* foi de 28,2 °C e não houve diferença entre as temperaturas ótimas de *N. parvum* e *F. aesculi*, que foram de aproximadamente 31 °C. A temperatura ótima para germinação dos conídios foi de 30 °C para as três espécies. Houve incremento na germinação com o aumento do período de molhamento e na faixa de temperatura ótima encontram-se valores superiores a 70% de germinação a partir do molhamento de 6 horas. A espécie *F. aesculi* alcança elevados valores de germinação a 40 °C em períodos de molhamento superiores a 12 horas. A temperatura ótima para o crescimento da lesão foi de aproximadamente 30 °C para as três espécies e o período molhamento de 48 horas proporcionou um aumento na severidade da doença quando comparado com o molhamento de 6 horas. Os menores períodos de incubação foram obtidos na temperatura de 30 °C e com períodos de molhamento de 48 horas após a inoculação. Não houve diferença entre os valores das taxas de crescimento da lesão das três espécies e média das taxas das três espécies foi de 0,4. A doença se desenvolveu melhor em condições de temperaturas elevadas e períodos prolongados de umidade. Esse é o primeiro relato de *Neofusicoccum parvum* e *Neofusicoccum ribis* associados à podridão apical no Brasil.

Palavras-chave: *Psidium guajava*; *Fusicoccum aesculi*; *Neofusicoccum parvum*; *Neofusicoccum ribis*; Temperatura; Umidade

ABSTRACT

Identification of Botryosphaeriaceae species and characterization of monocycle of stylar-end rot of guava

Increased incidence of stylar-end rot in guava fruits have been observed in the São Paulo State – Brazil. However, little is known about its etiology and the influence of environment variables on the monocycle of this disease. This study aimed to identify Botryosphaeriaceae species that cause stylar-end rot in guava and to analyze the favorable environment conditions, *in vitro* and *in vivo*, for the monocycle development of this pathogen. We used 56 monosporic isolates from diseased fruit from guava producing regions from the São Paulo State – Brazil. The morphological and phylogenetic analyses performed with sequence data of the ITS region and β -tubulin allowed to identify the species *Fusicoccum aesculi*, *Neofusicoccum parvum* and *Neofusicoccum ribis*, as causal agents of the disease. The mycelial growth was evaluated at 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 °C. Conidial germination was evaluated at 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 °C with wetness periods of 4, 6, 12, 24 and 48 hours. In the *in vivo* experiments, guavas cv. Kumagai were inoculated with conidial suspensions of the three species identified by artificial wounds. The fruits were kept at 15, 20, 25, 30 and 35 °C with wetness periods of 6, 12, 24 and 48 hours after inoculation. We evaluated the incubation period, the lesion diameter on the seventh day after inoculation and the lesion growth rate. The optimum temperature for mycelial growth of *N. ribis* was 28.2 °C and there was no difference between the optimal temperatures (approximately 31 °C) for *N. parvum* and *F. aesculi*. The optimal temperature for conidial germination was 30 °C for the three species. There was an increase in germination with the increase of the wetness period. Within the optimal temperature range, values were higher 70% of germination after a wetness period of 6 hours. *F. aesculi* reached high germination values at 40 °C in wetness periods exceeding 12 hours. The optimal temperature for lesion growth rate was approximately 30 °C for the three pathogens and the wetness period of 48 hours caused higher disease severity as compared with the wetness period of 6 hours. The shortest incubation periods were obtained at 30 °C with wetness periods of 48 hours. There was no difference between lesion growth rate for the three species and the average rate for three pathogens was 0.4/day. The best conditions for the disease development are high temperatures and prolonged periods of moisture. This is the first report of *Neofusicoccum parvum* and *Neofusicoccum ribis* associated with stylar-end rot of guava fruits in Brazil.

Keywords: *Psidium guajava*; *Fusicoccum aesculi*; *Neofusicoccum parvum*; *Neofusicoccum ribis*; Temperature; Wetness period

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Frutos selecionados de acordo com o estágio de maturação e secos a temperatura ambiente após a lavagem com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (A). Potes com 12 frutos, cada pote consistiu de uma combinação temperatura x molhamento(B). Fruto inoculado com uma alíquota de 50 µL da suspensão de conídios (C)..... 48
- Figura 2 - Presença de micélio branco, aéreo e cotonoso nas colônias de *Fusicoccum aesculi* (A) e *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* (B) aos 3 dias. Colônias com 7 dias de *Fusicoccum aesculi* (C) e *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* (D), apresentando micélio cinza e cinza escuro na região central. Micélio aéreo abundante principalmente na colônia de *Fusicoccum aesculi*. Verso da colônia de *Fusicoccum aesculi* (E) com pontuações negras, indicadas pela seta, correspondentes aos picnídios do fungo. Verso da colônia de *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* (F) de coloração negra..... 50
- Figura 3 - Conídios hialinos, fusiformes e asseptados de *Fusicoccum aesculi* (A e C). Conídio maduro, castanho e septado de *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* (B e D)..... 51
- Figura 4 - Árvore construída por inferência bayesiana do alinhamento combinado das sequências de ITS e β - tubulina, enraizada com o *Bionectria* sp. Ramificações com mais de 75% de probabilidade posterior bayesiana estão representados acima dos ramos. Os isolados obtidos no presente trabalho residem nos clado I, II e III..... 56
- Figura 5 - Diâmetro da colônia em meio BDA ao 4º dia após a repicagem em função da temperatura, nos ensaios 1 (círculos cheios) e 2 (círculos vazios) para *Neofusicoccum ribis* (A), *Neofusicoccum parvum* (B) e

Fusicoccum aesculi (C). Linhas correspondem à função beta generalizada ajustada aos dados. 57

Figura 6 - Conídios germinados de *Neofusicoccum parvum* (A, D), *Neofusicoccum ribis* (B, E) e *Fusicoccum aesculi* (C, F) na temperatura de 25 °C e 24 horas de período de molhamento, observados ao microscópio óptico nos aumentos de 100X (A, B, C) e 400X (D, E, F).. 59

Figura 7 - Superfície de resposta de germinação de conídios de *Neofusicoccum ribis* em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação $Z=0,99*(((X-7,14)/(30,36-7,14))^{0,60*(30,36-7,14)/(40-30,36)}*((40-X)/(40-30,36))^{0,60}*(1*(1-3*\exp(-0,5*Y)))$, onde Z é a germinação (proporção), T é a temperatura (°C) e M é o período de molhamento (horas). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e círculos brancos dados do segundo experimento. 60

Figura 8 - Superfície de resposta de germinação de conídios de *Neofusicoccum parvum* em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação $Z=0,93*(((X-4,99)/(30,42-4,99))^{0,97*(30,42-4,99)/(40,05-30,42)}*((40,05-X)/(40,05-30,42))^{0,97}*(1,17*(1-1,17*\exp(-0,39*Y)))$, onde Z é a germinação (proporção), T é a temperatura (°C) e M é o período de molhamento (horas). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e círculos brancos dados do segundo experimento. 61

Figura 9 - Superfície de resposta de germinação de conídios de *Fusicoccum aesculi* em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação $Z=0,72*(((X-4,99)/(30,45-4,99))^{0,28*(30,45-4,99)/(40,78-30,45)}*((40,78-X)/(40,78-30,45))^{0,28}*(1,5*(1-0,67*\exp(-0,17*Y)))$, onde Z é a germinação (proporção), T é a temperatura (°C) e M é o período de molhamento (horas). Círculos

pretos representam dados do primeiro experimento e círculos
brancos dados do segundo experimento.....61

Figura 10 - Diâmetro das lesões da podridão apical (cm) aos 7 dias após a
inoculação causadas por *Neofusicoccum ribis* em goiabas cv.
Kumagai no estágio casca parcialmente amarela, sob diferentes
temperaturas e períodos de molhamento de 6 horas (A), 12 horas
(B), 24 horas (C) e 48 horas (D). Círculos vazios são referentes ao
experimento 1 e círculos cheios ao experimento 2 64

Figura 11 - Diâmetro das lesões da podridão apical (cm) aos 7 dias após a
inoculação causadas por *Neofusicoccum parvum* em goiabas cv.
Kumagai no estágio casca parcialmente amarela, sob diferentes
temperaturas e períodos de molhamento de 6 horas (A), 12 horas
(B), 24 horas (C) e 48 horas (D). Círculos vazios são referentes ao
experimento 1 e círculos cheios ao experimento 2.. 64

Figura 12 - Diâmetro das lesões da podridão apical (cm) aos 7 dias após a
inoculação causadas por *Fusicoccum aesculi* em goiabas cv.
Kumagai no estágio casca parcialmente amarela, sob diferentes
temperaturas e períodos de molhamento de 6 horas (A), 12 horas
(B), 24 horas (C) e 48 horas (D). Círculos vazios são referentes ao
experimento 1 e círculos cheios ao experimento 2. 65

Figura 13 - Goiabas cv. Kumagai 10 dias após a inoculação de *Neofusicoccum
ribis*. A, B, C e D correspondem à temperatura de 15 °C e
molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. E, F, G e H
correspondem à temperatura de 20 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e
48 horas, respectivamente. I, J, K e L correspondem à temperatura
de 25 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente.
M, N, O e P correspondem à temperatura de 30 °C e molhamentos
de 6, 12, 24 e 48 horas ,respectivamente. Q, R, S e T correspondem
à temperatura de 35 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas,
respectivamente 66

Figura 14 - Goiabas cv. Kumagai 10 dias após a inoculação de *Neofusicoccum parvum*. A, B, C e D correspondem à temperatura de 15 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. E, F, G e H correspondem à temperatura de 20 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. I, J, K e L correspondem à temperatura de 25 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. M, N, O e P correspondem à temperatura de 30 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Q, R, S e T correspondem à temperatura de 35 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente..... 67

Figura 15 - Goiabas cv. Kumagai 10 dias após a inoculação de *Fusicoccum aesculi*. A, B, C e D correspondem à temperatura de 15 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. E, F, G e H correspondem à temperatura de 20 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. I, J, K e L correspondem à temperatura de 25 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. M, N, O e P correspondem à temperatura de 30 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Q, R, S e T correspondem à temperatura de 35 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente..... 68

Figura 16 - Curvas de progresso do crescimento da lesão, ajustadas pelo modelo monomolecular, de *Neofusicoccum ribis* (A), *Neofusicoccum parvum* (B) e *Fusicoccum aesculi* (C) em goiabas cv. Kumagai inoculadas no estágio de maturação 4 e mantidas a 30 °C e com período de molhamento de 48 horas após a inoculação. 73

Figura 17 - Esporo germinado de *Fusicoccum aesculi* penetrando um estômato em goiabas da cv. Kumagai. Foto: Molina (2012), dados não publicados..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Local de origem, identificação e ano de coleta dos 56 isolados de espécies de Botryosphaeriaceae utilizados no trabalho.....	38
Tabela 2 - Sequências de isolados de Botryosphaeriaceae disponíveis no GenBank e utilizadas no estudo de filogenia.....	42
Tabela 3 - Dimensões dos conídios dos 56 isolados de Botryosphaeriaceae obtidos entre 2006 e 2012 de goiabas coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo. As médias representam valores de 50 conídios de cada isolado	52
Tabela 4 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*(((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot)}*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3})$ onde Y é o diâmetro da colônia ao 4º dia de avaliação, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimadas pelo modelo. B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da colônia de <i>Neofusicoccum ribis</i> , <i>Neofusicoccum parvum</i> e <i>Fusicoccum aesculi</i> atingido no 4º dia após a repicagem para o meio BDA.	58
Tabela 5 – Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada-monomolecular $[Z=Zot*(((T-Tmin)/(Tot-Tmin))^{B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot)}*((Tmax-T)/(Tmax-Tot))^{B3}*(B6*(1-B7*exp(-B8*M))))$ onde Z é germinação, Zot é o valor máximo da germinação, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima. B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica, B8 está relacionado à velocidade de aumento da germinação em função do período de molhamento e B6 e B7 são parâmetros do modelo. T é a temperatura em °C e M o período de molhamento] ajustada à	

germinação de conídios das três espécies em estudo (*N. ribis*,
N. parvum e *F. aesculi*)..... 62

Tabela 6 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{(B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot))}*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3}]$ onde Y é o diâmetro da lesão, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimadas pelo modelo, B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por *Neofusicoccum ribis* em goiabas cv. Kumagai, 7 dias após a inoculação, nos diferentes períodos de molhamento 69

Tabela 7 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{(B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot))}*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3}]$ onde Y é o diâmetro da lesão, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimadas pelo modelo, B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por *Neofusicoccum parvum* em goiabas cv. Kumagai, 7 dias após a inoculação, nos diferentes períodos de molhamento 69

Tabela 8 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{(B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot))}*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3}]$ onde Y é o diâmetro da lesão, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimadas pelo modelo, B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por *Fusicoccum aesculi* em goiabas cv. Kumagai, 7 dias após a inoculação, nos diferentes períodos de molhamento 70

Tabela 9 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*(((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{(B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot))}*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3})$ onde Y é o diâmetro da lesão, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimada pelo modelo, B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por <i>Neofusicoccum ribis</i> , <i>Neofusicoccum parvum</i> e <i>Fusicoccum aesculi</i> em goiabas cv. Kumagai, 7 dias após a inoculação, inoculadas sob as condições de 30 °C e 48 horas de período de molhamento.....	70
Tabela 10 - Período de incubação de <i>Neofusicoccum ribis</i> , em dias, nos períodos de molhamento de 6, 12, 24 e 48 horas e nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C.....	72
Tabela 11 - Período de incubação de <i>Neofusicoccum parvum</i> , em dias, nos períodos de molhamento de 6, 12, 24 e 48 horas e nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C.....	72
Tabela 12 - Período de incubação de <i>Fusicoccum aesculi</i> , em dias, nos períodos de molhamento de 6, 12, 24 e 48 horas e nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C.....	72
Tabela 13 - Coeficiente de determinação (R^2) e parâmetros estimados pelo modelo monomolecular $[Y= 1- (1- Yo)*exp(-rt)]$, onde Y é diâmetro da lesão, Yo é o inóculo inicial, r a é taxa de crescimento da lesão e T é o tempo em dias após a inoculação] ajustado ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por <i>Neofusicoccum ribis</i> , <i>Neofusicoccum parvum</i> e <i>Fusicoccum aesculi</i> em goiabas cv. Kumagai inoculadas e mantidas a 30 °C e com um período de 48 horas de molhamento após a inoculação.....	73

1 INTRODUÇÃO

O cultivo da goiabeira (*Psidium guajava* L.) vem crescendo de forma expressiva no território brasileiro. A área cultivada com essa fruteira no Brasil praticamente dobrou no período entre 1992 a 2008, passando de 7,9 mil para 15,6 mil hectares plantados. Houve um significativo aumento também na produção de goiabas que passou de 160.194 em 1999 para 298.797 t em 2008, ressaltando que a produção média por hectare aumentou de 13 para 20 t nesse período. Esse incremento na produtividade é devido a uma melhor perspectiva de preço pelos produtores, o que acarretou um maior investimento e tecnificação na cultura (PIEDEDE NETO, 2002; FNP, 2011). O Estado de Pernambuco é o maior produtor de goiabas do País seguido pelo Estado de São Paulo, responsável por 30% da produção nacional, destinada tanto ao consumo *in natura* (30%) quanto à indústria (70%) (FNP, 2011).

A goiaba é uma fruta que apresenta alta perecibilidade. O período de comercialização dessa fruta está em torno de 8 dias (MOWLAH; ITOO, 1983) e visando a expansão do comércio para o consumo *in natura* é necessário que se melhore a qualidade e a conservação dos frutos após a colheita (OJEDA, 2001; AZZOLINI, 2002). Essa alta perecibilidade, juntamente com manejos inadequados na pós-colheita, dificulta a comercialização dos frutos em mercados distantes dos locais de produção (AZZOLINI, 2002).

Dois importantes fatores na pós-colheita reduzem a qualidade dos frutos: as injúrias mecânicas e as doenças pós-colheita. As injúrias mecânicas aceleram o amadurecimento e reduzem o período de comercialização e as doenças pós-colheita são altamente depreciadoras dos frutos, pois alteram sua consistência cor e sabor (CHITARRA; CHITARRA 2005; KLUGE et al., 2002; MARTINS et al., 2007).

Dentre as principais doenças pós-colheita da goiaba destacam-se a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Pens) Pens & Sacc e *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, a pinta preta, causada por *Guignardia psidii* Ullasa e Rawal e a podridão parda ou podridão apical, causada por fungos da família Botryosphaeriaceae. Existem poucos estudos acerca da última doença citada e aspectos de importância primária, como sua etiologia, ainda não estão esclarecidos. A própria nomenclatura da doença ainda necessita de padronização. Na Venezuela essa doença é conhecida por podridão marrom do fruto ou podridão apical, no México como podridão apical e no Brasil a essa doença vem recebendo várias

denominações como podridão parda, podridão de *Fusicoccum* sp. e quando associada a troncos e frutos cancro de *Botryosphaeria* (HOLLIDAY, 1980; ROBBS; ALMEIDA; PIMENTEL, 1980; CEDEÑO et al., 1998; VENTURA; COSTA, 2003; JIMENEZ; SANTOS, 1992). No presente trabalho essa doença será denominada como podridão apical.

Todas as espécies atribuídas como causa da podridão apical da goiaba são pertencentes à família Botryosphaeriaceae, e apresentam-se filogeneticamente próximas e morfologicamente similares ao gênero *Fusicoccum*, que tem como teleomorfo o gênero *Botryosphaeria*. A taxonomia dessa família é complexa, e há certa dificuldade em determinar os limites de espécies dentre esses indivíduos (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Crous et al. (2006) propuseram uma reclassificação dentro dessa família e parecem ter esclarecido a maioria das dúvidas desse grupo. Entretanto muitas espécies apresentam caracteres morfológicos idênticos e são diferenciadas apenas com ferramentas moleculares baseadas no DNA (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Assim como a etiologia é pouco conhecida, não existem informações sobre aspectos básicos do monociclo da podridão apical da goiaba, como período de incubação e a influência de variáveis ambientais no desenvolvimento dos sintomas.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos identificar as principais espécies de Botryosphaeriaceae que causam a podridão apical da goiaba e estudar as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento do monociclo desses patógenos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da goiabeira

A goiabeira é originária da região tropical americana, estando presente desde o sul do México até o sul do Brasil. Taxonomicamente a goiabeira pertence à família Myrtaceae, gênero *Psidium* e espécie *Psidium guajava* L. A família Myrtaceae possui mais de 70 gêneros e mais de 2800 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (COSTA; PACOVA, 2003; PEREIRA, 1995). O gênero *Psidium* possui mais de 150 espécies sendo a goiabeira a de maior importância econômica (COSTA; PACOVA, 2003).

As árvores são de pequeno a médio porte, geralmente de 3 a 6 metros de altura, podendo atingir 9 metros de altura quando conduzidas sem poda. É uma planta perene com renovação das folhas no início da primavera (COSTA; PACOVA, 2003). Os troncos das árvores são tortuosos, com casca lisa e delgada que se desprende quando as plantas estão mais velhas. As flores são hermafroditas, com o androceu formado por mais de 300 estames e gineceu simples com 1,5 cm de comprimento. Os frutos são do tipo bagos globosos, com tamanho, forma e coloração da polpa que variam de acordo com a cultivar (MANICA et al., 2000). O peso dos frutos varia devido a fatores genéticos e tratos culturais podendo-se encontrar frutos com 50 até 750 gramas. O principal meio de propagação comercial é por mudas produzidas por enxertia ou estaquia e estas iniciam o processo de floração com 7 a 8 meses de idade após o transplante para o local definitivo (COSTA; PACOVA, 2003).

O Brasil é considerado um dos maiores produtores de goiaba no mundo, juntamente com a Índia, Paquistão, México, Venezuela e Austrália (SANTOS-FRANCISCO; BAPTISTELLA; AMARO, 2005). A produção em escala no Brasil começou por volta de 1970, com fruticultores de origem japonesa estabelecidos nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Esses produtores utilizavam pequenas áreas, porém com técnicas avançadas e produtivas como a seleção de cultivares, poda, raleio e o ensacamento de frutos. O esforço desses produtores, aliado com essas técnicas, resultou em grande retorno econômico mesmo em pequenas áreas, proporcionando a adesão de novos produtores. Durante a década de 80 os mesmos

produtores japoneses continuaram a selecionar cultivares que apresentassem boas características agronômicas como resistência a doenças, facilidades na condução e frutos de melhor conservação e saborosos. Esse persistente trabalho deu origem a variedades que são cultivadas até hoje em todo o território nacional tais como Kumagai, Sassaoka, Ogawa nº 1, 2 e 3, Pedro Sato, Cascuda de Pariquera-Açu e Iwao. Também durante a década de 80, a Universidade Estadual Paulista lançou as cultivares Paluma e Rica (WATANABE, 2009). Da década de 1990 até fins da década de 2010, a cultura cresceu de forma expressiva, dobrando sua área cultivada no País. Os principais Estados produtores de goiaba no Brasil são Pernambuco e São Paulo, com 96.733 e 89.772 toneladas em 2008, respectivamente, perfazendo em média 80% da produção brasileira (FNP, 2011). No Estado de São Paulo, a produção destina-se tanto para o consumo *in natura*, quanto à industrialização. As regiões mais próximas à capital (Valinhos, Campinas, Vinhedo, Atibaia e Mogi das Cruzes) produzem frutos que visam o consumo *in natura*, já os municípios de Taquaritinga, Monte Alto, Itápolis, Urupês, Vista Alegre do Alto e São Carlos produzem goiabas para industrialização ou com dupla finalidade (PEREIRA, 1986).

A cultivar Pedro Sato é a goiaba de polpa vermelha mais plantada no Estado de São Paulo. Essa cultivar, selecionada no Estado do Rio de Janeiro, apresenta frutos grandes, de casca rugosa, formato oblongo, polpa rosada, espessa e com poucas sementes (MANICA et al., 2000). No ano de 2009 foram comercializadas 10.048 toneladas de goiabas vermelhas na CEAGESP-SP (FNP, 2011). Outra cultivar muito difundida no Estado de São Paulo é a Kumagai, que apresenta polpa de coloração branca e foi obtida de uma seleção realizada na região de Campinas, SP, resultado do cruzamento da goiabeira 'Australiana' com a goiabeira 'IAC-4' (MANICA et al., 2000). Os frutos dessa cultivar exalam um aroma discreto e são muito apreciados no consumo *in natura*, também apresentam uma melhor conservação em pós-colheita que os frutos das demais cultivares (PIZA Jr.; KAVATI, 1994). No ano de 2009 o volume de goiaba de polpa branca comercializada na CEAGESP-SP foi de 1.213 toneladas (FNP, 2011).

2.1.2 Comportamento pós-colheita da goiaba

Os frutos podem ser classificados como climatéricos e não-climatéricos dependendo do seu padrão respiratório durante o amadurecimento. Os climatéricos

apresentam aumento na produção de etileno e um alto incremento na respiração durante o amadurecimento que pode ocorrer na planta ou após a colheita. Os frutos que apresentam essa característica podem ser colhidos a partir maturidade fisiológica. Essa fase é definida como o estágio do desenvolvimento em que a fruta continua sua ontogenia mesmo após ser destacada da planta (WATADA et al., 1984; WILLS et al., 1998). Já os frutos não-climatéricos não apresentam nenhuma alteração na sua composição após a colheita, seu amadurecimento completo só ocorre com a permanência dos mesmos na planta. Esses frutos devem ser colhidos quando completarem seu desenvolvimento e estiverem com o máximo de qualidades organolépticas (CHITARRA; CHITARRA, 2005; McGLASSON, 1985; RODES, 1980).

Porém, essa classificação nem sempre pode ser aplicada a frutos tropicais (CHITARRA; CHITARRA, 2005). A goiaba parece estar enquadrada nessa situação, pois existem resultados de trabalhos sobre o processo respiratório que classificam esse fruto tanto como climatérico como não-climatérico (BIALE; BARCUS, 1970; MEDINA et al., 1988; AKAMINE; GOO, 1979; BROWN; WILLS, 1983; OLIVEIRA 1996; MERCADO-SILVA et al., 1998). Além disso, outros resultados mostram que essa característica pode variar dentro das cultivares de goiaba (BOTELHO, 1996). No geral, o que se observa é um aumento na taxa respiratória e na produção de etileno da goiaba após sua colheita, sendo que a variedade 'Pedro Sato' apresenta maiores valores na taxa respiratória do que a variedade Kumagai (AZZOLINI et al., 2005).

O estágio de maturação em que a goiaba é colhida é determinante para a obtenção de frutos de boa qualidade e para se prolongar o período de comercialização. Para a goiaba cv. Kumagai são utilizados cinco estádios de maturação com base na coloração da casca: estágio 1 – cor da casca verde-escura ($^{\circ}\text{h} = 118$); estágio 2 – quebra da cor verde ($^{\circ}\text{h} = 117-116$); estágio 3 - início da coloração amarela da casca ($^{\circ}\text{h} = 115-113$); estágio 4 – casca parcialmente amarela ($^{\circ}\text{h} = 112$); estágio 5 – frutos com a cor da casca totalmente amarela ($^{\circ}\text{h} = 111$) (CAVALINI et al., 2006). Para a obtenção dos ângulos de cor ($^{\circ}\text{h}$) são utilizados colorímetros digitais. Outros índices de maturação que auxiliam a diferenciar os cinco estádios são: firmeza da polpa determinada por penetrômetro e expressa em Newton e a relação sólidos solúveis totais/acidez total titulável ($^{\circ}$ Brix) determinada por refratômetros.

A goiaba apresenta alta perecibilidade e as perdas pós-colheita podem chegar a 40%, já a partir do terceiro dia de armazenamento (FISCHER et al., 2011). A perecibilidade e o tempo de armazenamento dos frutos são influenciados pela taxa respiratória, pela produção de etileno, por fatores genéticos dos frutos, por distúrbios fisiológicos e, principalmente, pela ocorrência de podridões (KLUGE et al., 2002; AZZOLINI; JACOMINO; BRON, 2004).

Uma considerável proporção de goiabas pode ser destruída por doenças caso não se adote alguma medida de controle. O apodrecimento pela ação dos patógenos aumenta a produção de etileno nos frutos e acelera o processo de amadurecimento, com consequente redução da vida útil dos frutos (OJEDA, 2001). Outro fator relevante é o fato de que os principais fungos causadores de podridões em goiabas apresentam um padrão de infecção do tipo quiescente, ou seja, as infecções se iniciam no campo, porém o fungo fica em um estágio dormente, sem manifestar nenhum sintoma, até que o fruto inicie o amadurecimento e a relação parasítica torne-se ativa (PRUSKY; PLUMBLEY, 1992). A incidência de doenças quiescentes, principalmente pinta-preta (*G. psidii*), antracnose (*Colletotrichum* spp.) e podridão apical em goiabas comercializadas na CEAGESP-SP chega a 7,7% durante a comercialização dos frutos ensacados (MARTINS et al., 2007). Em frutos provenientes de pomares do Centro Oeste paulista e armazenados por nove dias a 25°C, a incidência de podridões atinge valores superiores a 70%, causadas principalmente por antracnose e pinta preta e podridão apical (FISCHER et al., 2011).

Em outros países como a Venezuela a podridão apical chega a causar até 80% de perda dos frutos nos meses de dezembro a abril na região da Zulia (CEDEÑO et al., 1998, VENTURA; COSTA, 2003). No México essa doença chega a atingir 30% de incidência nos frutos (SANTOS; CARVAJAL; MONTIEL, 1993).

2.1.3 Espécies da família Botryosphaeriaceae e a podridão apical

A família Botryosphaeriaceae está inserida na ordem Botryosphaerales, classe Dothiomycetes e no filo Ascomycota. Atualmente mais de 2000 taxa estão ligados a essa família, sendo os gêneros *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* e *Sphaeropsis* os que contêm a maioria das espécies (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). A taxonomia de gêneros e espécies dessa família foi confusa

durante muito tempo, entretanto com o recente uso de ferramentas moleculares, pesquisadores têm esclarecido a grande maioria das dúvidas taxonômicas dentro desse grupo de fungos (SLIPPERS et al., 2004; CROUS et al., 2006).

Crous et al. (2006), propuseram 12 clados diferentes para a família Botryosphaeriaceae. Várias mudanças foram propostas nesse grupo, os gêneros *Diplodia* e *Lasiodiplodia* ficaram num mesmo clado e sem teleomorfo definido. *Diplodia* apresenta conídios hialinos, que podem ser septados e pigmentados quando maduros, de parede grossa. A característica marcante que permite diferenciar *Lasiodiplodia* de *Diplodia* é a presença de conídios ornamentados com estrias longitudinais em *Lasiodiplodia*. Em outro clado ficou a espécie tipo dos Botryosphaeriaceae: *Botryosphaeria dothidea* e seu anamorfo *Fusicoccum aesculi*, agrupado com outras espécies, como *B. mamane* (D.E. Gardner) e *B. corticis* (Demaree e Wilcox) Arx e E. Mull). O gênero *Fusicoccum* caracteriza-se por apresentar conídios hialinos, fusiformes a elípticos, com parede delgada e normalmente asseptados (PHILLIPS, 2004). No clado de número 6, aparecem espécies que possuem teleomorfo tipo *Botryosphaeria* e anamorfo *Neofusicoccum* gen. nov. (Crous, Slippers e A.J.L. Phillips). Esse gênero se diferencia do gênero *Fusicoccum* por apresentar espécies que possuem conídios escuros ou de formato globoso a piriforme, além de sequências de DNA diferentes das sequências da espécie tipo *Fusicoccum aesculi*. De acordo com Crous et al. (2006), os teleomorfos de *Neofusicoccum* são similares a espécies de *Botryosphaeria*, diferindo apenas nas sequências de DNA, sendo proposto que se denomine esses teleomorfos de *Botryosphaeria-like* ou simplesmente “*Botryosphaeria*”, até que surjam novas classificações.

O gênero *Botryosphaeria* é um dos mais importantes dentro da família e contém a espécie tipo desse grupo (*Botryosphaeria dothidea*). Esse gênero foi inicialmente descrito por Cesati e De Notaris em 1863 e revisado por Saccardo em 1877. Von Arx e Müller (1954) reduziram um grande número de espécies a sinônimas de *Botryosphaeria quercuum* e *Botryosphaeria dothidea*. Slippers et al. (2004) e Crous et al. (2006) realizaram os últimos trabalhos taxonômicos nesse gênero. (PHILLIPS et al., 2005; SLLIPERS; WINGFIELD, 2007).

Representantes desse gênero produzem ascus bitunicados em ascostromas (Loculoascomicetos) produzidos em tecido estromático denominado pseudotécio. Os

ascósporos são hialinos, unicelulares e variam de fusóide, elipsóide a ovóide, tornando-se, em algumas espécies, marrons e com 1 a 2 septos (PHILLIPS, 2004).

Vários gêneros anamorfos dentro da família Botryosphaeriaceae têm sido relatados: *Botryodiplodia* (Sacc.), *Diplodia* Fr. in Mont., *Dothiorella* Sacc., *Fusicoccum* Corda in Sturm., *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophoma* (Sacc) Berl. & Voglino., *Phyllosticta* Pers., *Sphaeropsis* e *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (JACOBS; REHNER, 1998; SLIPPERS et al., 2004). Os conídios apresentam maior diversidade de tamanho, forma, cor, septação e maturação quando comparados aos ascósporos, e essas características são utilizadas como caracteres morfológicos para identificação de espécies (SLIPPERS et al., 2004; CROUS et al., 2006; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

O crescimento micelial em meio de cultura artificial de espécies de Botryosphaeriaceae é uma boa característica que permite diferenciar espécies dessa família daquelas dos demais fungos. Normalmente apresentam micélio de coloração cinza a preto, aéreo e em algumas espécies é possível detectar a liberação de pigmentos que se difundem no meio de cultura (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Entretanto, a identificação de espécies dentro da família é muito difícil, pois muitas vezes os caracteres morfológicos se sobrepõem (MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2006). Técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para auxiliar na identificação dessas espécies, dentre as quais destacam-se os marcadores moleculares como RAPD (amplificação randômica de DNA polimórfico), RFLP (polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) e microssatélites (JACOBS; REHNER, 1998; CROUS et al., 2006). No entanto, essas técnicas nem sempre podem diferenciar com precisão as espécies de Botryosphaeriaceae, sendo necessária a realização de estudos filogenéticos, nos quais dados de sequências do DNA e morfológicos são utilizados conjuntamente para a diferenciação precisa das espécies (SLIPPERS et al., 2004). Assim, análises filogenéticas utilizando sequências de nucleotídeos da região ITS (espaçador interno transcrito), β -tubulina e fator de elongação (EF1- α) têm sido largamente utilizadas para elucidar a taxonomia dessa família, e juntamente com caracteres morfológicos têm-se tornado uma ferramenta poderosa na separação de espécies e também na reavaliação da classificação dos anamorfos de Botryosphaeriaceae. (JACOBS; REHNER, 1998; SLIPPERS et al., 2004, 2005,

2007; PHILLIPS et al., 2005; MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2006; ÚRBEZ-TORRES et al., 2008).

Vários *primers* específicos vêm sendo desenvolvidos para rápida e precisa identificação dessas espécies, entretanto o desenvolvimento de *primers* que diferenciem espécies muito próximas como *Neofusicoccum parvum* e *Neofusicoccum ribis* ainda não foi possível (RIDGWAY et al., 2011; NI et al., 2012).

Espécies da família Botryosphaeriaceae são consideradas cosmopolitas, possuindo uma ampla gama de hospedeiros (TAVARES, 2002; SLIPPERS et al., 2005; CROUS et al., 2006). Essas espécies estão associadas, normalmente, a plantas de porte arbóreo, causando cancrios nos lenhos das árvores. Vários autores já relataram a ocorrência de espécies de Botryosphaeriaceae em mangueira (*Mangifera indica* L.), abacateiro (*Persea americana* Mill.), aceroleira (*Malpighia glabra* L.), bananeira (*Musa* spp.), citros (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), goiabeira, mamoeiro (*Carica papaya* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims.), meloeiro (*Cucumis melo* L.), videira (*Vitis* sp.), pessegueiro (*Prunus* sp.), dentre outras (TAVARES, 2002; SLIPPERS et al., 2005; ÚRBEZ-TORREZ et al., 2008, THOMIDIS; MICHAILIDES; EXADAKYTLOU, 2011).

Esses patógenos utilizam ferimentos, lenticelas, estômatos e outras aberturas naturais como porta de entrada para estabelecimento de suas infecções (BROWN; HENDRIX, 1981; KIM; PARK; AHN, 1999; MICHAILIDES, 1991). A infecção em frutos é muito comum, e pode ocorrer através de aberturas naturais ou até mesmo diretamente através da formação de apressórios. Normalmente esses patógenos infectam os frutos e ficam em estágio de quiescência, até que níveis de açúcares dos frutos aumentem durante o período de amadurecimento, surgindo então sintomas de podridões (KIM et al., 2001; KIM; PARK; KIM, 2004; JOHNSON et al., 1992; PARKER; SUTTON, 1993).

Algumas espécies de Botryosphaeriaceae já foram relatadas em goiabeiras no Brasil. Robbs et al. (1980), registraram a ocorrência de *Botryosphaeria dothidea* causando cancrios nos troncos e galhos e atacando frutos no Estado do Rio de Janeiro. No Estado de São Paulo, Salzedas e Rodrigues Netto (1985) relataram a ocorrência do cancro de *B. dothidea* em goiabeiras na região de Araçatuba, relatando os mesmos sintomas descritos anteriormente. Esses trabalhos citam o gênero *Dothiorella* como forma anamórfica de *B. dothidea*, entretanto, atualmente considera-se a espécie *Fusicoccum aesculi* como a fase anamórfica de *B. dothidea*.

Existem relatos da podridão apical em frutos de goiaba em Maceió e no Distrito Federal, chegando a 14% de incidência no segundo local citado (MUNIZ et al., 2003; VENTURA; COSTA, 2003).

Os sintomas associados à infecção de goiabeiras pelas espécies de Botryosphaeriaceae são lesões em forma de cancrios nos ramos e nos troncos das árvores, que causam a redução no fluxo de seiva e consequente seca de ramos novos, das flores e dos frutos. As lesões presentes nos ramos doentes são elípticas, com depressão e rachaduras no córtex, delimitadas pelos tecidos secos da casca e do lenho, e formam um calo cicatricial, que pode ocorrer tanto no tronco, desde próximo ao solo, como nos ramos com diâmetro superior a um centímetro, tendo a maior incidência nos ramos da parte mediana da copa. Nos frutos, ocorrem lesões marrom-avermelhadas na parte apical destes, que pode ser devido a infecções iniciais nos restos do cálice floral. Com o amadurecimento do fruto ocorre aumento da lesão e o fruto torna-se impróprio para o consumo. Há o crescimento de micélio cinza-escuro, e nos tecidos mortos formam-se picnídios globosos a elípticos de cor negra, com ostíolo central e picnidiósporos hialinos e unicelulares que promovem a disseminação do fungo. Alguns frutos doentes podem mumificar ainda na planta, e tornar-se fonte de inóculo. A infecção nos frutos é favorecida por ferimentos causados por insetos como a mosca-das-frutas (*Anastrepha* spp., e *Ceratitis capitata*) (ROBBS et al., 1980; SALZEDAS; RODRIGUES NETTO, 1985; VENTURA; COSTA, 2003)

Frutos colhidos aparentemente sadios também manifestam podridões apicais, (FISCHER et al., 2011), decorrentes de infecções quiescentes, principalmente nos restos florais remanescentes nos frutos.

Tanto no Brasil como em outros países citados várias espécies da família Botryosphaeriaceae foram associadas como causa da podridão apical da goiaba como *Macrophoma* sp., *Fusicoccum* sp., *Botryosphaeria dothidea* e *Dothiorella dothidea* (ROBBS et al., 1980; SALZEDAS; RODRIGUES NETTO, 1985; VENTURA; COSTA, 2003; SANTOS; CARVAJAL; MONTIEL, 1993; JIMENEZ; SANTOS, 1992). Entretanto em todos os trabalhos a identificação dessas espécies só foi feita através da morfologia, o que na maioria das vezes não trouxe precisão aos resultados encontrados, sendo necessário um estudo mais aprofundado com a utilização de ferramentas moleculares para identificação e confirmação dessas espécies.

A recomendação de controle para a podridão apical da goiaba é a poda de ramos doentes seguida da retirada do material vegetal doente do pomar, para se reduzir a fonte de inóculo. Fertilizações equilibradas com macro e micro-nutrientes ajudam a reduzir estresses nas plantas e a incidência da podridão apical. As deficiências de K e Ca e o déficit hídrico favorecem a doença (ROBBS et al., 1980; SALZEDAS; RODRIGUES NETTO, 1985; VENTURA; COSTA, 2003).

2.1.4 Ambiente e doença

Segundo Agrios (2005) doença é qualquer alteração no funcionamento normal dos tecidos do hospedeiro, causada pela irritação contínua por um agente patogênico ou fator ambiental e que resulta no desenvolvimento de sintomas. Entretanto, para a ocorrência da doença é indispensável que o ambiente seja favorável ao agente patogênico, que o hospedeiro seja suscetível e que o patógeno esteja presente e seja capaz de causar doença. Dentre os três fatores, o que apresenta as maiores variações dentro do ciclo da cultura é o fator ambiental. O ambiente é, na maioria das vezes, o fator determinante para que epidemias ocorram ou não (MIZUBUTI; MAFFIA, 2006; BEDENDO; AMORIM, 2011).

A umidade, seja na forma de chuva, orvalho ou irrigação é um fator determinante para a ocorrência de várias doenças (VALE; ZAMBOLIM, 1996). Durante o processo de infeccioso, a água é fundamental para a germinação e penetração de fungos e bactérias na planta. A disseminação de patógenos da parte aérea e patógenos veiculados pelo solo também é dependente da água. O número de esporos disseminados de *Colletotrichum acutatum* aumenta com o incremento do impacto de gotas de chuva (MADDEN, 1997). A umidade também pode influenciar a reprodução de fitopatógenos, sendo necessária para a esporulação e liberação de esporos, por exemplo, de fungos como os do gênero *Alternaria* (ROTEM, 1994).

Outro fator do ambiente importante para ocorrência de doenças é a temperatura. Em todo patossistema existe uma temperatura ótima, uma temperatura mínima e uma temperatura máxima para o desenvolvimento do agente patogênico. Outra característica da temperatura é sua influência em todas as etapas do ciclo de relações patógeno-hospedeiro, desde as etapas iniciais como a germinação do fitopatógeno e até a sua reprodução (VALE; ZAMBOLIM, 1996). Porém patógenos típicos de regiões tropicais e subtropicais se desenvolvem em uma ampla faixa de

temperatura e nessas condições esse fator é raramente um limitante para o aparecimento da doença (BEDENDO; AMORIM, 2011).

As condições ambientais em que frutos são mantidos após a colheita são determinantes para a ocorrência de doenças, sendo a temperatura e a umidade relativa as principais variáveis que interferem na qualidade dos frutos durante o armazenamento (HARVEY, 1978). A alteração da temperatura através da refrigeração é uma forma de manipulação do ambiente que visa manter a sanidade dos frutos e retardar o amadurecimento (BENATO, 2002). A refrigeração diminui a produção de etileno e retarda o amadurecimento e o crescimento de microrganismos. Entretanto essa prática tem como desvantagem um custo relativamente alto e temperaturas entre 0 e 5 °C podem causar um tipo de injúria em goiabas que é conhecido como *chilling* (BARKAI-GOLAN, 2001; MANICA et al., 2000). Por outro lado, temperaturas entre 5 e 10 °C podem auxiliar no manejo de doenças. Goiabas da variedade Paluma, mantidas a uma temperatura de 10 °C em câmeras de refrigeração, não apresentaram nenhum um tipo de podridão após 10 dias de armazenamento (RIBEIRO et al., 2005).

Outra forma de manipulação ambiente para o controle de doenças pós-colheita é a utilização de atmosfera controlada e/ou modificada. Essa prática também visa atrasar os processos de maturação e senescência dos frutos retardando o aparecimento de podridões. Além disso, a modificação dos níveis de CO₂ e O₂ pode ter ação direta sobre os microrganismos afetando seu desenvolvimento (BARKAI-GOLAN, 2001).

Existem poucos estudos epidemiológicos de doenças pós-colheita, isso levando em consideração a quantidade desses estudos com doenças foliares e radiculares. A influência dos fatores ambientais nas doenças pós-colheita não é esclarecida para a maioria dos patossistemas. Para alguns patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, a relação ambiente-doença é bem esclarecida existindo vários estudos em abacate, mamão, banana, manga e goiaba (FIETZELL; PEAK, 1984; DODD; ESTRADA; JEGER, 1992; PRUSKY; FREEMAN; DICKMAN, 2000; SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008). O efeito da temperatura e da umidade é conhecido para a antracnose e pinta preta da goiaba. Soares, Lourenço, Amorim (2008), observaram que a temperatura influencia na germinação de conídios, formação de apressórios, penetração e colonização dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, causadores da antracnose da goiaba. As

condições ótimas de temperatura e umidade para germinação dos conídios dessas espécies foram temperaturas entre 20 e 25 °C e um período de molhamento acima de 24 horas. A formação de apressórios, penetração e colonização apresentaram os valores mais altos em uma faixa de temperatura entre 15 e 30 °C. Escanferla (2007) estudando o efeito da temperatura e da umidade na pinta preta da goiaba, observou que a germinação e a formação de apressórios de *Guignardia psidii* foi maior na faixa de temperatura entre 25 e 30 °C e em períodos de molhamento de 48 horas.

Em relação à podridão apical da goiaba existem poucas informações sobre as condições ambientais que favorecem o desenvolvimento das espécies de Botryosphaeriaceae. Alguns trabalhos relatam que a doença se desenvolve mais rápido em temperaturas entre 27 e 30 °C e picos de incidência da podridão apical em frutos de goiaba normalmente ocorrem nas épocas mais quentes das regiões tropicais (AMARAL et al., 2007; JIMENEZ; SANTOS, 1992).

O conhecimento do efeito da temperatura e do período de molhamento nos patossistemas é fundamental para que se determinem as épocas e regiões favoráveis para o desenvolvimento de epidemias.

2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, localizada no município de Piracicaba, SP.

2.2.1 Origem e obtenção dos isolados de espécies da família Botryosphaeriaceae

Para a condução dos experimentos, 56 isolados de espécies de Botryosphaeriaceae foram obtidos de frutos com sintomas típicos da podridão apical. Os frutos foram coletados em diferentes regiões produtoras de goiaba do Estado de São Paulo (Tabela 1) e mantidos a 25 °C por 10 dias até que os sintomas estivessem evidentes. A partir desses frutos foi realizado o isolamento do patógeno, transferindo esporos ou micélio da lesão para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-água (BDA), com o auxílio de uma agulha flambada. Essas placas foram mantidas em câmaras de crescimento Eletrolab® a 25 °C.

Tabela 1 - Local de origem, identificação e ano de coleta dos 56 isolados de espécies de Botryosphaeriaceae utilizados no trabalho

Isolados	Local de Origem	Ano de Coleta
N7,	Campinas	2006
N10,	Campinas	2012
N22 a N25, N27, N31 a N33	Campinas	2010
N39, N53 a N56	Campinas	2012
N20, N26,	Valinhos	2012
N46 a N52 e N55	Valinhos	2011
N1 a N6 e N21	Itajú	2011
N8, N9, N11,	Bauru	2011
N12 e N19	Bauru	2011
N13 a N18	Monte Alto	2011
N34 a N38	Cabrália Paulista	2011
N28 a N30	Vista Alegre	2011
N40 a N45	Taquaritinga	2011

2.2.2 Esporulação, culturas monóspóricas e preservação dos isolados

Para a produção de estruturas reprodutivas dos fungos, necessárias nos experimentos de caracterização morfológica, um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro de cada isolado foi depositado em uma placa de Petri contendo acículas de *Pinus* sp. esterilizadas e dispostas sobre uma camada de ágar-água (AA). Essas placas foram mantidas sob luz negra, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C. Semanalmente foi feita a observação do aparecimento de picnídios e conídios sobre as acículas (SLIPPERS et al., 2004).

Para a condução dos experimentos de germinação de conídios *in vitro* e dos experimentos *in vivo* foi utilizada outra metodologia de esporulação, uma vez que a metodologia da acícula de *Pinus* sp. produz um número relativamente baixo de esporos, não sendo viável para fazer suspensões de esporos para inoculações. Discos de micélio dos isolados foram transferidos para placas de Petri contendo fragmentos de casca de goiaba autoclavados e depositados sobre uma camada de ágar-água. Essas placas foram mantidas sob luz negra, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C. Após 12 dias formaram-se picnídios sobre a superfície da casca de goiaba. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi foi realizada uma raspagem

na superfície do fragmento de goiaba, de modo que os picnídios liberassem os cirros com os esporos. Adicionou-se água destilada esterilizada à placa e a suspensão de esporos foi calibrada com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Para obter culturas monospóricas dos isolados, uma alíquota de 200 µL de suspensão de conídios com 10^4 conídios/mL foi depositada sobre meio de AA em placa de Petri e distribuída sobre a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após 12 horas essas placas foram observadas ao microscópio óptico e apenas um conídio germinado foi retirado da placa e transferido para outra placa contendo meio de cultura BDA e fragmentos de 1cm² de papel filtro estéril na superfície do meio. Após o fungo crescer sobre os fragmentos de papel filtro, estes foram retirados do meio de cultura e preservados em tubos tipo Eppendorf® contendo sílica e mantidos a 4 °C.

A patogenicidade de todos isolados coletados foi comprovada ao longo do trabalho, em inoculações feitas com discos de micélio em goiabas cv. Kumagai.

2.2.3 Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae causadoras da podridão apical em goiabas

2.2.3.1 Caracterização morfológica e cultural

Lâminas de microscopia foram preparadas com suspensões dos conídios, produzidos nas acículas de *Pinus* sp, de todos os isolados, utilizando o corante lactoglicerol. Foram observadas as seguintes características dos conídios dos isolados: tamanho, forma, cor e presença de septo. Foram avaliados 50 conídios por isolado. O comprimento e a largura de conídios foram mensurados sob microscópio óptico (ZEISS AxioCam MRs, software de captura de imagem AxioVision 4.6) no aumento de 400x. Médias e amplitudes das mensurações foram calculadas e comparadas com dados da literatura (SLIPPERS et al., 2004; CROUS et al., 2006; COSTA et al., 2010). Também foi calculado o desvio da média do comprimento, da largura e da relação C/L.

Para a caracterização cultural, discos de micélio, com aproximadamente 5 mm de diâmetro, retirados da zona periférica de cada uma das colônias dos isolados com 7 dias de cultivo foram transferidos para placas de poliestireno com 90 mm de diâmetro contendo meio BDA. As placas de poliestireno foram colocadas em câmaras de crescimento a 25 °C, no escuro, durante 8 dias. Durante esse período as

seguintes características visuais foram avaliadas: aspecto cultural (tipo de micélio), densidade da colônia, coloração e presença de pigmento difundido no meio de cultura (PHILLIPS, 2004; SLIPPERS et al., 2005).

2.3.2.2 Extração de DNA, amplificação e análises filogenéticas

Para realização de análises filogenéticas a região do Espaçador Interno Transcrito (ITS) e a região do gene da β -tubulina (Bt) foram amplificadas. A extração do DNA genômico total foi realizada de acordo com a metodologia de Dellaporta, Wood e Hicks (1993). Após a extração do DNA genômico a pureza e a concentração foram determinadas com a utilização de um espectrofotômetro (NANODROP®) e a concentração final foi ajustada para 50 ngDNA/ μ L. Para amplificação da região ITS do rDNA foram utilizados os *primers* ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990). Parte da região do gene da β -tubulina foi amplificada, utilizando os *primers* Bt2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3') e Bt2b(5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') (GLASS; DONALDSON, 1995).

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador (PTC 100; M. J. Research Company, Watertown, MA), com as seguintes condições: pré-aquecimento inicial por 2 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 60 s, anelamento a 60 °C por 90 s, e extensão a 72 °C por 120 s. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese, em gel de agarose 0,8% tratado SyBR Safe™ (Invitrogen), em tampão 0,5X Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) e visualizados em aparelho transluminador com luz UV. Posteriormente, os produtos foram purificados com auxílio do Kit de purificação Promega® e novamente foram visualizados em gel de agarose para determinação de sua concentração e qualidade. Logo após os produtos da PCR purificados foram enviados para sequenciamento no Laboratório MacroGen, Coréia do Sul. As sequências geradas foram comparadas com o banco de dados GenBank do *National Center for Biotechnological Information* (NCBI), utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas foram gerados utilizando-se o programa MUSCLE (EDGAR, 2004), implementado pelo programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5 (MEGA 5) (TAMURA et al., 2011) e corrigidos manualmente. Sequências

de espécies de Botryosphaeriaceae de estudos anteriores, disponíveis no GenBank (Tabela 2) foram incluídas nas análises.

A análise filogenética bayesiana foi realizada com o programa MrBayes 3.1 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), utilizando o modelo de substituição (SYM+I+G) para a região ITS e o modelo GTR+G para a região β -tubulina, os modelos foram selecionados pelo critério de informação Akaike (AIC) utilizando o programa MrModeltest 2.3. Foi realizada uma análise bayesiana para a região ITS, uma para a região β -tubulina e outra para o concatenado das duas regiões, em todas as análises se utilizou 10.000.000 de gerações. Nas análises, as sequências de *Bionectria* sp. foram utilizadas como grupo externo. Esse grupo foi escolhido por ser utilizado em estudos anteriores envolvendo espécies de Botryosphaeriaceae (SLIPPERS et al., 2004, 2005, 2007; CROUS et al., 2006). As árvores geradas foram editadas no programa Figtree 3.1 - 2006-2009.

Tabela 2 - Sequências de isolados de Botryosphaeriaceae disponíveis no GenBank e utilizadas no estudo de filogenia

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Origem	(continua) GenBank	
				ITS	β -tubulina
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW7027	<i>M. indica</i>	Austrália	AY615192	AY615179
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW7803	<i>M. indica</i>	Austrália	AY615193	AY615180
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW7780	<i>Fraxinus excelsior</i>	Suíça	AY236947	AY236925
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW8000	<i>Prunus sp.</i>	Suíça	AY236949	AY236927
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW9078	<i>Actinidia deliciosa</i>	Nova Zelândia	AY236940	AY236914
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW0981	<i>Populus nigra</i>	Nova Zelândia	AY236943	AY236917
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW7025	<i>M. indica</i>	Austrália	AY615181	AY615168
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW7798	<i>M. indica</i>	Austrália	AY615183	AY615170
<i>Botryosphaeria parva</i>	CMW7799	<i>Persea americana</i>	Austrália	AY615184	AY615171
<i>Botryosphaeria ribis</i>	CMW7772	<i>Ribes sp.</i>	EUA	AY236935	AY236906
<i>Botryosphaeria ribis</i>	CMW7773	<i>Ribes sp.</i>	EUA	AY236936	AY236907
<i>Botryosphaeria ribis</i>	CMW7054	<i>Ribes sp.</i>	EUA	AF241177	AY236908
<i>Neofusicoccum ribis</i>	UCD2579MO	<i>Vitis sp.</i>	EUA	HQ288214	HQ288308
<i>Neofusicoccum mangiferum</i>	CMW7024	<i>M. indica</i>	Austrália	AY615185	AY615172
<i>Neofusicoccum mangiferum</i>	CMW7797	<i>M. indica</i>	Austrália	AY615186	AY615173
<i>Botryosphaeria lutea</i>	CMW9076	<i>Malus x domestica</i>	Nova Zelândia	AY236946	AY236922
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	CMW10130	<i>Vitex donniana</i>	Uganda	AY236951	AY236929
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	CMW9074	<i>Pinus sp.</i>	México	AY236952	AY236930
<i>Botryosphaeria obtusa</i>	CMW7774	<i>Ribes sp.</i>	EUA	AY236953	AY236931
<i>Botryosphaeria stevensii</i>	CMW7060	<i>F. excelsior</i>	Holanda	AY236955	AY236933
<i>Botryosphaeria eucalyptorum</i>	CMW10125	<i>Eucalyptus grandis</i>	África do Sul	AF283686	AY236920
<i>Botryosphaeria eucalyptorum</i>	CMW10126	<i>Eucalyptus grandis</i>	África do Sul	AF283687	AY236921

Tabela 2 - Sequências de isolados de Botryosphaeriaceae disponíveis no GenBank e utilizadas no estudo de filogenia

(conclusão)

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Origem	GenBank	
				ITS	β -tubulina
<i>Dothiorella americana</i>	UCD2252MO	<i>Vitis sp.</i>	EUA	HQ288218	HQ288297
<i>Dothiorella americana</i>	UCD2272MO	<i>Vitis sp.</i>	EUA	HQ288219	HQ288298
<i>Diplodia seriata</i>	UCD2181MO	<i>Vitis sp.</i>	EUA	HQ288216	HQ288295
<i>Diplodia seriata</i>	UCD2545MO	<i>Vitis sp.</i>	EUA	HQ288217	HQ288296
<i>Bionectria sp.</i>	CMW7063	<i>Taxus baccata</i>	Holanda	AY236956	AY236934

2.2.4 Efeito da temperatura no crescimento micelial *in vitro*

Para analisar o efeito da temperatura no crescimento micelial das diferentes espécies, discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro de um isolado de *Neofusicoccum parvum* (N10), um de *Neofusicoccum ribis* (N2) e um de *Fusicoccum aesculi* (N18) identificados no presente trabalho foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram armazenadas em câmaras de crescimento com temperaturas ajustadas para 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C, no escuro. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições (5 placas) de cada isolado por temperatura. As avaliações foram realizadas às 24, 48, 72 e 96 horas após a repicagem, através da medição do diâmetro da colônia em cada placa de Petri.

Os valores do diâmetro da lesão 4 dias após a repicagem em função da temperatura de armazenamento foram analisados por meio de regressões não lineares, utilizando o modelo beta generalizado (BASSANEZI et al., 1998) descrito pela equação:

$$Y = (Y_{ot}) \left[\frac{(T - T_{min})}{(T_{ot} - T_{min})} \right]^{B3} \left[\frac{(T_{max} - T_{ot})}{(T_{max} - T)} \right]^{B3}$$

Onde:

Y corresponde ao diâmetro da lesão ao 4º dia;

Yot corresponde ao diâmetro da lesão na temperatura ótima (Y máximo);

T corresponde à temperatura;

Tmin corresponde à temperatura mínima;

Tot corresponde à temperatura ótima;

Tmax corresponde à temperatura máxima;

B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica.

Os dados foram analisados com o auxílio do software STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa–OK, USA) e os parâmetros estimados pelo modelo para cada espécie foram comparados pelo teste t ($P \leq 0,05$).

2.2.5 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de conídios de espécies de Botryosphaeriaceae *in vitro*

Para os experimentos *in vitro* foram utilizados um isolado de *Neofusicoccum parvum* (N10), um de *Neofusicoccum ribis* (N2) e um de *Fusicoccum aesculi* (N18) obtidos no presente trabalho.

Para a germinação dos esporos foram depositadas de forma aproximadamente esquadristante três gotas de 50 µL de suspensão de conídios, de cada isolado, na concentração de 10^4 esporos mL^{-1} , em placas de poliestireno. As placas foram colocadas em Gerbox contendo papel filtro umedecido e mantidas em câmaras de crescimento com temperaturas ajustadas para 10, 15, 20, 25, 30 e 35 e 40 °C, sob câmara úmida por 4, 6, 12, 24 e 48 horas. Para a interrupção do processo de germinação, foram adicionados 15 µL de lactoglicerol à suspensão fúngica e logo após uma lamínula de microscopia foi depositada sobre a gota. A avaliação da porcentagem de germinação consistiu na contagem, em microscópio óptico, dos 100 primeiros esporos encontrados em cada gota. Foi considerado germinado o conídio que apresentou tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento do mesmo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando 3 placas com 3 gotas por temperatura e molhamento. A média das 3 gotas de uma mesma placa foi considerada uma repetição, totalizando 3 repetições por tratamento. O experimento foi repetido uma vez para cada isolado.

Para a determinação das variáveis ambientais favoráveis à germinação foram utilizadas análises de regressão não-lineares, utilizando o modelo beta generalizado-monomolecular (BASSANEZI et al., 1998; HAU; KRANZ, 1990) descrito pela equação:

$$Z = Z_{ot} * \left(\frac{(T - T_{min})}{(T_{ot} - T_{min})} \right)^{B_3 * \left(\frac{(T_{ot} - T_{min})}{(T_{max} - T_{ot})} \right) * \left(\frac{(T_{max} - T)}{(T_{max} - T_{ot})} \right)^{B_3} * (B_6 * (1 - B_7 * \exp(-B_8 * M)))},$$

onde:

Z é a porcentagem de germinação;

Z_{ot} é o valor de germinação na temperatura ótima (valor máximo da germinação);

T é a temperatura em °C;

T_{min}, T_{ot} e T_{max}, são respectivamente as temperaturas mínimas, ótimas e máximas;

B₃ representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica;

B₆ e B₇ são parâmetros do modelo;

B₈ está relacionado à velocidade de aumento da germinação em função do período de molhamento;

M o período de molhamento;

Os dados foram analisados com o auxílio do software STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa–OK, USA) e os parâmetros estimados pelo modelo para cada espécie foram comparados pelo teste t ($P \leq 0,05$).

2.2.6 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na infecção e na colonização de espécies de Botryosphaeriaceae em goiabas Kumagai

Os mesmo isolados dos ensaios *in vitro* foram utilizados na condução dos ensaios *in vivo*. Goiabas foram obtidas na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP-SP) e foram separadas de acordo com a coloração da casca nos diferentes estádios de maturação: estágio 1 – cor da casca verde-escura; estágio 2 – quebra da cor verde; estágio 3 - início da coloração amarela da casca; estágio 4 – casca parcialmente amarela; estágio 5 – frutos com a cor da casca totalmente amarela (Figura 1 A) (CAVALINI et al., 2006). Após os frutos serem separados visualmente nesses estádios, 10 frutos de cada estágio foram selecionados aleatoriamente para a confirmação do estágio de maturação através da coloração da casca, obtida com a utilização de colorímetro Minolta (modelo CR 10), utilizando-se de duas medidas por fruto, em lados opostos de sua região equatorial e os resultados expressos em ângulos de ($^{\circ}$ h). A densidade dos frutos foi determinada com auxílio de um penetrômetro e os sólidos solúveis ($^{\circ}$ BRIX) com auxílio de um refratômetro portátil. Logo após os frutos foram higienizados mantendo-os em solução hipoclorito de sódio 0,5% por 3 minutos e posteriormente lavados com água corrente para retirar o excesso do produto. Os frutos foram secos em temperatura ambiente e colocados em potes plásticos (Figura 1B). A câmara úmida foi realizada pela deposição de fragmentos de algodão úmidos dentro dos potes.

Cada fruto foi marcado na sua porção mediana com um círculo feito com caneta permanente (Figura 1C). A inoculação foi feita com a deposição de uma alíquota de 50 μ L de suspensão de 10^5 conídios/mL no interior do círculo marcado nos frutos. Foi realizado um ferimento 0,3 cm de profundidade com auxílio de uma agulha histológica nos frutos após a deposição da suspensão de esporos.

Os frutos foram mantidos nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 $^{\circ}$ C e em períodos de molhamento contínuo de 6, 12, 24 e 48 horas. O fim do período de molhamento consistiu na abertura do pote e consequente secagem da gota contendo a suspensão de esporos. O delineamento experimental foi o inteiramente

casualizado com 5 frutos por tratamento (combinação de temperaturas com horas de molhamento) no experimento 1 e 12 frutos por tratamento no experimento 2.

O diâmetro da área lesionada foi obtido pela média de duas medidas perpendiculares, obtidas com régua. Também foi avaliado o período de incubação (tempo entre a inoculação e o aparecimento de sintomas) nos tratamentos.

Os dados do diâmetro da lesão ao 7º dia após inoculação em cada temperatura de incubação e período de molhamento foram analisados por meio de regressão não linear com o auxílio software STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa–OK, USA). O modelo ajustado aos dados foi o beta generalizado, descrito anteriormente para o crescimento micelial. O modelo foi ajustado para cada espécie e período de molhamento. O parâmetro Yot obtido em cada período de molhamento e todos os outros parâmetros estimados pelo modelo para as três espécies foram comparados pelo teste t ($P \leq 0,05$).

Os dados do período de incubação, que representa o período de tempo entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas, foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa SISVAR 4.3, e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 1 - Frutos selecionados de acordo com o estágio de maturação e secos a temperatura ambiente após a lavagem com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (A). Potes com 12 frutos, cada pote consistiu de uma combinação temperatura x molhamento(B). Fruto inoculado com uma alíquota de 50 µL da suspensão de conídios (C)

As taxas de crescimento da lesão, para cada espécie, na temperatura ótima e no melhor período de molhamento para o desenvolvimento da podridão apical, foram obtidas através de regressões não-lineares utilizando o modelo monomolecular (VANDERPLANK, 1963) descrito pela equação $Y=1- (1- Y_0) \exp (-rT)$, onde:

Y = diâmetro da lesão (cm);

Y_0 = inóculo inicial;

r = taxa de crescimento da lesão;

T = tempo em dias após a inoculação.

Os dados foram analisados com o auxílio do software STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa–OK, USA) e os parâmetros estimados pelo modelo para cada espécie foram comparados pelo teste t ($P \leq 0,05$).

2.3 Resultados

2.3.1 Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae causadoras da podridão apical em goiabas

2.3.1.1 Caracterização morfológica e cultural

Todos os isolados produziram picnídios sobre as acículas de *Pinus* sp., com o tempo para esporulação variando de uma a quatro semanas, sendo assim possível

obter as médias do comprimento, largura e da relação comprimento/largura dos 50 isolados obtidos (Tabela 3).

A morfologia dos conídios juntamente com a caracterização das colônias permitiram separar os isolados em 2 grupos morfológicos, os quais foram identificados como: Grupo 1 - *Botryosphaeria dothidea* anam.: *Fusicoccum aesculi*, caracterizado por conídios hialinos, de parede fina, sempre asseptados e fusiformes, medindo (14,6) 22,6 (31,3) x (3,4) 5,1 (7,9) μm e com relação C/L de (2,6) 4,13 (6,5) μm . As colônias de *Fusicoccum aesculi* apresentaram micélio inicialmente branco, tornando-se cinzentas escuras a partir do 3º dia. Após o 7º dia, o verso da colônia tornou-se mais escuro com pontuações negras formadas por picnídios. A colônia apresentou micélio aéreo abundante e cotonoso. Esse grupo foi formado pelos isolados N14, N17, N18, N26, N48, N49 e N55; Grupo 2 – *Botryosphaeria parva*/*Botryosphaeria ribis* anam.: *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis*, caracterizado por conídios hialinos, de parede fina, asseptados quando jovens e podendo apresentar septos quando maduros ou quando germinados, medindo (14,6) 22,6 (31,3) x (3,4) 5,62 (7,9) μm e com relação C/L de (2,6) 4,13 (6,1) μm . As colônias de *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* apresentaram micélio inicialmente branco, tornando-se cinzentas escuras a partir do 3º dia. Após o 7º dia o verso da colônia tornou-se negro e não houve formação de picnídios sobre o meio BDA. A colônia apresenta micélio aéreo e cotonoso. Esse grupo foi formado por todos os demais isolados utilizados no trabalho. A Figura 2 apresenta as principais características das colônias e a Figura 3 as principais características dos conídios dos Grupos 1 e 2.

Figura 2 - Presença de micélio branco, aéreo e cotonoso nas colônias de *Fusicoccum aesculi* (A) e *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* (B) aos 3 dias. Colônias com 7 dias de *Fusicoccum aesculi* (C) e *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* (D), apresentando micélio cinza e cinza escuro na região central. Micélio aéreo abundante principalmente na colônia de *Fusicoccum aesculi*. Verso da colônia de *Fusicoccum aesculi* (E) com pontuações negras, indicadas pela seta, correspondentes aos picnídios do fungo. Verso da colônia de *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* (F) de coloração negra

Figura 3 - Conídios hialinos, fusiformes e asseptados de *Fusicoccum aesculi* (A e C). Conídio maduro, castanho e septado de *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* (B e D)

Tabela 3 - Dimensões dos conídios dos 56 isolados de Botryosphaeriaceae obtidos entre 2006 e 2012 de goiabas coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo. As médias representam valores de 50 conídios de cada isolado

(continua)

Isolado	Comprimento (µm)			Largura (µm)			Relação Comprimento/Largura (µm)		
	Média	Amplitude	Desvio	Média	Amplitude	Desvio	Média	Amplitude	Desvio
N1	18,2	14,9 - 20,6	± 1,3	5,2	4,0 - 6,5	± 0,6	3,5	2,5 - 4,8	± 0,5
N2	21,8	17,6 - 25,4	± 1,7	6,0	5,0 - 8,6	± 0,7	3,6	2,4 - 4,4	± 0,4
N3	20,0	17,2 - 22,9	± 1,4	5,0	4,0 - 6,3	± 0,5	3,9	3,0 - 5,0	± 0,4
N4	20,4	16,5 - 24,5	± 1,6	6,3	4,8 - 7,2	± 0,6	3,2	2,6 - 4,3	± 0,3
N5	19,4	17,3 - 21,5	± 1,0	6,1	4,8 - 7,0	± 0,4	3,2	2,6 - 4,1	± 0,3
N6	18,8	16,0 - 22,2	± 1,5	5,4	4,5 - 7,0	± 0,6	3,4	2,5 - 4,3	± 0,3
N7	18,4	15,6 - 22,5	± 1,6	6,4	5,2 - 7,7	± 0,7	2,8	2,3 - 3,7	± 0,3
N8	18,0	14,6 - 23,8	± 1,7	5,1	4,0 - 6,1	± 0,5	3,5	2,4 - 4,6	± 0,5
N9	18,9	16,6 - 21,6	± 1,2	5,8	4,5 - 7,5	± 0,6	3,2	2,5 - 4,0	± 0,3
N10	18,3	15,3 - 20,8	± 1,5	5,7	4,5 - 7,2	± 0,7	3,2	2,4 - 4,4	± 0,5
N11	16,9	13,7 - 19,4	± 1,3	6,0	5,0 - 7,2	± 0,4	2,8	2,1 - 3,5	± 0,3
N12	17,1	14,8 - 19,5	± 1,1	5,1	4,3 - 6,6	± 0,5	3,3	2,5 - 4,0	± 0,4
N13	19,0	14,2 - 23,9	± 1,6	6,4	5,5 - 7,7	± 0,5	3,0	2,0 - 4,2	± 0,3
N14	19,8	14,6 - 23,0	± 1,6	5,1	4,1 - 6,5	± 0,6	3,8	2,6 - 5,3	± 0,5
N15	19,8	16,8 - 22,3	± 1,4	5,8	4,0 - 7,5	± 0,7	3,4	2,1 - 4,7	± 0,4
N16	16,5	13,8 - 19,0	± 1,3	6,1	4,7 - 8,6	± 0,7	2,8	2,0 - 3,8	± 0,4
N17	19,0	15,8 - 22,5	± 0,5	4,6	3,4 - 5,4	± 0,5	4,1	3,1 - 6,1	± 0,6
N18	23,1	19,4 - 25,9	± 1,6	6,1	5,0 - 7,1	± 0,5	3,7	2,7 - 4,4	± 0,4
N19	20,2	17,6 - 22,4	± 1,6	5,8	5,0 - 6,8	± 0,5	3,4	2,7 - 4,4	± 0,3
N20	18,4	15,5 - 21,6	± 1,3	5,5	5,0 - 6,7	± 0,3	3,3	2,6 - 4,1	± 0,3
N21	20,3	17,5 - 23,8	± 1,5	4,9	4,3 - 5,8	± 0,3	4,1	3,1 - 5,2	± 0,4
N22	19,9	16,8 - 22,8	± 1,3	5,2	4,1 - 6,1	± 0,4	3,8	3,0 - 5,0	± 0,4
N23	22,5	19,6 - 25,1	± 1,3	5,7	3,9 - 7,2	± 0,7	4,0	2,9 - 6,1	± 0,5
N24	21,5	17,6 - 25,8	± 1,7	6,9	5,7 - 8,0	± 0,5	3,1	2,4 - 4,1	± 0,3
N25	17,4	14,4 - 20,2	± 1,4	5,0	3,8 - 6,5	± 0,6	3,5	2,5 - 4,4	± 0,5

Tabela 3 - Dimensões dos conídios dos 56 isolados de Botryosphaeriaceae obtidos entre 2006 e 2012 de goiabas coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo. As médias representam valores de 50 conídios de cada isolado

(continuação)

Isolado	Comprimento (µm)			Largura (µm)			Relação Comprimento/Largura (µm)		
	Média	Amplitude	Desvio	Média	Amplitude	Desvio	Média	Amplitude	Desvio
N26	22,6	18,6 - 25,6	± 1,6	5,6	4,3 - 7,3	± 0,7	4	2,6 - 5,3	± 0,5
N27	20,0	17,2 - 23,7	± 1,2	5,4	4,5 - 6,7	± 0,4	3,7	2,9 - 4,5	± 0,4
N28	19,2	14,7 - 22,1	± 1,5	5,0	3,9 - 6,4	± 0,5	3,8	2,6 - 5,3	± 0,5
N29	20,9	17,1 - 24,0	± 1,4	5,9	3,9 - 7,1	± 0,6	3,5	2,7 - 5,4	± 0,4
N30	23,9	19,8 - 28,0	± 1,7	6,5	5,0 - 8,3	± 0,7	3,6	2,8 - 5	± 0,4
N31	20,9	17,2 - 25,2	± 1,9	4,8	4,0 - 6,0	± 0,5	4,3	3,1 - 5,2	± 0,5
N32	17,8	15,1 - 20,3	± 1,2	5,6	4,0 - 6,6	± 0,6	3,2	2,4 - 4,2	± 0,3
N33	20,0	17,1 - 22,5	± 1,2	5,6	4,3 - 7,6	± 0,6	3,6	2,5 - 4,4	± 0,4
N34	18,0	15,1 - 21,2	± 1,3	5,0	3,6 - 6,5	± 0,6	3,5	2,7 - 4,6	± 0,4
N35	23,7	18,7 - 26,7	± 1,8	6,3	5 - 7,6	± 0,5	3,7	3 - 4,9	± 0,4
N36	19,6	15,1 - 23,3	± 2,0	6,0	4,3 - 7,9	± 0,8	3,3	2,3 - 4,2	± 0,5
N37	18,0	15,0 - 21,2	± 1,1	5,6	4,3 - 7	± 0,5	3,2	2,5 - 4,1	± 0,3
N38	18,1	13,7 - 22,5	± 1,7	6,0	4,6 - 7,1	± 0,5	3	2,4 - 3,9	± 0,3
N39	19,1	16,7 - 21,1	± 1,0	5,5	3,8 - 6,4	± 0,6	3,5	3 - 4,9	± 0,4
N40	19,4	16,4 - 24,7	± 1,6	5,2	4 - 6,2	± 0,6	3,7	2,6 - 4,9	± 0,6
N41	22,1	17,6 - 25,7	± 1,6	5,4	4,1 - 7,2	± 0,6	4,1	3,1 - 5,5	± 0,5
N42	21,7	17,8 - 29,1	± 2,2	5,1	4 - 6,4	± 0,6	4,2	3,1 - 6,4	± 0,6
N43	20,7	16,4 - 26,1	± 1,9	6,2	4,3 - 8,3	± 0,7	3,3	2,2 - 5,2	± 0,5
N44	17,3	13,0 - 20,9	± 1,6	6,0	5 - 7,1	± 0,5	2,9	1,9 - 3,8	± 0,4
N45	23,9	18,5 - 29,4	± 2,7	6,1	5 - 7,5	± 0,5	3,8	2,8 - 5,1	± 0,5
N46	17,2	14,2 - 21,7	± 1,5	6,4	5 - 7,6	± 0,6	2,7	1,8 - 3,7	± 0,4
N47	15,6	12,9 - 17,1	± 1,4	5,4	4,5 - 6,7	± 0,5	2,9	2,2 - 3,6	± 0,3
N48	23,3	19,7 - 25,5	± 1,2	6,0	5,5 - 7,7	± 0,7	3,5	2,5 - 4,3	± 0,4

Tabela 3 - Dimensões dos conídios dos 56 isolados de Botryosphaeriaceae obtidos entre 2006 e 2012 de goiabas coletadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo. As médias representam valores de 50 conídios de cada isolado

(conclusão)

Isolado	Comprimento (µm)			Largura (µm)			Relação Comprimento/Largura (µm)		
	Média	Amplitude	Desvio	Média	Amplitude	Desvio	Média	Amplitude	Desvio
N49	22	18 - 25	± 1,3	5,1	4,3 – 6,3	± 0,7	3,7	2,5- 5,3	± 0,4
N50	19	15,6 - 22,7	± 1,7	5,9	4,7 - 7,3	± 0,7	3,2	2,5 - 4,2	± 0,4
N51	18,5	14,4 - 18,5	± 1,8	5,5	3,8 - 6,5	± 0,5	3,4	2,2 - 4,5	± 0,5
N52	17,3	14,4 - 20,2	± 1,5	5,2	3,8 - 7,3	± 0,8	3,4	2,44- 4,4	± 0,5
N53	15,5	12,8 - 18,9	± 1,1	6,1	4,3 - 7,9	± 0,9	2,6	1,7 - 3,7	± 0,4
N54	18,9	14,6 - 21,7	± 1,4	5,4	4 - 6,4	± 0,5	3,5	2,5 - 4,8	± 0,4
N55	25,1	18,6 - 31	± 1,4	5,5	4 - 7,3	± 0,8	4,3	2,6 - 6,0	± 0,8
N56	18,1	13,9 - 17,9	± 1,6	5,2	3,6 - 6,4	± 0,5	3,5	2,6 - 4,5	± 0,5

2.3.1.2 Extração de DNA, amplificação e análises filogenéticas

Os fragmentos gerados pela amplificação pela PCR foram de 550 e 450pb para a região ITS e β -tubulina respectivamente. Essas sequências, juntamente com as sequências de referência obtidas no GenBank formaram uma matriz com 86 táxons e 1080 caracteres.

Para a inferência bayesiana a árvore filogenética concantenada mostra 10 clados com suporte de probabilidade variando de 0.75 a 1 (Figura 4). Os clados formados foram: *Botryosphaeria ribis* (I), *Botryosphaeria parva* (II), *Botryosphaeria dothidea* (III), *Botryosphaeria lutea* (IV), *Fusicoccum mangiferum* (V), *Diplodia seriata* (IV), *Botryosphaeria stevensii* (VI), *Botryosphaeria rodhina* (VII) e *Botryosphaeria eucalyptorum* (VIII), *Dothiorella americana* (IX) e *Botryosphaeria obtusa* (X). Todos isolados obtidos no presente trabalho residem nos clados I, II e VII. Os isolados de *Botryosphaeria dothidea* e *Neofusicoccum parvum* formaram clados com valor de probabilidade 1. O clado de *Neofusicoccum ribis* apresentou um valor de probabilidade de 0.79.

Os isolados N14, N17, N18, N26, N48, N49 e N55 residem no clado I e são pertencentes à espécie *Botryosphaeria dothidea* anam.: *Fusicoccum aesculi*. Os isolados N10, N16, N20, N21, N22, N25, N27, N32, N33, N46, N47, N50, N51 e N52 residem no clado II e são pertencentes à espécie *Botryosphaeria parva* anam.: *Neofusicoccum parvum*. E os isolados N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N11, N12, N13, N15, N19, N23, N24, N28, N29, N30, N31, N34, N35, N36, N37, N38, N39, N40, N41, N42, N43, N44, N45, N53, N54 e N56 residem no clado III e são pertencem à espécie *Botryosphaeria ribis* anam.: *Neofusicoccum ribis*.

Figura 4 - Árvore construída por inferência bayesiana do alinhamento combinado das sequências de ITS e β -tubulina, enraizada com o *Bionectria* sp. Ramificações com mais de 75% de probabilidade posterior bayesiana estão representados acima dos ramos. Os isolados obtidos no presente trabalho residem nos clado I, II e III

2.3.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial in vitro

O crescimento micelial de *Neofusicoccum ribis*, *Neofusicoccum parvum* e *Fusicoccum aesculi* nas diferentes temperaturas foi descrito pelo modelo beta generalizado (Figura 5 e Tabela 4).

Figura 5 - Diâmetro da colônia em meio BDA ao 4º dia após a repicagem em função da temperatura, nos ensaios 1 (círculos cheios) e 2 (círculos vazios) para *Neofusicoccum ribis* (A), *Neofusicoccum parvum* (B) e *Fusicoccum aesculi* (C). Linhas correspondem à função beta generalizada ajustada aos dados

Tabela 4 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{B3}*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot)*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3}]$ onde Y é o diâmetro da colônia ao 4º dia de avaliação, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax são, respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimada pelo modelo. B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da colônia de *Neofusicoccum ribis*, *Neofusicoccum parvum* e *Fusicoccum aesculi* atingido no 4º dia após a repicagem para o meio BDA

Espécie	Parâmetros					R^2
	Yot (erro)	Tot (erro)	Tmin (erro)	Tmax (erro)	B3 (erro)	
<i>N. ribis</i>	7,43 a* (0,08)	28,24a (0,24)	6,62a (1,26)	35,24a (0,11)	0,66a (0,09)	0,99
<i>N. parvum</i>	7,08 a (0,33)	30,79b (1,94)	9,18b (0,95)	35,00a (0,00)	0,19a (0,14)	0,95
<i>F. aesculi</i>	7,78 a (0,62)	33,13b (1,73)	8,77b (1,22)	35,00a (0,00)	0,10a (0,11)	0,97

*Valores seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ($P \leq 0,05$).

Não foi observado crescimento micelial a 40 °C nas três espécies em estudo. O menor valor de temperatura ótima foi de 28,24 °C para *Neofusicoccum ribis*. As temperaturas ótimas de *Neofusicoccum parvum* e *Fusicoccum aesculi* não apresentaram diferença estatística, ficando próximas a 31 °C. Os valores B3 estimados para o crescimento micelial das três espécies para o crescimento micelial foi próximo de 0. Esse parâmetro está relacionado à amplitude do intervalo de temperatura ótima para a variável analisada. Valores próximos de zero indicam valor máximo em uma ampla faixa de temperatura ao redor da ótima para o crescimento micelial. Os parâmetros estimados Tot e Tmin variaram entre as espécies. Os maiores valores estimados de Tot foram para *Fusicoccum aesculi* e *Neofusicoccum parvum*, que não mostraram diferença estatística significativa. De acordo com o modelo beta generalizado a menor temperatura para o crescimento micelial dentre as espécies foi de 6,62° C para *Neofusicoccum ribis*. Os parâmetros Yot, B3 e Tmax não diferiram entre as espécies pelo teste t ($P \leq 0,05$).

2.3.3 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de conídios de espécies de Botryosphaeriaceae *in vitro*

O modelo ajustado aos dados de germinação das três espécies foi o beta generalizado - monomolecular (Figuras 7, 8 e 9). Conídios de *Neofusicoccum parvum* e *Neofusicoccum ribis* apresentaram septos e tornaram-se castanhos após a

germinação, principalmente nas temperaturas de 20 e 25° C e em molhamentos acima de 24 horas (Figura 6).

Figura 6 - Conídios germinados de *Neofusicoccum parvum* (A, D), *Neofusicoccum ribis* (B, E) e *Fusicoccum aesculi* (C, F) na temperatura de 25 °C e 24 horas de período de molhamento, observados ao microscópio óptico nos aumentos de 100X (A, B, C) e 400X (D, E, F)

Conídios das três espécies germinaram na faixa de 10 a 40 °C (Figura 7-9). Obteve-se valores acima de 70% de germinação para *Fusicoccum aesculi* a 40 °C nos molhamentos acima de 12 horas. A faixa de temperatura ideal para a germinação dos conídios das três espécies foi entre 25 e 35 °C. Na temperatura de 30 °C, observam-se altos valores de germinação (70%) a partir de 6 horas de molhamento

O valor de B3 para as três espécies foi próximo de 0, demonstrando um amplo intervalo de temperatura ótima para a germinação dos conídios. O parâmetro B8 foi significativamente diferente de 0 para as três espécies em estudo, demonstrando que houve um aumento da germinação de conídios com o aumento do período de molhamento (Tabela 5).

Figura 7 - Superfície de resposta de germinação de conídios de *Neofusicoccum ribis* em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação $Z = 0,99 * (((X - 7,14) / (30,36 - 7,14))^{(0,60 * (30,36 - 7,14) / (40 - 30,36)) * ((40 - X) / (40 - 30,36))^{0,60}} * (1 * (1 - 3 * \exp(-0,5 * Y)))$, onde Z é a germinação (proporção), T é a temperatura (°C) e M é o período de molhamento (horas). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e círculos brancos dados do segundo experimento

Figura 8 - Superfície de resposta de germinação de conídios de *Neofusicoccum parvum* em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação $Z = 0,93 * (((X - 4,99) / (30,42 - 4,99))^{0,97} * (30,42 - 4,99) / (40,05 - 30,42)) * (((40,05 - X) / (40,05 - 30,42))^{0,97} * (1,17 * (1 - 1,17 * \exp(-0,39 * Y)))$, onde Z é a germinação (proporção), T é a temperatura (°C) e M é o período de molhamento (horas). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e círculos brancos dados do segundo experimento

Figura 9 - Superfície de resposta de germinação de conídios de *Fusicoccum aesculi* em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação $Z = 0,72 * (((X - 4,99) / (30,45 - 4,99))^{0,28} * (30,45 - 4,99) / (40,78 - 30,45)) * (((40,78 - X) / (40,78 - 30,45))^{0,28} * (1,5 * (1 - 0,67 * \exp(-0,17 * Y)))$, onde Z é a germinação (proporção), T é a temperatura (°C) e M é o período de molhamento (horas). Círculos pretos representam dados do primeiro experimento e círculos brancos dados do segundo experimento

Tabela 5 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada-monomolecular $[Z = \text{Zot} * (((T - T_{\min}) / (T_{\text{Tot}} - T_{\min}))^{B3} * (T_{\text{Tot}} - T_{\max}) / (T_{\max} - T_{\text{Tot}}))^{B3} * (B6 * (1 - B7 * \exp(-B8 * M)))]$ onde Z é germinação, Zot os valores máximos da germinação, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima. B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica, B8 está relacionado à velocidade de aumento da germinação em função do período de molhamento e B6 e B7 são parâmetros do modelo. T é a temperatura em °C e M é o período de molhamento] ajustada à germinação de conídios das três espécies do estudo (*N. ribis*, *N. parvum* e *F. aesculi*)

Espécie	Parâmetros estimados								R^2
	Zot (erro)	Tmin (erro)	Tot (erro)	B3 (erro)	Tmax (erro)	B6 (erro)	B7 (erro)	B8 (erro)	
<i>N. ribis</i>	0,99a	7,14a	30,36a	0,60a	40,00a	1,00c	3,00a	0,50a	0,93
	0,00	1,58	0,30	0,09	0,01	0,00	0,88	0,06	
<i>N. parvum</i>	0,94b	5,00a	30,42a	0,97a	40,05a	1,17b	0,17b	0,39a	0,96
	0,00	4,52	0,58	0,90	4,87	0,00	0,70	0,94	
<i>F. aesculi</i>	0,72c	5,00a	30,45a	0,28a	40,78a	1,50a	0,67b	0,17a	0,87
	0,00	0,02	1,10	0,09	0,64	0,00	0,15	0,04	

*Valores seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo “teste t” ($P \leq 0,05$).

A espécie *Neofusicoccum ribis* apresentou o maior valor de Zot, seguida de *Neofusicoccum parvum* e *Neofusicoccum ribis*. As temperaturas mínima, ótima e máxima não diferiram entre as espécies, atingindo valores de 5 °C, 30 °C e 40 °C respectivamente.

2.3.4 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na infecção e na colonização de espécies de Botryosphaeriaceae em goiabas cv. Kumagai

A faixa de temperatura ótima para a colonização das goiabas pelas três espécies foi de 28 a 31 °C (Figuras 10 a 15). Nos frutos inoculados com *F. aesculi* e mantidos a 35 °C observou-se uma maior quantidade de sintomas do que em frutos inoculados com *N. ribis* e *N. parvum* e mantidos na mesma condição.

Houve diferença significativa no parâmetro Yot dos períodos de molhamento de 6 e 48 horas para a espécie *Neofusicoccum ribis*, sendo maior o Yot de 48 horas de molhamento. As temperaturas ótimas variaram de 28,16 a 29,50 °C, e os valores de B3 variaram de 1,37 a 1,91. Não houve diferença significativa entre os períodos de molhamento para os parâmetros Tot, Tmin, Tmax e B3 (Tabela 5).

Para a espécie *Neofusicoccum parvum* houve diferença significativa no parâmetro Yot no período de 6 e 48 horas sendo maior o Yot de 48 horas de molhamento. As temperaturas ótimas variaram de 30 a 31,1 °C, e os valores de B3

variaram de 0,3 a 0,75 em função do período de molhamento aplicado após a inoculação. Não houve diferença significativa entre os períodos de molhamento para os parâmetros Tot, Tmin, Tmax e B3 (Tabela 6).

Para a espécie *Fusicoccum aesculi* o parâmetro Yot estimado para o molhamento de 48 horas diferiu estatisticamente dos parâmetros Yot dos molhamentos de 6 e 12 horas, sendo maior o Yot do molhamento de 48. As temperaturas ótimas variam de 29 a 31,59 °C, e os valores de B3 variaram de 1,5 a 2,08. (Tabela 7). Em todos os experimentos os frutos inoculados encontravam-se no estágio de maturação 4 - casca parcialmente amarela, o que permitiu comparar os parâmetros estimados pelo modelo beta generalizado entre as espécies estudadas. Foram utilizados os experimentos montados com o período de molhamento de 48 horas para comparação, devido a esse período de molhamento ter apresentado os maiores valores de Yot. Não houve diferença significativa entre os parâmetros Yot, Tot e Tmax das três espécies analisadas (Tabela 8). Os parâmetros estimados Tmin e B3 de *Fusicoccum aesculi* não foram significativos (diferentes de 0 pelo teste t ($P \leq 0,05$)) e não foram comparados com os parâmetros das outras espécies. Não houve diferença significativa entre os parâmetros de Tmin e B3 de *Neofusicoccum ribis* e *Neofusicoccum parvum*. As espécies *Neofusicoccum ribis* e *Neofusicoccum parvum* apresentaram valores de B3 estatisticamente iguais e próximos de 0, o que mostra que esses patógenos tem uma ampla faixa de temperatura de crescimento da lesão ao redor da temperatura ótima.

Figura 10 - Diâmetro das lesões da podridão apical (cm) aos 7 dias após a inoculação causadas por *Neofusicoccum ribis* em goiabas cv. Kumagai no estágio de maturação 4, sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento de 6 horas (A), 12 horas (B), 24 horas (C) e 48 horas (D). Círculos vazios são referentes ao experimento 1 e círculos cheios ao experimento 2

Figura 11 - Diâmetro das lesões da podridão apical (cm) aos 7 dias após a inoculação causadas por *Neofusicoccum parvum* em goiabas cv. Kumagai no estágio de maturação 4, sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento de 6 horas (A), 12 horas (B), 24 horas (C) e 48 horas (D). Círculos vazios são referentes ao experimento 1 e círculos cheios ao experimento 2

Figura 12 - Diâmetro das lesões da podridão apical (cm) aos 7 dias após a inoculação causadas por *Fusicoccum aesculi* em goiabas cv. Kumagai no estágio de maturação 4, sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento de 6 horas (A), 12 horas (B), 24 horas (C) e 48 horas (D). Círculos vazios são referentes ao experimento 1 e círculos cheios ao experimento 2

Figura 13 - Goiabas cv. Kumagai 10 dias após a inoculação de *Neofusicoccum ribis*. A, B, C e D correspondem à temperatura de 15 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. E, F, G e H correspondem à temperatura de 20 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. I, J, K e L correspondem à temperatura de 25 °C molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. M, N, O e P correspondem à temperatura de 30 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Q, R, S e T correspondem à temperatura de 35 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente

Figura 14 - Goiabas cv. Kumagai 10 dias após a inoculação de *Neofusicoccum parvum*. A, B, C e D correspondem à temperatura de 15 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. E, F, G e H correspondem à temperatura de 20 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. I, J, K e L correspondem à temperatura de 25 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. M, N, O e P correspondem à temperatura de 30 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Q, R, S e T correspondem à temperatura de 35 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente

Figura 15 - Goiabas cv. Kumagai 10 dias após a inoculação de *Fusicoccum aesculi*. A, B, C e D correspondem à temperatura de 15 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. E, F, G e H correspondem à temperatura de 20 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. I, J, K e L correspondem à temperatura de 25 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. M, N, O e P correspondem à temperatura de 30 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Q, R, S e T correspondem à temperatura de 35 °C e molhamentos de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente

Tabela 6 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*(((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot)}*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3})$ onde Y é o diâmetro da lesão, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimadas pelo modelo, B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por *Neofusicoccum ribis* em goiabas cv. Kumagai, 7 dias após a inoculação, nos diferentes períodos de molhamento

Molhamento	Parâmetros										R^2
	Yot	(erro)	Tot	(erro)	Tmin	(erro)	Tmax	(erro)	B3	(erro)	
6 horas	6,10b*	0,34	28,74a	0,57	12,27a	5,11	35,25a	0,32	1,76a	0,67	0,90
12 horas	7,37ab	0,26	29,50a	0,63	10,46a	3,78	35,06a	0,09	1,37a	0,43	0,94
24 horas	8,15ab	0,40	28,44a	0,31	13,13a	5,96	35,17a	0,27	1,91a	0,78	0,96
48 horas	8,37a	0,22	28,16a	0,43	14,55a	2,65	35,96a	0,57	1,74a	0,40	0,96

*Valores seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo “teste t” ($P \leq 0,05$).

Tabela 7 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*(((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot)}*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3})$ onde Y é o diâmetro da lesão, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimadas pelo modelo, B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por *Neofusicoccum parvum* em goiabas cv. Kumagai, 7 dias após a inoculação, nos diferentes períodos de molhamento

Molhamento	Parâmetros										R^2
	Yot	(erro)	Tot	(erro)	Tmin	(erro)	Tmax	(erro)	B3	(erro)	
6 horas	5,76b*	0,78	31,11a	4,26	13,00a	4,67	35a	0,00	0,30a	0,03	0,87
12 horas	5,90b	0,27	30,12a	1,46	13,09a	1,66	35a	0,00	0,75a	0,35	0,88
24 horas	6,96ab	0,27	30,84a	1,32	12,52a	2,08	35a	0,00	0,67a	0,33	0,94
48 horas	7,90a	0,37	30,00a	2,03	14,98a	0,29	35a	0,00	0,30a	0,25	0,87

* Valores seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo “teste t” ($P \leq 0,05$).

Tabela 8 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot)}*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3}]$ onde Y é o diâmetro da lesão, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimadas pelo modelo, B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por *Fusicoccum aesculi* em goiabas cv. Kumagai, 7 dias após a inoculação, nos diferentes períodos de molhamento

Molhamento	Parâmetros										R^2
	Yot	(erro)	Tot	(erro)	Tmin	(erro)	Tmax	(erro)	B3	(erro)	
6 horas	5,80b*	0,2	30,37a	0,34	14,99	6,59	36,6a	0,00	2,08	0,30	0,90
12 horas	5,66b	0,29	29,62a	0,43	15,00	4,32	36,71a	0,00	1,50	0,27	0,93
24 horas	6,47ab	0,79	30,95a	7,89	14,70	(ns)**	35,06a	4,73	0,76	(ns)	0,91
48 horas	7,59a	0,47	31,59a	1,52	10,10	(ns)	35,21a	0,70	0,69	(ns)	0,94

* Valores seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo "teste t" ($P \leq 0,05$).

** (ns) Parâmetros que não diferem de 0 pelo teste t ($P \leq 0,05$).

Tabela 9 - Coeficientes de determinação (R^2) e parâmetros da função beta generalizada $[Y=Yot*((X-Tmin)/(Tot-Tmin))^{B3*(Tot-Tmin)/(Tmax-Tot)}*((Tmax-X)/(Tmax-Tot))^{B3}]$ onde Y é o diâmetro da lesão, X é a temperatura, Yot é o valor máximo de Y, Tmin, Tot e Tmax, são respectivamente, as temperaturas mínima, ótima e máxima estimadas pelo modelo, B3 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica] ajustada ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por *Neofusicoccum ribis*, *Neofusicoccum parvum* e *Fusicoccum aesculi* em goiabas cv. Kumagai, 7 dias após a inoculação, inoculadas sob as condições de 30 °C e 48 horas de período de molhamento

Espécie	Parâmetros										R^2
	Yot	(erro)	Tot	(erro)	Tmin	(erro)	Tmax	(erro)	B3	(erro)	
<i>N. ribis</i>	8,37a*	0,22	28,16a	0,43	14,55a	2,65	35,96a	0,57	1,74a	0,40	0,96
<i>N. parvum</i>	7,90a	0,37	30,00a	2,03	14,98a	0,29	35,00a	0,00	0,30a	0,25	0,87
<i>F. aesculi</i>	7,59a	0,47	31,59a	1,52	10,10	(ns)**	35,21a	0,70	0,69	(ns)	0,94

* Valores seguidos pela mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo "teste t" ($P \leq 0,05$).

** (ns) Parâmetros que não diferem de 0 pelo teste t ($P \leq 0,05$).

Os períodos de incubação nas diferentes temperaturas e períodos de molhamento das três espécies em estudo estão representados nas Tabelas 9, 10 e 11. As temperaturas de 15 e 35 °C foram excluídas dessa análise devido ao fato de que ao final de 10 dias de avaliação poucos frutos apresentavam-se doentes nessas temperaturas.

Observou-se o menor período de incubação nas temperaturas de 25 e 30 °C associadas com o molhamento de 48 horas para a espécie *Neofusicoccum ribis*, sendo esse valor de 3 dias. Em todas as temperaturas houve diferença significativa pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) entre o molhamento de 6 e 48 horas, sendo que o molhamento de 48 horas reduziu o período de incubação. A espécie *Neofusicoccum parvum* apresentou valores de período de incubação semelhantes à espécie *Neofusicoccum ribis* e seu menor período de incubação foi obtido na temperatura de 30 °C e molhamento de 48 horas. Em todas as temperaturas também houve diferença significativa entre o molhamento de 6 e 48 horas.

Os menores períodos de incubação de *Fusicoccum aesculi* foram obtidos nas temperaturas de 25 e 30 °C e período de molhamento de 48 horas. Houve diferença significativa entre os molhamentos de 6 e 48 horas nas temperaturas de 20 e 25 °C. Na temperatura de 30 °C não houve diferença significativa entre os períodos de molhamento.

A temperatura de 30 °C e o período de molhamento de 48 horas foi a melhor combinação para o crescimento da lesão e redução do período de incubação. Foi então calculada a taxa de crescimento da lesão para as três espécies nessa condição ótima de temperatura e molhamento, conforme a Figura 16. O modelo que melhor se ajustou aos dados foi o monomolecular.

A taxa de progresso de *Neofusicoccum ribis*, *Neofusicoccum parvum* e *Fusicoccum aesculi* foi de 0,50, 0,43 e 0,37 respectivamente para cada espécie (Tabela 12). Não houve diferença significativa entre as taxas pelo teste t ($P > 0,05$).

Tabela 10 - Período de incubação de *Neofusicoccum ribis*, em dias, nos períodos de molhamento de 6, 12, 24 e 48 horas e nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C

Temperatura (°C)	Período de Incubação (Dias)			
	Molhamento (Horas)			
	6	12	24	48
20	8,64 Cb*	7,41 Bc	6,47 ABb	6,70 Ab
25	4,88 Bb	4,29 Bb	3,29 Aa	3,05 Aa
30	4,17 Ba	3,41 ABa	3,11 Aa	3,00 Aa
CV (%)	21,30			

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, e mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados de dois experimentos, $n=17$. CV (%)= Coeficiente de variação em porcentagem.

Tabela 11 - Período de incubação de *Neofusicoccum parvum*, em dias, nos períodos de molhamento de 6, 12, 24 e 48 horas e nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C

Temperatura (°C)	Período de Incubação (Dias)			
	Molhamento (Horas)			
	6	12	24	48
20	8,58 Bc*	8,11 Bb	7,64 Bb	6,11 Ab
25	6,70 Bb	5,29 Aa	4,94 Aa	4,41 Ab
30	4,47 Ba	4,00 Aba	3,23 Aba	3,11 Aa
CV (%)	26,10			

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, e mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados de dois experimentos, $n=17$. CV (%)= Coeficiente de variação em porcentagem.

Tabela 12 - Período de incubação de *Fusicoccum aesculi*, em dias, nos períodos de molhamento de 6, 12, 24 e 48 horas e nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C

Temperatura (°C)	Período de Incubação (Dias)			
	Molhamento (Horas)			
	6	12	24	48
20	9,52 Bc*	9,41 Bb	8,64 ABb	8,17 Ab
25	5,35 Bb	4,64 Aba	4,52 Aba	4,11 Aa
30	4,17 Aa	4,11 Aa	3,94 Aa	3,05 Aa
CV (%)	23,20			

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada linha, e mesma letra minúscula, em cada coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados de dois experimentos, $n=17$. CV (%)= Coeficiente de variação em porcentagem.

Tabela 13 - Coeficiente de determinação (R^2) e parâmetros estimados pelo modelo monomolecular, $[Y = 1 - (1 - Y_0) \exp(-rt)]$, onde Y é diâmetro da lesão, Y_0 é o inóculo inicial, r é a taxa de crescimento da lesão e T é o tempo em dias após a inoculação] ajustado ao diâmetro da lesão da podridão apical causada por *Neofusicoccum ribis*, *Neofusicoccum parvum* e *Fusicoccum aesculi* em goiabas cv. Kumagai inoculadas e mantidas a 30 °C e com um período de 48 horas de molhamento após a inoculação

Espécie	Parâmetros Estimados				
	Y_0	erro	r	erro	R^2
<i>N. ribis</i>	3,50a*	0,42	0,50a	0,03	0,93
<i>N. parvum</i>	2,74a	0,27	0,44a	0,02	0,95
<i>F. aesculi</i>	1,92a	0,25	0,37a	0,02	0,91

*Valores seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo “teste t” ($P \leq 0,05$).

Figura 16 - Curvas de progresso do crescimento da lesão, ajustadas pelo modelo monomolecular, de *Neofusicoccum ribis* (A), *Neofusicoccum parvum* (B) e *Fusicoccum aesculi* (C) em goiabas cv. Kumagai inoculadas no estágio de maturação 4 e mantidas a 30 °C e com período de molhamento de 48 horas após a inoculação

2.4 Discussão

Esse trabalho é o primeiro estudo que visou a identificação de espécies de Botryosphaeriaceae associadas a frutos de goiabeiras no Estado de São Paulo. Os relatos existentes no Brasil, com relação à identificação do agente causal desse patossistema eram controversos no que se refere ao estágio anamórfico e teleomórfico dos fungos, e algumas vezes, a identificação chegava apenas até o nível de gêneros.

Nesse trabalho dois gêneros foram identificados associados à podridão apical. Um foi o gênero *Fusicoccum*, que já era descrito por pesquisadores como agente causal (FISCHER et al., 2011; SOARES-COLLETTI, 2012), o que fez com que essa doença se tornasse conhecida também pelo nome de podridão de *Fusicoccum* sp. O outro foi o gênero *Neofusicoccum*, sendo esse o primeiro relato desse gênero associado a goiabas no Brasil.

A utilização de dados moleculares e análises filogenéticas, associados à reclassificação taxonômica da família contribuiu para a identificação das espécies. Essas ferramentas permitiram chegar com precisão ao nível de espécies dentro desses dois gêneros e identificar táxons com caracteres morfológicos idênticos.

A morfologia permitiu a separação dos gêneros e a identificação de *Fusicoccum aesculi* e *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis*. Dados morfológicos como a pigmentação e septação de conídios de *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* quando maduros ou germinados foram muito úteis nessa identificação. Entretanto, nem sempre é possível observar essa característica em *Neofusicoccum parvum*/*Neofusicoccum ribis* e em alguns casos os conídios apresentam-se hialinos e asseptados, semelhantes a *Fusicoccum aesculi*. Outra característica que auxiliou na separação dos dois grupos morfológicos foi a capacidade de produção de picnídios e esporulação de *Fusicoccum aesculi* em meio BDA, essa mesma característica foi observada em trabalhos de Moral et al. (2010), onde somente *Fusicoccum aesculi* e *Diplodia seriata* esporularam em meio BDA. Não se observa essa característica em *Neofusicoccum ribis*/*Neofusicoccum parvum*, que após 7 dias de crescimento já apresenta um micélio bastante denso e negro sem a presença de estruturas reprodutivas. Toda a caracterização morfológica foi feita com base nos caracteres assexuais das espécies e não se encontrou nenhuma espécie em sua forma sexuada no presente trabalho.

Nesse trabalho, as sequências da região ITS utilizadas em conjunto com sequências da região β -tubulina foram capazes de separar as espécies *Neofusicoccum parvum* de *Neofusicoccum ribis*, assim como no trabalho de Slippers et al. (2005). Em vários trabalhos essas espécies vêm sendo tratadas como complexo *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* (PÉREZ et al., 2010), pois são muito próximas e dados de somente um gene, ITS por exemplo, não são capazes de delimitar essas duas espécies (SLIPPERS et al., 2004). Pavlic et al. (2009) utilizaram de dados de sequências de 5 genes para a clara separação desse complexo.

As espécies de *Neofusicoccum ribis* e *Neofusicoccum parvum* prevaleceram dentre os isolados em estudos, correspondendo a 62,5 e 25% dos isolados respectivamente. Apenas 12,5% dos isolados obtidos são pertencentes a *F. aesculi*. Essa menor frequência de *F. aesculi* em relação às demais espécies de Botryosphaeriaceae do estudo também foi observada por Slippers et al. (2005) e Costa et al. (2010) em trabalhos com mangueira, e esses autores relatam que apesar de *Fusicoccum aesculi* estar presente em várias parte do mundo a importância desse fungo como patógeno de manga foi baixa em relação à *Neofusicoccum parvum*, na Austrália e no Brasil. Costa et al. (2010), ainda relatam que isolados de *Fusicoccum aesculi* foram obtidos em maior frequência de ramos da mangueira enquanto que a maioria dos isolados coletados de frutos eram de *Neofusicoccum parvum* ou *Lasiodiplodia theobromae*. No presente trabalho todos os isolados foram coletados de frutos, o que pode estar associado à menor frequência de *Fusicoccum aesculi*, entretanto trabalhos posteriores devem ser realizados visando o isolamento desses patógenos dos ramos e troncos da goiabeira e posterior identificação, para que se possa confirmar essa relação *Fusicoccum aesculi* e cancos da goiabeira.

Essas espécies foram encontradas aleatoriamente nas regiões produtoras de goiabas de São Paulo. Fungos da família Botryosphaeriaceae vêm sendo tratados como cosmopolitas e associados a uma grande gama de hospedeiros. Assim como no presente trabalho e em vários outros estudos, mais de uma espécie de Botryosphaeriaceae encontra-se associada a uma determinada doença. No Brasil, as espécies *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum* e *Fusicoccum aesculi* estão associadas à podridão peduncular de frutos de mangueira nas principais regiões produtoras (COSTA et al., 2010). As espécies *Lasiodiplodia theobromae* e *Neofusicoccum ribis* estão associadas à morte prematura de plantas

de mirtilo na Flórida, sendo considerada pelos produtores a principal doença do mirtilo (WRIGHT; HARMON, 2010). Mais de 23 espécies de Botryosphaeriaceae são associadas a *Eucalyptus* spp. em todo o mundo, dentre elas *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum ribis* e *Lasiodiplodia* spp. (CHEN et al., 2011).

Além da escassez de informação sobre a etiologia da podridão apical da goiaba, informações sobre as condições ideais para a ocorrência da doença também eram desconhecidas até o presente trabalho. O que se tem relatado é que picos de incidência da doença no Brasil geralmente ocorrem em épocas mais quentes do ano. Nessas condições a incidência da podridão apical se iguala à incidência de *Colletotrichum* spp. e *Guignardia psidii* (SOARES-COLLETTI, 2012).

As temperaturas ótimas para o crescimento micelial estiveram entre 28 °C e 33 °C de acordo com o modelo beta generalizado para as três espécies em estudo. A temperatura ótima para *Fusicoccum aesculi* foi de 33 °C, o que implica que esse fungo pode se desenvolver em regiões de ocorrência de elevadas temperaturas. Trabalhos de Moral et al. (2010), com isolados de Botryosphaeriaceae oriundos de oliveira, relatam uma maior temperatura de crescimento micelial para *Fusicoccum aesculi* em relação a *Neofusicoccum mediterraneum*, o que proporciona uma maior agressividade da primeira espécie em regiões de elevadas temperaturas. Para *Neofusicoccum parvum*, a temperatura ótima para crescimento micelial foi de 30 °C, resultados semelhantes foram encontrados por Aedo, Latorre e Torres (2012), trabalhando com *Neofusicoccum parvum* em mirtilos no Chile. Estudos com isolados de *Neofusicoccum parvum* coletados em pessegueiros na Grécia relatam uma temperatura ótima de 25 °C para crescimento micelial e citam que esse crescimento micelial foi estatisticamente similar nas temperaturas entre 20 e 30 °C (THOMIDIS; MICHAILIDES; EXADAKTYLOU, 2011). A menor temperatura ótima de crescimento micelial encontrada neste trabalho foi de *Neofusicoccum ribis*, sendo de 28 °C. Existem poucos estudos sobre as condições ideais de crescimento para esse fungo e possivelmente esse é o primeiro estudo de condições ambientais favoráveis à *Neofusicoccum ribis*.

A temperatura ótima para germinação dos esporos das três espécies foi de 30 °C e em todas as espécies houve aumento da germinação com o aumento do período de molhamento. Esses resultados são similares aos encontrados na literatura com isolados de Botryosphaeriaceae obtidos de outras culturas. Moral et al. (2010) observaram uma temperatura ótima para a germinação de *Fusicoccum*

aesculi de 30 °C e um período de molhamento mínimo para a germinação de 5 horas. Assim como no presente trabalho, esses pesquisadores também observaram um valor máximo de germinação às 48 horas de molhamento em todas as temperaturas para *Fusicoccum aesculi*. Thomidis, Michailides e Exadaktylou (2011), também estudaram a germinação dos esporos de *Neofusicoccum ribis* na Grécia e encontraram uma temperatura ótima de germinação de 25° C. Assim como no crescimento micelial, esses isolados da Grécia apresentaram valores ótimos de germinação menores que os obtidos no presente trabalho para *N. parvum*. As curvas de germinação de *Neofusicoccum ribis* foram similares às de *Neofusicoccum parvum*, e dados sobre temperaturas ótimas e períodos de molhamento para germinação dos esporos dessa espécie são escassos.

Essas condições de temperatura e umidade para germinação e crescimento desses fungos são encontradas nas principais regiões produtoras de goiabas do Estado de São Paulo, que apresentam sempre verões quentes e chuvosos. Esse fato explica a presença de picos de incidência da podridão apical nos meses de mais quentes do ano, principalmente em janeiro e fevereiro, em frutos coletados no Ceasa e Ceagesp. Esses frutos normalmente são oriundos das regiões de Campinas e Valinhos, cidades que durante essa época do ano apresentam vários picos de temperatura acima de 30° C e períodos chuvosos de mais de 4 dias consecutivos (SOARES-COLLETTI, 2012).

A última parte desse trabalho consistiu na avaliação dos efeitos da temperatura e umidade na infecção e no desenvolvimento das lesões desses patógenos. Até o presente trabalho não existiam estudos sobre como ocorre a infecção de espécies de Botryosphaeriaceae em goiabas. A informação que se tinha era que esses fungos são capazes de penetrar por ferimentos naturais principalmente na região apical, onde ficam retidos restos do cálice floral. Em todos os experimentos realizados *in vivo* foram realizados ferimentos artificiais nos frutos, o que permitiu avaliar com menor variação o desenvolvimento dos sintomas desses patógenos. Entretanto, testes foram realizados com inoculações sem ferimentos artificiais e foi confirmada a infecção, porém sem o ferimento artificial há um aumento no período de incubação e nos escapes da inoculação. Em alguns patossistemas, como *Botryosphaeria dothidea* em maçãs, a infecção por aberturas naturais e a penetração direta por apressórios já são conhecidas (KIM; PARK; AHN, 1999). Essas dúvidas fizeram com que no decorrer do trabalho um estudo paralelo

sobre a penetração dessas espécies em frutos de goiaba fosse realizado com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura. Foi observado que esses fungos conseguem penetrar por ferimentos e por aberturas naturais como estômatos, conforme a Figura 17. Entretanto a penetração e posterior aparecimento de sintomas parece estar envolvida com o período de maturação e a cultivar da goiaba.

Figura 17 - Esporo germinado de *Fusicoccum aesculi* penetrando um estômato em goiabas cv. Kumagai. Foto: Molina (2012), dados não publicados

A forma de inoculação de fungos em frutos nos trabalhos pós-colheita vem gerando bastante discussão. Um dos problemas da inoculação sem ferimento artificial é o fato de não se ter conhecimento da ocorrência de ferimento natural na superfície do fruto. Com relação à inoculação com ferimento o problema encontrado é que se trata de um método mais drástico de inoculação, sendo inviável o uso dessa prática em experimentos de avaliação de resistência de hospedeiros. O que se observa é que muitos trabalhos as inoculações de frutos com espécies de Botryosphaeriaceae vêm sendo realizadas com o auxílio de ferimentos artificiais (OLIVEIRA et al., 2008; COSTA et al., 2010; BATISTA et al., 2012).

Assim como no crescimento micelial e na germinação dos conídios as temperaturas próximas a 30 °C foram as mais favoráveis para a colonização de goiabas pelas três espécies. Uma característica interessante observada nos experimentos foi a mumificação dos frutos 10 dias após a com *Neofusicoccum parvum* e *Neofusicoccum ribis*. Já os frutos inoculados com *Fusicoccum aesculi*

apresentavam-se escurecidos, com grande quantidade de picnídios e com pouco micélio superficial, semelhante aos sintomas relatados em cancrios causados por essa espécie em troncos, característica que reforça ainda mais a hipótese de que essa espécie encontra-se mais associada aos ramos e troncos do que a frutos.

O período de molhamento de 48 horas proporcionou os maiores valores de diâmetro da lesão em todas as espécies. O uso do parâmetro Yot e seu erro padrão foi útil na diferenciação entre dois tratamentos, como descrito por Campbell e Madden (1990) e Bassanezi et al. (1998), e através dessa análise foi possível diferenciar em quais períodos de molhamento a doença foi mais severa. O período de molhamento não está envolvido diretamente com o crescimento da lesão e sim com a infecção. Entretanto, o que se observou no trabalho foi que quanto antes a infecção e aparecimento de sintoma ocorreu, maior foi o diâmetro da lesão ao sétimo dia.

Elevados períodos de câmara úmida propiciaram um baixo período de incubação para as 3 espécies e elevadas taxas de progresso da lesão entre 0,5 e 0,3. Esse reduzido período de incubação foi observado em inoculações feitas em abacate com *Neofusicoccum parvum*, na concentração de 10^6 conídios/mL, onde período de incubação foi de apenas 2 dias (MOLINA-GAYOSSO; SILVA-ROJAS; GARCÍA-MORALES, 2012). E com relação à taxa de progresso da doença para essas espécies, trabalhos em videiras relatam uma maior agressividade de *Neofusicoccum ribis* quando comparado com *Fusicoccum aesculi* (URBEZ-TORRES et al., 2012, entretanto no presente trabalho, não houve diferença entre as taxas de progresso da lesão das espécies estudadas.

Todas as três espécies se desenvolveram tanto *in vitro* com *in vivo* em condições que normalmente ocorrem em determinadas épocas do ano nas regiões produtoras de São Paulo. Durante a estação chuvosa a umidade relativa é alta e as chuvas se prolongam por mais de um dia, sendo assim suficiente para que ocorra a infecção por esses patógenos.

Nas temperaturas ótimas para o desenvolvimento dessa doença nos frutos, houve uma rápida colonização dos fungos nos frutos. Entretanto, em baixa temperatura, 10 – 15°C, o aparecimento de sintomas na maioria das vezes não ocorreu. Sendo assim o uso da refrigeração para o armazenamento desses frutos serve como uma forma de controle para podridões apical da goiaba.

Esse trabalho esclareceu as dúvidas sobre a etiologia da podridão apical e sobre os requerimentos ambientais dessas espécies para o desenvolvimento da doença. Outros trabalhos objetivando determinar ao certo quais as possíveis fontes de inóculo no campo e estratégias para o controle dessa doença devem ser realizados, fornecendo mais informações sobre esse patossistema.

3 CONCLUSÕES

As espécies *Neofusicoccum ribis*, *Neofusicoccum parvum* e *Fusicoccum aesculi* foram identificadas como agentes causais da podridão apical da goiaba no Estado de São Paulo. *Neofusicoccum ribis* foi encontrado em maior proporção e *Fusicoccum aesculi* em menor proporção, dentre os isolados obtidos de frutos.

Esse é o primeiro relato de *Neofusicoccum ribis* e *Neofusicoccum parvum* causando podridão apical em goiabas no Brasil.

As temperaturas ótimas para o desenvolvimento do monociclo dessas espécies são próximas a 30 °C, e poucas horas de molhamento são requeridos para a germinação de esporos. O estabelecimento da infecção e a consequente colonização são favorecidos em períodos de molhamento prolongados.

REFERÊNCIAS

- AEDO, K.E.; LATORRE, B.A.; TORRES, R. Temperature influences stem canker development in blueberry caused by *Neofusicoccum parvum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 7, p. S.4-34, 2012.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 922 p.
- AKAMINE, E.K.; GOO, T. Respiration and ethylene production in fruits of species and cultivars of *Psidium* and species of *Eugenia*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 104, n. 4, p. 632-635, 1979.
- AMARAL, C.S.; SALVAIA, A.; ANGELI, S.S.; MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Incidência de patógenos pós-colheita em goiabas Kumagai. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 57-58, 2007. Suplemento.
- AZZOLINI, M. **Fisiologia pós-colheita de goiabas “Pedro Sato” estádios de maturação e padrão respiratório**. 2002. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- AZZOLINI, M.; JACOMINO, A.P.; BRON, I.U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2004.
- AZZOLINI, M.; JACOMINO, A.P.; BRON, I.U.; KLUGE, R.A.; SCHIAVINATO, M.A. Ripening of “Pedro Sato” guava: study on its climacteric or non-climacteric nature. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 3, p. 139-145, 2005.
- BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control**. Amsterdam: Elsevier, 2001. 418 p.
- BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B. Effects of bean line pattern mosaic virus on the monocyclic components of rust and angular leaf spot of *Phaseolus bean* at different temperatures. **Plant Pathology**, Edinburgh, v.47, n. 3, p. 289-298, 1998.
- BATISTA, D.C.; LIMA NETO, F.P.; F.P.L.; BARBOSA, J.S.; AMORIM, C.C.; BARBOSA, M.A.G. Avaliação da resistência de 47 acessos de mangueira aos fungos *Fusicoccum aesculi* e *Neofusicoccum parvum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 823-831, set. 2012.
- BEDENDO, I.; AMORIM, L. Ambiente e doença. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. cap. 7, p. 133-148.
- BENATO, E.A. Principais doenças em frutas pós-colheita e métodos alternativos de controle com potencial de indução de resistência. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: NEFIT; UFLA, 2002. p. 139-182.

BIALE, J.B.; BARCUS, D.E. Respiratory patterns in tropical fruits of the amazon basin. **Tropical Science**, London, v. 12, n. 2, p. 93-104, 1970.

BOTELHO, R.V. **Efeito do tratamento pós-colheita com cálcio na ocorrência de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) e no amadurecimento de goiabas (*Psidium guajava* L.)**. 1996. 122 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", 1996.

BROWN, B.I.; WILLS, R.B.H. Post-harvest changes in guava fruit of different maturity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 237-243, 1983.

BROWN, E.A.; HENDRIX, F.F. Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on apple stems. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 1, p. 375-379, 1981.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Jonh Wiley, 1990. 532 p.

CAVALINI, F.C.; JACOMINO, A.P.; LOCHOSKI, M.A.; KLUGE, R.A.; ORTEGA, E.M.M. Maturity indexes for 'Kumagai' and 'Paluma' guavas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 176-179, 2006.

CEDEÑO, L.; CARRERO, C.; SANTOS, R.; QUINTERO, K. Podredumbre marrón en frutos del guayabo causada por *Dothiorella*, fase conidial de *Botryosphaeria dothidea*, en los estados Mérida e Zulia, Venezuela. **Fitopatologia Venezolana**, Venezuela, v. 11, n. 1, p. 16-22, 1998.

CHEN S.F.; PAVLIC, D.; ROUX, J.; SLIPPERS, B.; XIE, Y.J.; WINGFIELD, M.J.; ZHOU, X.D. Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation-grown Eucalyptus species in South China. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 739-751, 2011.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: ESAL; FAEPE, 2005. 785 p.

COSTA, A.F.S.; PACOVA, B.E. Botânica e variedades. In: COSTA, A.F.S.; COSTA, A.N. (Ed). **Tecnologias para produção de goiaba**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 27-56.

COSTA, V.S.O.; MICHEREFF, S.J.; MARTINS, R.B.; GAVA, C.A.T.; MIZUBUTI, E.S.G.; CÂMARA, M.P.S. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 127, n. 4, p. 509-519, 2010.

CROUS, P.W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W.F.O.; PHILLIPS, A.J.L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, n. 1, p. 235-253, 2006.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

DODD, J.C.; ESTRADA, A.; JEGER, M.J. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 308-323.

EDGAR R.C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acid Research**, London, v. 35, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

ESCANFERLA, M.E. **Pré-penetração de *Guignardia psidii* em goiaba: influência da temperatura, duração do molhamento, idade dos frutos e concentração de etileno e dióxido de carbono**. 2007. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FISCHER, I.H.; ALMEIDA, A.M.; ARRUDA, M.C.; BERTANI, M.A.R.; GARCIA, M.J.M.; AMORIM, L. Danos em pós-colheita de goiabas na Região do Centro-Oeste Paulista, **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 3, p. 570-576, 2011.

FITZELL, R.D.; PEAK, C.M. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 104, n. 1, p. 53-59, 1984.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. **AGRIANUAL 2011: anuário da produção brasileira**. São Paulo, 2011. 482 p.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p.1323–1330, 1995.

HARVEY, J.M. Reduction of losses in fresh market fruits and vegetables. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 16, p. 321-341, 1978.

HAU, B.; KRANZ, J. Mathematics and statistics for analyses in epidemiology. In: Kranz, J. (Ed.) **Epidemics of plant disease: mathematics analyses and modeling**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 12-52.

HOLLIDAY, P. **Fungus diseases of tropical crops**. New York: Cambridge University Press. 1980. 607 p.

JACOBS, K.A.; REHNER, S.A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. **Mycologia**, New York, v. 90, n. 4, p. 601-610, 1998.

JIMENEZ, A.; SANTOS, R. Estudios biológicos y morfológicos del hongo causante de la pudrición apical de los frutos del guayabo (*Psidium guayava* L.) **Revista de la Facultad de Agronomía**, Venezuela, v. 9, n. 2, p. 77-96, 1992.

- JOHNSON, G.I.; MEAD, A.J.; COOKE, A.W.; DEAN, J.R. Mango stem end rot pathogens – Fruit infection by endophytic colonization of the inflorescence and pedicel. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 120, n. 1, p. 225-234, 1992.
- KIM, K.W.; PARK, E.W.; AHN, K. Pre-penetration behavior of *Botryosphaeria dothidea* on apple fruits. **Plant Pathology Journal**, Seul, v. 15, n. 1, p.223-227, 1999.
- KIM, K.W.; PARK, E.W.; KIM, K.S. Glyoxysomal nature of microbodies complexed with lipid globules in *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 9, p. 970-977, 2004.
- KIM, K.W.; PARK, E.W.; KIM, Y.H.; ANH, K.; KIM, P.G.; KIM, K.S. Latency- and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 2, p. 165-172, 2001.
- KLUGE, R.A.; NACHTIGAL, J.C.; FACHINELLO, J.C.; BILHALVA, A.B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2002. 214 p.
- MADDEN, L.V. Effects of rain on splash dispersal of fungal pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 19, n. 2, p. 225-230, 1997.
- MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. **Fruticultura tropical: goiaba**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000. 373 p.
- MARTINS, M.C.; AMORIM, L.; LOURENÇO, S.A.; GUTIERREZ, A.S.D.; WATANABE, H.S. Incidência de danos pós-colheita em goiabas no mercado atacadista de São Paulo e sua relação com a prática de ensacamento dos frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 29, n. 2, p. 245-248, 2007.
- McGLASSON, W.B. Ethylene and fruit ripening. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 1, p. 51-54, 1985.
- MEDINA, J.C.; CASTRO, J.V. de; SIGRIST, J.M.M.; DE MARTIN, Z.J.; KATO, K.; MAIA, M.L.; GARCIA, A.E.B; FERNANDES, R.S.S. **Goiaba: cultura**, matéria prima, processamento e aspectos econômicos. 2. ed. Campinas: ITAL, 1988. 224 p. (Série Frutas Tropicais, 6).
- MERCADO-SILVA, E.; BAUTISTA, P.B.; GARCIA-VELASCO, M.A. Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 143-150, 1998.
- MICHAILIDES, T.J. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 5, p. 566-573, 1991.

MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A.; **Introdução à fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 190 p (Caderno Didático; 115).

MOHALI, S.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J. Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, n. 4, p. 405-413, 2006.

MOLINA-GAYOSSO E.H.; SILVA-ROJAS, V.; MORALES-GARCÍA, S. First report of black spots on avocado fruit caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. **Plant disease**, Saint Paul, v. 96, n. 2, p. 287, 2012.

MORAL J.; MUÑOZ-DÍEZ, C.; GONZÁLEZ, N.; TRAPERO, A.; MICHAILIDES, T.J. Characterization and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species collected from olive and other hosts in Spain and California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 12, p. 1340-1351, 2010.

MOWLAH, G.; ITOO, S. Changes in pectin components, ascorbic acid, pectic enzymes and cellulase activity in ripening and stored guava (*Psidium guajava* L.). **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**, Tokyo, v. 30, n. 8, p. 454-461, 1983.

MUNIZ, M.F.S.; ROCHA, D.F.; SILVEIRA, N.S.S.; MENEZES, M. Identificação de fungos causadores de doenças em frutos pós-colheita comercializados no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 1, p. 38-42, 2003.

NI, H.F.; YANG, H.R.; CHEN, R.S.; HUNG, T.H.; LIOU, R.F. A nested multiplex PCR for species-specific identification and detection of Botryosphaeriaceae species on mango. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 4, p. 819-828, 2012.

OJEDA, M.R. **Utilização de ceras, fungicidas e sanitizantes na conservação de goiabas ‘Pedro Sato’ sob condição ambiente**. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

OLIVEIRA, M.A. **Utilização de película de mandioca como alternativa à cera comercial na conservação pós-colheita de frutos de goiaba (*Psidium guajava*)**. Piracicaba, 1996. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1996.

OLIVEIRA, T.A.S.; OLIVEIRA, S.M.A.; MICHEREFF, S.J.; CÂMARA, M.P.S; COSTA, V.S.O; LINS, S.R.O. Efeito do estágio de maturação, tipo de inóculo e local de inoculação na severidade da podridão peduncular em manga. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, n. 6, p. 409-414, 2008.

PARKER, K.C.; SUTTON, T.B. Susceptibility of apple fruit of *Botryosphaeria dothidea* and isolate variation. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 33, p. 385-389, 1993.

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T.; WINGFIELD, M.J. Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic cases of the Botryosphaeriaceae: a case study on the *Neofusicoccum ribis*/*Neofusicoccum parvum* complex. **Molecular Phylogenetics Evolution**, Orlando, v. 51, n. 2, p. 259-268, 2009.

PEREIRA, F.M. **Cultura da goiabeira**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 47 p.

PEREIRA, F.M.; MARTINEZ Jr., M. **Goiabas para industrialização**. Jaboticabal: Legis Summa, 1986. 142 p.

PÉREZ, C.A.; WINGFIELD, M.J.; SLIPPERS, B.; ALTIER, N.A.; BLANCHETTE, R.A. Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 1, p. 53-69, 2010.

PHILLIPS, A.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 2, p. 513-529, 2005.

PHILLIPS, A.J.L. **Botryosphaeria**. Portugal: Universidade Nova Lisboa, 2004. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/genus_concept.htm>. Acesso em: 25 abr. 2011.

PIEIDADE NETO, A. Goiaba: o trunfo das virtudes, só agora reveladas. In: FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2002**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2002. p. 536.

PIZA Jr., C.T.; KAVATI, R. **A cultura da goiaba de mesa**. Campinas: CATI, 1994. 28 p. (Boletim Técnico 219).

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R.A. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J. (Eds.). **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford. CAB International. 1992. p. 289-307.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). **Colletotrichum**: host specificity, pathology and host-pathogen interaction. Saint Paul: APS Press, 2000. 393 p. ok

RIBEIRO, V.G.; ASSIS, J.S.; SILVBA, F.F.; SIQUEIRA, P.P.X.; VILARONGA, C.P.P. Armazenamento de goiabas 'Paluma' sob refrigeração e em condição ambiente, com e sem tratamento com cera de carnaúba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 203-206, 2005.

RIDGWAY, H.J.; AMPONSAH, N.T.; BROWN, D.S.; BASKARATHEVAN, J.; JONES, E.E.; JASPERS, M.V. Detection of botryosphaeriaceous species in environmental samples using a multi-species primer pair. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 1118-1127, 2011.

ROBBS, C.F.; ALMEIDA, O.C.; PIMENTEL, J.P. Cancro da goiabeira causado por *Botryosphaeria dothidea*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 3, p. 454, 1980.

RODES, M.J.C. The maturation and ripening of fruit. In: THIMANN, K.V.; ADELMAN, R.C.C.; ROTH, G.S. **Senescence in plants**. Gainesville: CRC Press, 1980. p. 157-205.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

ROTEM, J. Dispersal. In: _____. **The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity**. Saint Paul: APS, 1994. chap. 8, p. 137-153.

SALZEDAS, L.F.; RODRIGUES NETTO, S.M. Ocorrência do cancro da goiabeira causada por *Botryosphaeria dothidea* na região de Araçatuba Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 229, 1985.

SANTOS, R.; CARVAJAL, R.; MONTIEL, R. Evaluación de cinco fungicidas en el control de la pudrición apical de los frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.) **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v. 10, n. 1, p. 23-38, 1993.

SANTOS-FRANCISCO, V.L.F.; BAPTISTELLA, C.S.L.; AMARO, A.A. **A cultura da goiaba em São Paulo**. 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1902>>. Acesso em: 01 ago. 2012.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 2/3, p. 90-106, 2007.

SLIPPERS, B.; CROUS, P.W.; DENMAN, S.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. **Mycologia**, New York, v. 96, n. 1, p. 83–101, 2004.

SLIPPERS, B.; JOHNSON, G.I.; CROUS, P.W.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the 32 *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 99-110, 2005.

SLIPPERS, B.; SMIT, W.A.; CROUS, P.W.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 128-139, 2007.

SOARES, A.R.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e molhamentos. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 265-272, 2008.

SOARES-COLLETTI, A.R. **Doenças quiescentes em goiabas: quantificação e controle pós-colheita**. 2012. 143p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAVARES, S.C.C.H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 46-52, 2002.

THOMIDIS, T.; MICHAILIDES, T.J.; EXADAKTYLOU, E. *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 4, p. 661-668, 2011.

ÚRBEZ-TORRES, J.R.; LEAVITT, G.M.; GUERRERO, J.C.; GUEVARA, J.; GUBLER, W.D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 4, p. 519-529, 2008.

ÚRBEZ-TORREZ, J.R.; PEDUTO, F.; STRIEGLER, R.K.; URREA-ROMERO, K.E.; RUPE, J.C.; CARTWRIGHT, R.D.; GUBLER, W.D. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 52, p. 169-189, 2012.

VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. Influência da temperatura e da umidade nas epidemias de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 149-207, 1996.

VANDERPLANK, J.E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.

VENTURA, J.A.; COSTA, H. Manejo Integrado das doenças da Goiabeira. In: COSTA, A.F.S.; COSTA, A.N. (Ed.). **Tecnologias para produção de goiaba**. Vitória: INCAPER, 2003. p. 231-282.

VON ARX, J.; MULLER, E. Die Gattungen der amerosporen Pyrenomyceten. **Beitraege zur Kryptogamenflora der Schweiz**, Switzerland, v. 11, n. 1, p. 1-434, 1954.

WATADA, A.E.; HERNER, R.C.; KADER, A.A.; ROMANI, R.J.; STABY, G.L. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. **Hortscience**, Alexandria, v. 19, n. 1, p. 20-21, 1984.

WATANABE, H.S. Comercialização de goiaba no mercado nacional. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H.A.; AMORIM, D.A. (Ed.). **Cultura da goiaba do**

plantio à comercialização. Jaboticabal:FCAV, Capes, CNPq, FAPESP, Fundunesp, SBF, 2009. P. 133-150.

WHITE, T.J.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; WHITE, T.J. Eds. **PCR protocols: a guide to methods and applications.** San Diego: Academic Press. 1990. p.315–322.

WILLS, R.; McGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. **Introduccion a la fisiologia y manipulaci3n poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentals.** 2 Ed. Zaragoza; Acribia, 1998. 240 p.

WRIGHT. A.F.; HARMON, P.F. Identification of species in the Botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 8, p.966-971, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A - Árvore construída por inferência bayesiana do alinhamento sequências de ITS, enraizada com o *Bionectria* sp

Apêndice B - Árvore construída por inferência bayesiana do alinhamento sequências de *B*-tubulina, enraizada com o *Bionectria* sp