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

**Podridão Floral dos Citros: dinâmicas temporal e espacial,
sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e
controle da doença**

Geraldo José da Silva Junior

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

**Piracicaba
2011**

Geraldo José da Silva Junior
Engenheiro Agrônomo

**Podridão Floral dos Citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de
Colletotrichum acutatum a fungicidas e controle da doença**

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a **LILIAN AMORIM**

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

**Piracicaba
2011**

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

Silva Junior, Geraldo José da
Podridão Floral dos Citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de
Colletotrichum acutatum a fungicidas e controle da doença / Geraldo José da Silva
Junior. - - Piracicaba, 2011.
131 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Controle químico 2. Fungicidas - Resistência 3. Epidemiologia 4. Laranja 5. Podridão
(Doença de planta) I. Título

CDD 634.31
S586p

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

*Aos meus pais Geraldo e Marisa,
pelo incentivo, educação e formação a mim oferecidos,
em especial a minha Mãe, que mesmo à distância sempre esteve tão perto.*

*Ao meu irmão Gerson e à minha irmã Janaina,
pela amizade, companheirismo, apoio, carinho, respeito
e por estarem sempre me apoiando em todos os momentos de minha vida.*

DEDICO

*A toda minha família que incluem os entes queridos e os grandes amigos,
em especial ao meu avô José “Necreto” (in memorian),
ao qual peço desculpas por não estar presente do teu lado
nos últimos momentos de tua vida.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À professora Dr.^a Lilian Amorim pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio incondicional, confiança, seriedade de sempre e agradável convívio.

Ao agora professor Dr. Marcel Bellato Spósito pela amizade, valiosas conversas, sugestões, além de todo o apoio, conselhos e conhecimentos passados.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelo empenho em transmitir os conhecimentos e pela excelente contribuição para minha formação.

Ao amigo Denis Rogério Marin pelo apoio incondicional e empenho estando sempre comigo durante a execução de praticamente todos os experimentos realizados.

Ao pesquisador Eduardo Feichtenberger pela amizade e por tudo que pude aprender durante as conversas, principalmente sobre citricultura e doenças fúngicas.

À Prof.^a Dr.^a Natália A. R. Peres da Universidade da Flórida e ao colega Prof. Dr. Renato B. Bassanezi do Fundecitrus pelas dicas e colaborações.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, em especial ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fapesp pelo apoio financeiro concedido através da minha bolsa e do Projeto temático e também ao Fundecitrus pelo apoio e financiamento dos trabalhos.

À empresa Novamerica Citrus (Agroterenas) em nome dos colegas Aprígio Tank Jr. e Márcio A. Soares e à Fazenda Castel Franco em nome do Dr. Lourival Mênaco pelo apoio e liberação das áreas para realização dos ensaios.

Aos amigos e amigas da pós-graduação do Laboratório de Epidemiologia, Maria Cândida, Caroline Rabelo, Thaís Martins, Ana Raquel e Guilherme Frare e da iniciação científica, Juliana Baggio, Felipe Boresztein, Paulo Alves, Timóteo Scheidt, Isabela Primiano e Aricelis Biscaro pelo apoio e amizade. Em especial aos grandes amigos e “irmãos” Alécio Moreira, Fabrício Packer e Julio Barbosa.

Aos amigos e às amigas do Departamento de Fitopatologia pela amizade e excelente convívio, em especial à Ana Mello e ao Leandro Dallagnol.

Aos demais amigos e amigas de outros departamentos da Esalq/USP. Em especial à Vívian Carvalho, Layanne Souza, Elisa Matos, Fabiana Mingossi e Livia Marcolini e aos amigos Marcell Chiovato, Vinícius Resende e Tiago Garcez.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia. Em especial à Silvia Lourenço pela amizade e por todo o apoio.

Aos técnicos agrícolas José Julio e Yago Barbosa e ao João Batista pelo apoio incondicional nos experimentos nas fazendas.

A todos os colegas do Departamento Científico do FUNDECITRUS pela amizade, apoio, convívio e por estarem sempre à disposição.

Aos parceiros e pesquisadores de empresas e instituições públicas e privadas.

Aos amigos (estudantes e professores) da graduação e mestrado na UFV que sempre foram conselheiros, em especial ao Prof. Onkar D. Dhingra.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao meu Deus, por dar-me a oportunidade de conhecer e ter todas essas pessoas fazendo parte da minha história.

*“Na ciência, paradigmas são aceitos ou refutados,
alguns por conformismo se tornam dogmas
até que algum mortal cientista consiga se tornar um Deus
e provar para outros que ciência não é religião e a verdade é mutável”.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
Referências	17
2 EPIDEMIOLOGIA: DINÂMICAS TEMPORAL E ESPACIAL DA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS EM POMARES DE LARANJA DOCE NO ESTADO DE SÃO PAULO...	19
Resumo	19
Abstract	20
2.1 Introdução	20
2.2 Desenvolvimento	22
2.2.1 Revisão Bibliográfica	22
2.2.2 Material e Métodos	30
2.2.2.1 Coleta de dados climáticos	30
2.2.2.2 Descrição das áreas experimentais	30
2.2.2.3 Avaliações e coleta de dados experimentais	32
2.2.2.4 Análise do progresso temporal das epidemias	34
2.2.2.5 Caracterização da dinâmica espacial das epidemias	34
2.2.2.6 Relação de dependência de plantas sintomáticas entre os anos	36
2.2.2.7 Correlação entre flores sintomáticas e cálices persistentes	36
2.2.2.8 Avaliação da porcentagem de flores sintomáticas por planta	36
2.2.3 Resultados	37
2.2.3.1 Análise do progresso temporal das epidemias	37
2.2.3.2 Caracterização da dinâmica espacial das epidemias	48
2.2.3.3 Relação de dependência de plantas sintomáticas entre os anos	56
2.2.3.4 Correlação entre flores sintomáticas e cálices persistentes	57
2.2.3.5 Avaliação da porcentagem de flores sintomáticas por planta	57
2.2.4 Discussão	59
2.3 Conclusões	67

Referências.....	68
3 SENSIBILIDADE DE <i>Colletotrichum acutatum</i> A FUNGICIDAS E CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS.....	75
Resumo	75
Abstract.....	76
3.1 Introdução.....	77
3.2 Desenvolvimento	79
3.2.1 Revisão Bibliográfica	79
3.2.2 Material e Métodos	89
3.2.2.1 Coleção de isolados.....	89
3.2.2.2 Ensaio com fungicidas em laboratório	90
3.2.2.3 Ensaio com fungicidas em casa-de-vegetação	91
3.2.2.4 Ensaio com fungicidas no campo.....	91
3.2.3 Resultados.....	96
3.2.3.1 Ensaio com fungicidas em laboratório	96
3.2.3.2 Ensaio com fungicidas em casa-de-vegetação	100
3.2.3.3 Ensaio com fungicidas no campo.....	100
3.2.3.4 Elaboração de uma função de dano para a podridão floral dos citros	113
3.2.4 Discussão	114
3.3 Conclusões	122
Referências.....	122
ANEXO	129

RESUMO

Podridão floral dos citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença

A Podridão Floral dos Citros (PFC), causada por *Colletotrichum acutatum*, foi observada em 1956/57 em Belize e relatada posteriormente em 1979. Neste mesmo ano a PFC também foi relatada no Brasil e, desde então, tem causado prejuízos todas às vezes nas quais o período de florescimento coincide com a ocorrência de chuvas. O controle da PFC é realizado principalmente por meio de pulverizações preventivas com fungicidas. O uso indiscriminado de fungicidas com o mesmo modo de ação pode selecionar indivíduos resistentes. O conhecimento da epidemiologia da PFC pode gerar informações precisas a serem utilizadas na elaboração de estratégias de manejo no campo, bem como melhorar a eficiência do controle químico da doença. Assim, foi proposto este trabalho com os objetivos de: i) caracterizar as dinâmicas temporal e espacial da PFC em pomares jovens de laranja doce; ii) avaliar *in vitro* a sensibilidade de isolados de *C. acutatum* a fungicidas e; iii) avaliar o efeito de diferentes fungicidas, intervalos de aplicação e programas de pulverização no controle da PFC no campo. A dinâmica temporal e espacial da PFC foi caracterizada em três talhões de 2 a 4 anos de idade com 500 plantas cada. Crescimento explosivo da PFC foi observado com altas taxas diárias de progresso (r) descritas pelo modelo logístico de 0,55 após chuvas e período de molhamento foliar prolongado. A PFC apresentou padrão espacial variável, inicialmente aleatório e posteriormente moderadamente agregado, indicando existir contribuição de outras fontes para a disseminação do patógeno além das chuvas com ventos. Não houve correlação entre incidência de sintomas em flores e de cálices persistentes. Os cálices persistentes não são importantes fontes de inóculo. *In vitro*, ensaios de sensibilidade a fungicidas demonstraram que isolados de *C. acutatum* coletados no Estado de São Paulo em 2008 não apresentaram resistência aos fungicidas difenoconazole e carbendazim. Em casa-de-vegetação, os fungicidas carbendazim e a mistura (trifloxistrobina + tebuconazole) apresentaram efeito significativo quando aplicados em pré-inoculação e 24 h pós-inoculação de *C. acutatum*, mas somente a mistura foi efetiva 48 h após a inoculação. Nos experimentos de controle químico no campo, esta mistura fungicida foi mais eficiente que os demais produtos para o controle da PFC em áreas com alta incidência da doença. Quando a proporção de flores sintomáticas atinge 100%, a redução na produção será em torno de 70% em pomares adultos de laranja 'Pera'. Pulverizações frequentes podem ser requeridas durante todo o período de florescimento para o controle da doença, embora sejam mais importantes quando ocorrem chuvas em dois ou mais dias consecutivos com prolongamento do molhamento foliar, principalmente durante a expansão das pétalas e abertura das flores.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Epidemiologia; Controle químico; Resistência a fungicidas; Programas de pulverização

ABSTRACT

Postbloom fruit drop: temporal and spatial dynamics, sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to fungicide and disease control

Postbloom fruit drop (PFD), caused by *Colletotrichum acutatum*, was firstly observed in Belize during 1956-1957 and subsequently reported in 1979. In the same year the disease was also reported in Brazil. PFD causes severe damage when bloom period coincides with rains. The disease is controlled primarily by preventive fungicide sprays. The repeated use of fungicides with the same mode of action can select resistant individuals. The knowledge of PFD epidemiology can generate precise information to develop efficient control strategies and improve the efficacy of chemical control. Thus, this study aimed to: i) characterize the temporal and spatial dynamics of PFD in young sweet orange orchards, ii) evaluate *in vitro* the baseline sensitivity of *C. acutatum* to fungicides and, iii) evaluate the efficacy of different fungicides, spray intervals and fungicide application schedule for PFD control. The temporal and spatial PFD-dynamics was characterized in three 2-to-4-year-old orchards with 500 trees each. High daily disease progress rates (r) described by the logistic model of 0.55 were observed after rainfall and prolonged leaf wetness. The spatial pattern of diseased trees varied considerably, initially at random and latter moderately aggregated, suggesting the contribution by other pathogen spread mechanisms, beside rain with wind. There was no correlation between the incidence of diseased flowers and the incidence of persistent calyxes. These calyxes are not important sources of inoculum. *In vitro*, assays demonstrated that the isolates of *C. acutatum* from São Paulo State were not resistant to fungicides difenoconazol and carbendazim. In the greenhouse, carbendazim and the trifloxystrobin + tebuconazol mixture showed significant effects when applied prior to inoculation or 24 h after inoculation, however only the mixture was effective 48 h after inoculation. In the field, the fungicide mixture was more effective for PFD control in orchards with high disease incidence. When the proportion of symptomatic flowers reaches 100%, yield reduction can be as high as 70% in Pera sweet orange trees. Frequent sprays may be required during bloom period to control the disease, although sprays were more important when two or more rainy days with prolonged leaf wetness occurs, especially during petals expansion and flowers opening.

Keywords: *Citrus sinensis*; Epidemiology; Fungicide resistance; Chemical control; Fungicide application schedule

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, sendo responsável por 50% da produção do suco de laranja, sendo 98% destinado às exportações. O setor movimenta entre 1,5 e 2,5 bilhões de reais ao ano com as exportações e gera aproximadamente 230 mil empregos diretos e indiretos (NEVES et al., 2010). O Estado de São Paulo é responsável por cerca de 80% da produção brasileira e 72% da área colhida no País que é de aproximadamente 840 mil hectares (FNP, 2011).

Desde que a citricultura passou a ser cultivada em grande escala no século XX ela enfrentou graves problemas com pragas e doenças. Atualmente a citricultura enfrenta vários desafios, dentre eles continuam em destaque os problemas fitossanitários (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). A Podridão Floral dos Citros (PFC) se torna cada vez mais importante e desde a década de 90 já estava incluída entre as principais doenças da cultura (FEICHTENBERGER, 1991).

A PFC tem como agente causal o fungo *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996), mas foi relatada em Belize por Fagan (1979) como causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. A podridão floral é de ocorrência restrita ao continente americano e se torna explosiva quando as condições são favoráveis, podendo causar perdas de até 100% (TIMMER et al., 1994). Em Belize danos de 65% foram reportados por Denham (1979). Conforme mencionado por Porto (1993), a doença causou danos de até 95% em pomares no Brasil e na Argentina na década de 70. Praticamente todas as variedades de citros cultivadas são suscetíveis (FEICHTENBERGER et al., 1991; 1994).

Os sintomas da PFC estão presentes nas pétalas onde são formadas lesões marrons ou alaranjadas com a presença de acérvulos contendo conídios envolvidos por uma mucilagem (FAGAN, 1984a; TIMMER et al., 1994). Sintomas também são evidenciados no pistilo (estigma e estilete) onde são formadas lesões marrons ou negras (LIN et al., 2001). Posteriormente, em um segundo estágio ocorre abscisão de frutos levando a formação de cálices persistentes após a queda das pétalas nestas flores infectadas (FAGAN, 1984a).

A dinâmica espacial e temporal da podridão floral foi estudada por Agostini, Gottwald e Timmer (1993) na Flórida com inoculação artificial do patógeno, mas em condições naturais ainda não se conhecem os padrões de distribuição no espaço e no tempo. Segundo Timmer et al. (1994) a disseminação é realizada principalmente através de respingos de chuvas com ventos. Os insetos podem ser agentes disseminadores do patógeno a longas distâncias (PEÑA; DUNCAN, 1989), mas seriam pouco importantes para o incremento da PFC (TIMMER, 1999). Torna-se necessário um estudo mais detalhado destes padrões de distribuição visando entender o comportamento da podridão floral e os principais agentes ligados à disseminação.

A pulverização com fungicidas durante o florescimento é essencial para o controle da doença (DENHAM; WALLER, 1981; TIMMER, 2000). Os fungicidas captafol e benomil eram os principais utilizados para o controle da doença (FAGAN, 1984b; TIMMER et al., 1994), mas com a proibição destes fungicidas, outros como carbendazim, folpet e difenoconazole passaram a ser utilizados para o controle da PFC no Brasil, porém com efetividade muito variável (GOES et al. 2008; PERES, 2002). Desta forma, para melhorar a eficiência do controle da PFC e reduzir a probabilidade de *C. acutatum* se tornar resistente a fungicidas, a busca por novos produtos se torna essencial, assim como a realização de monitoramento da resistência aos fungicidas.

A podridão floral é de ocorrência esporádica com surgimento repentino quando se tem chuva durante o florescimento (TIMMER et al., 1994). Uma das opções de manejo da doença é a adoção de um sistema de previsão. Timmer e Zitko (1993) desenvolveram um sistema de previsão para ser utilizado em pomares da Flórida que posteriormente sofreu modificações a fim de melhorá-lo (TIMMER; BROWN, 2000). Esse sistema foi alterado e avaliado para uso no estado de São Paulo por Peres (2002) e Peres et al. (2004), embora ainda não seja utilizado pelos citricultores do estado.

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho caracterizar a dinâmica temporal e espacial da doença visando entender o comportamento da mesma, avaliar a sensibilidade de *C. acutatum* aos fungicidas utilizados no controle da PFC, analisar o efeito de novas moléculas fungicidas e, propor adaptações para o sistema de previsão existente a fim de torná-lo mais simples e de fácil utilização pelos citricultores.

Referências

- AGOSTINI, J.P.; GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 485-490, 1993.
- BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, v.86, p.523-527, 1996.
- DENHAM, T. G. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. **PANS**, London, v. 25, p. 30-36, 1979.
- DENHAM, T.G.; WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 98, n. 1, p. 65- 77, 1981.
- DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.1-18.
- FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 91, p. 13-20, 1979.
- _____. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: I. Disease epidemiology. **Turrialba**, Turrialba, v. 34, p. 173-177, 1984a.
- _____. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial/ ground spraying. **Turrialba**, Turrialba, v. 34, p. 179-186, 1984b.
- FEICHTENBERGER, E. Queda dos frutos jovens de citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 12, n.2, p. 513-521, 1991.
- _____. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 109-28, 1994.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citros. 2011. In _____. **Agrianual 2011**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2011. p. 245-306.

- GOES, A.; GARRIDO, R.B.O.; REIS, R.F.; BALDASSARI, R.B.; SOARES, M.A. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 71-76, 2008.
- LIN, Y.; STOVER, E.; SONODA, R.; ROSSKOPF, E. Stigma and style necrosis is associated with postbloom fruit drop disease in citrus following artificial inoculation. **Hortscience**, Alexandria, v. 36, n. 6, p. 1138, 2001.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR, 2010. 137p.
- PEÑA, J.E.; DUNCAN, R. Role of arthropods in the transmission of post bloom fruit drop. In: FLORIDA STATE HORTICULTURAL SOCIETY, 1989, Tampa. **Proceedings...** Tampa: Florida State Horticultural Society. 1989. p. 249-251.
- PERES, N.A.R. **Modelo de previsão e controle da podridão floral dos citros causada por *Colletotrichum acutatum***. 2002. 113 p. Tese (Doutorado em Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; FURTADO, E.L.; TIMMER, L.W. Evaluation of systems for timing of fungicide sprays for control of postbloom fruit drop of citrus in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 731-735, 2004.
- PORTO, O.M. Queda anormal de frutos jovens de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n. 1, p. 341-356. 1993.
- TIMMER, L.W. Diseases of fruit and foliage. In: TIMMER, L.W.; DUNCAN, L.W. **Citrus health management**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999, p.107-115.
- _____. Postbloom fruit drop disease. In: TIMMER, L.W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. St. Paul: APS Press, 2000. p. 21-22.
- TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interactions of *Colletotrichum***. Saint Paul: American Phytopathological Society Press. 2000. p. 300-316.
- TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 501-504, 1993.
- TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop of citrus, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, p. 329-334, 1994.

2 EPIDEMIOLOGIA: DINÂMICAS TEMPORAL E ESPACIAL DA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS EM POMARES DE LARANJA DOCE NO ESTADO DE SÃO PAULO

Resumo

Os trabalhos relacionados à epidemiologia da podridão floral dos citros (PFC) são escassos. Apenas um trabalho, realizado na Flórida (EUA), envolveu estudos da dinâmica da doença no tempo e no espaço. Desta forma, este estudo foi proposto com o objetivo de caracterizar o progresso temporal e a dinâmica espacial da podridão floral em pomares jovens de laranja doce no Estado de São Paulo. Os ensaios foram conduzidos em dois municípios da região Sudoeste do Estado, sendo duas áreas em Santa Cruz do Rio Pardo e uma área em Taquarituba. Em cada área, 500 plantas (20 linhas com 25 plantas cada) foram selecionadas para as avaliações que se iniciaram em 2008 nas áreas 1 (plantio em abril/2006) e 2 (plantio em abril/2007) em Santa Cruz do Rio Pardo e em 2009 na área 3 (plantio em dezembro/2007) em Taquarituba. As avaliações de sintomas em flores foram realizadas entre 2008 e 2010 com intervalos variando de 2 a 13 dias, dependendo da área e do ano. Os cálices persistentes foram avaliados após a queda fisiológica de frutos em cada ano e removidos das plantas após as avaliações. Com as avaliações foram gerados mapas de distribuição das plantas sintomáticas. Para o progresso temporal da PFC, os modelos de progresso da doença foram ajustados aos dados de incidência de plantas sintomáticas por regressão não-linear. O padrão espacial das plantas doentes foi caracterizado através do índice de dispersão e da aplicação da lei de Taylor modificada. Foi realizada correlação entre incidência de flores sintomáticas e de cálices persistentes. O modelo logístico foi o que apresentou melhor ajuste aos dados de epidemias da PFC, com altas taxas diárias de progresso ($r = 0,55$) nos anos em que as condições climáticas foram favoráveis. No início das epidemias, o padrão de distribuição espacial foi ao acaso, indicando haver outros meios de disseminação do inóculo além de chuvas com ventos. Com o aumento da incidência, este padrão se tornou agregado, evidenciando a contribuição das infecções localizadas, favorecidas pela ocorrência das chuvas com ventos. A retirada dos cálices persistentes não interferiu nos índices de doença no ano seguinte, não sendo esta uma fonte de inóculo importante. As plantas sintomáticas não coincidiram em dois anos consecutivos de avaliação. As epidemias explosivas foram associadas com dois ou mais dias chuvosos consecutivos e período de molhamento prolongado. A ocorrência de chuvas com período de molhamento curto ou apenas ocorrência de molhamento foliar sem chuvas não foram suficientes para causar epidemias severas.

Palavras-chave: *Colletotrichum acutatum*; *Citrus sinensis*; Modelo logístico; Epidemias explosivas; Dispersão do inóculo

Abstract

The studies related to postbloom fruit drop (PFD) epidemiology are scarce. A single study, in Florida (USA), involving the dynamics of the disease in time and space has been carried out. This study was proposed to characterize the temporal and spatial PFD-dynamics in sweet orange young orchards in São Paulo State. The experiments were carried out in two municipalities in the southwest of the State, two orchards in Santa Cruz do Rio Pardo and one in Taquarituba. In each orchard 500 trees (20 rows with 25 trees each) were selected for disease assessments, which began in 2008 in orchard 1 (planting in April/2006) and orchard 2 (planting in April/2007) of Santa Cruz do Rio Pardo, and in 2009 in orchard 3 (planting in December/2007) of Taquarituba. The flower symptoms were assessed during bloom period of 2008 to 2010, at an interval ranging from 2 to 13 days, depending on the orchard and year. Each year the persistent calyxes were assessed after physiological fruit drop and then removed from the trees. Maps were generated with the symptomatic trees distribution data. For the temporal analysis, disease progress models were fitted to symptomatic trees incidence data by non-linear regression. The spatial pattern of diseased trees was characterized by index of dispersion and the Taylor's power law. Correlation analyses were performed for the incidence of symptomatic flowers and persistent calyxes. The logistic model showed the best fit to the epidemic data, with high daily progress rates ($r = 0.55$) in years when weather conditions were favorable. In the beginning of the epidemics, the spatial pattern of diseased trees was at random, suggesting that there were other mechanisms of inoculum spread besides rain with wind. As the disease incidence increases, the spatial pattern of diseased trees became aggregated, indicating local infections, which are favored by rain with wind. The persistent calyxes removal did not affect the occurrence of the PFD disease in the following season. The persistent calyxes do not appear to be an important source of inoculum. The symptomatic trees did not coincide during two consecutive years of the study. The disease outbreaks were associated with two or more rainy days with prolonged leaf wetness. However, rainfalls with short leaf wetness or only leaf wetness without rain were not enough to cause PFD outbreaks.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*; *Citrus sinensis*; Logistic model; Outbreak; Spread of inoculum

2.1 Introdução

“A epidemiologia é o estudo de populações de patógenos em populações de hospedeiros e da doença resultante desta interação, sob influência do ambiente e a interferência humana” (KRANZ, 1974). É importante ter conhecimento dessas interações para que se possa elaborar estratégias de controle interferindo no ciclo da doença (BERGAMIN; AMORIM, 1996). Nos estudos de epidemias em plantas, as

análises temporais de patossistemas são feitas através de ajustes de modelos matemáticos às curvas de progresso da doença, proposto por Vanderplank (1963) que foram modificados e evoluíram nas últimas décadas. Os padrões espaciais de doenças são analisados através de diferentes métodos estatísticos, que os descrevem. A formação desses padrões é posteriormente relacionada ao padrão de dispersão do patógeno ou às variações ambientais que ocorrem na área analisada (MADDEN; HUGHES; VAN DEN BOSCH, 2007).

A informação sobre a dinâmica espaço-temporal de doenças em plantas pode ser utilizada para descrever e compreender o progresso de doenças (CAMPBELL; MADDEN, 1990), desenvolver planos de amostragens (HUGHES; GOTTWALD, 1999), avaliar o progresso da doença com diferentes tratamentos (BERGAMIN FILHO et al., 2002) e correlacionar condições climáticas com progresso da doença (AGOSTINI; GOTTWALD; TIMMER, 1993). O conhecimento dessa dinâmica espaço-temporal é de fundamental importância para entender a estrutura e o comportamento de diferentes patossistemas (CAMPBELL; MADDEN, 1990; BERGAMIN FILHO et al., 2002).

A epidemiologia da Podridão Floral dos Citros (PFC) começou a ser estudada no fim da década de 70. Nesses estudos, aspectos relacionados ao ciclo da doença, como condições favoráveis para a germinação de conídios *in vitro* (FAGAN, 1979) e o efeito da chuva, umidade relativa e molhamento foliar no desenvolvimento da doença (DENHAM; WALLER, 1981) foram esclarecidos. Somente na década de 90 que Agostini, Gottwald e Timmer (1993) realizaram um trabalho envolvendo a dinâmica temporal da doença no campo. O modelo escolhido por estes autores para representar o progresso da PFC foi o de Gompertz, mas as epidemias da doença parecem seguir outro padrão.

As interações entre *C. acutatum*, citros e o ambiente, ainda não estão bem entendidas. Este fungo é um patógeno comum em diferentes culturas, conforme mencionado por Jeffries et. al. (1990), Sutton (1992) e Peres et al. (2005). Em citros, este fungo pode causar uma epidemia repentinamente (TIMMER et al., 1994), fato este intrigante, sabendo que sua principal forma de disseminação ocorre pela ação de

chuvas com ventos. Uma possível participação de insetos nesta disseminação foi observada por Pena e Duncan (1989).

Os conídios secundários formados nas folhas, mencionados no trabalho de Zulfiqar, Bransky e Timmer (1996), poderiam ser disseminados pelo vento, uma vez que não são produzidos em acérvulos contendo mucilagem. Ainda não se conhece as formas de disseminação do inóculo para áreas onde a doença não está presente, assim como não há trabalhos que demonstrem a importância do inóculo interno e externo na ocorrência de epidemias explosivas nos primeiros anos de cultivo de citros. Na literatura não há relatos de trabalhos com caracterização da dinâmica espacial e do progresso temporal da PFC em pomares sob condições de inoculação natural.

Com o objetivo de esclarecer o progresso temporal e caracterizar os padrões de distribuição espacial da podridão floral no campo desde os primeiros anos de cultivo de citros, buscando compreender os agentes envolvidos na disseminação de *C. acutatum*, foi proposto este trabalho.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

As regiões Norte e Nordeste do Estado de São Paulo contribuem com aproximadamente 65% da produção de citros do Estado. A região Sudoeste apresentou um aumento de 89% na área plantada entre 2005/06 e 2009/10 e atualmente detém aproximadamente 15% da área plantada com citros no Estado. Os principais municípios que englobam esta região são Sorocaba, Itapetininga, Avaré e Santa Cruz do Rio Pardo. Este crescimento de área plantada marcou a expansão da citricultura para a região Sudoeste onde o custo da terra é menor, a ocorrência de chuvas é maior dispensando o uso de irrigação e a incidência de doenças como o Huanglongbing (HLB) e a clorose variegada dos citros (CVC) é menor (NEVES et al., 2010).

Com a expansão da citricultura na região Sudoeste do Estado, a podridão floral se tornou mais importante, uma vez que tem sido mais frequente sua ocorrência nesta

região, considerada a mais favorável para esta doença devido às frequentes ocorrências de chuvas durante o período de florescimento (FEICHTENBERGER, 1994).

Os primeiros sintomas da PFC foram observados em Belize em 1956/1957. Nesta época acreditava-se que a doença era causada por um desbalanço hormonal e para o controle utilizava-se o 2,4-D (FAGAN, 1984b). Somente no final da década de 70 que a doença foi relatada como causada por *C. gloeosporioides* (FAGAN, 1979). No Brasil, a PFC também foi relatada na década de 70 por Porto, Rossetti e Dornelles (1979) no Estado do Rio Grande do Sul. Na década de 90 o agente causal foi reclassificado e a espécie causadora da PFC passou a ser *C. acutatum* (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996). Os isolados de *Colletotrichum* de citros foram classificados em três grupos ou linhagens: a FGG (fast-growing gray), forma saprofítica que pode causar antracnose em ramos, folhas e frutos, mas não infecta flores jovens de citros, a SGO (slow-growing orange), associada aos sintomas de PFC, e a KLA (key lime anthracnose), associada à antracnose do limão 'Galego' (AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992). As linhagens SGO e KLA pertencem à espécie *C. acutatum* e a FGG é *C. gloeosporioides* (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996). Esses autores, assim como Agostini, Timmer e Mitchell (1992) e Goes e Kimati (1997) acreditam que as formas SGO e KLA tenham ancestrais comuns.

A PFC foi observada na Flórida em 1983 e relatada por McMillan e Timmer (1989) causando severos danos em 1989, 1991, 1993, 1994, 1998 (PERES; SOUZA; TIMMER, 2000). A doença também já foi relatada em outros países das Américas, como Argentina (SCHWARZ; KLEIN; MONSTED, 1978), República Dominicana, Colômbia, Panamá (DENHAM, 1979), Trindade (FAGAN, 1984a), México (OROZCO SANTOS; GONZALEZ GARZA, 1986), Costa Rica e Jamaica (TIMMER et al., 1994).

No Estado de São Paulo a PFC causou prejuízos principalmente nas safras 1977/78 (ROSSETI et al., 1981), 1990/91 (FEICHTENBERGER, 1991), 1993 (FEICHTENBERGER, 1994), 1996 e 1998 (PERES; SOUZA; TIMMER, 2000). Os maiores danos da PFC no Estado ocorrem normalmente na região Sudoeste, mas em alguns anos ela ocorre de forma generalizada causando prejuízos em todas as regiões, como a região de Limeira (Região Sul do Estado), região de Araraquara (Região

Central), dentre outras citadas por Feichtenberger (1991; 1994). A PFC também causa severos danos mesmo com a utilização de fungicidas (principal medida de controle da doença), em anos onde a chuva coincide com o período de florescimento. Após a proibição do captafol e posteriormente do benomil, os principais compostos utilizados para controle da doença na década de 80, não foi encontrado outro fungicida com controle satisfatório para esta doença (PORTO, 1993).

A sobrevivência de *C. acutatum* em folhas de citros foi investigada sob condições controladas e o patógeno sobreviveu na forma de apressórios aderidos às folhas através de infecção quiescente por um período de 28 dias (AGOSTINI; TIMMER, 1994). No entanto, ainda não está esclarecido se essa forma de sobrevivência é eficiente para manter o patógeno viável durante períodos mais prolongados, de até um ano, que correspondem aos intervalos entre as floradas, principalmente de variedades com florescimento uniforme e curto. Segundo Agostini e Timmer (1994), em condições de campo, durante o ano, a população de *C. acutatum* apresentou bastante variação e em algumas épocas não foi detectado nenhum propágulo nas folhas. Zulfikar, Bransky e Timmer (1996) relataram que o inóculo proveniente dos apressórios aderidos às folhas é estimulado pela presença de extrato floral, induzindo o fungo a produzir conídios secundários. Desta forma, considera-se que o inóculo primário da podridão floral dos citros é proveniente dessas estruturas de sobrevivência (TIMMER; BROWN, 2000). Esses conídios secundários podem ser formados a partir dos tubos germinativos e dos apressórios ou diretamente do conídio primário sem a formação do tubo germinativo. O mais comum é a formação do conídio secundário em uma extremidade do conídio e o apressório na extremidade oposta (BARBOSA et al., 2006). De acordo com esses autores, os conídios secundários apresentam corpos lipídicos em abundância, que seriam uma reserva indispensável para a germinação e poderia permitir que os mesmos funcionassem como inóculo primário.

A sobrevivência de *C. acutatum* na forma de apressórios aderidos às folhas também foi relatada em morango (LEANDRO et al., 2003b) e em outras espécies vegetais, como berinjela, feijão e ervas daninhas dos gêneros *Vicia* e *Conyza* (FREEMAN; HOROWITZ; SHARON, 2001). Para a cultura do morango, os hospedeiros

alternativos são considerados importantes fontes de inóculo que permitem a sobrevivência do fungo na entressafra, mas no caso de citros provavelmente estes não tenham importância uma vez que a planta hospedeira permanece no campo por vários anos. Para a cultura do morango, o solo também tem importância como fonte de inóculo (EASTBURN; GUBLER, 1990, 1992), assim como os frutos mumificados (FREEMAN; SHALEV; KATAN, 2002), uma vez que os diferentes órgãos da cultura estão bem próximos do solo, bem diferente das flores e folhas em plantas cítricas.

Durante o florescimento, os respingos de água oriundos das flores induzem o apressório a germinar sobre as folhas e produzir “conídios secundários” sem formação de acérvulo. Esses conídios secundários, através dos respingos, atingem as flores sadias e iniciam o processo de infecção formando os sintomas de lesões alaranjadas nas pétalas após 3 a 4 dias (AGOSTINI; TIMMER, 1994). Os frutos dos ramos afetados se tornam amarelos e caem, enquanto os cálices ficam retidos (FAGAN, 1984a; TIMMER et al., 1994), formando estruturas popularmente denominadas “estrelinhas” (FEICHTENBERGER, 1994). Essas estruturas são características da doença e podem permanecer retidas nos ramos por mais de 12 meses (FUTCH; HEBB; SONODA, 1989). As folhas ao redor dos cálices retidos são menores, distorcidas e com nervuras espessadas (TIMMER, 1990).

A disseminação secundária ou local, dentro da mesma área de planta para planta, ocorre principalmente através de chuvas associadas com ventos conforme mencionado por Denham e Waller (1981); Fagan (1984a) e Timmer et al. (1994). Segundo Fagan (1984a) e Timmer (1999) existe a possibilidade do inóculo também ser disperso por insetos (ex.: abelhas), máquinas e equipamentos (TIMMER, 1999) ou por pessoas da colheita principalmente quando as plantas estiverem úmidas, uma vez que o período de florescimento e a época da colheita coincidem para algumas variedades de citros (FAGAN, 1984a), mas a contribuição destas fontes seria baixa para causar epidemias explosivas.

Peña e Duncan (1989) estudaram o papel de alguns insetos na disseminação da podridão floral e aproximadamente 2% destes continham esporos de *Colletotrichum* externamente em seu corpo e a maioria dos insetos pertencia às famílias Drosophilidae,

Apidae e Formicidae, com destaque para *Drosophila melanogaster* e *Apis mellifera* que poderia ser um agente disseminador a longas distâncias. Os isolados extraídos dos insetos mostraram-se patogênicos quando inoculados em flores. Por outro lado, alguns tripses, colchonilhas e moscas parecem não estar associados à disseminação do inóculo.

Praticamente não há trabalhos relacionados à epidemiologia da PFC. No Brasil a maioria dos estudos com a podridão floral foi realizada com controle químico da doença (FEICHTENBERGER; SPÓSITO, 2000; GOES; MORETTO; DE WIT, 2000; GOES et. al., 2008; PORTO, 1981; SOUZA FILHO et. al., 1979). Estudos envolvendo epidemiologia foram realizados por Agostini, Gotwald e Timmer (1993) na Flórida (EUA) com análise de padrões temporais e espaciais e estudos pioneiros foram realizados por Fagan (1979, 1984a), por Denham (1979) e Denham e Waller (1981) em Belize, onde foram estabelecidas as condições climáticas favoráveis para a ocorrência da doença neste país.

Alguns desses estudos pioneiros foram realizados sob diferentes temperaturas e período de molhamento em laboratório (FAGAN, 1979) e outros foram conduzidos no campo (DENHAM; WALLER, 1981). Em laboratório foi utilizado um número reduzido de isolados, a germinação dos conídios ocorreu em grande amplitude de temperatura, com ótimo a 25 °C e molhamento acima de 13 horas. Um trabalho mais detalhado foi realizado por Leandro et. al. (2003a) com isolados de *C. acutatum* oriundos de morango e estes autores estabeleceram a faixa ideal de temperatura para germinação de conídios (23-27,7 °C), formação de apressórios (17,6-26,5 °C) e produção de conídios secundários a partir dos apressórios (21-32,7 °C).

Agostini, Gottwald e Timmer (1993) estudaram os gradientes de dispersão em pomares de laranja doce de 3 a 4 anos, onde a árvore central da parcela foi inoculada e a doença foi avaliada nas demais plantas da parcela. Foi observado gradiente abrupto nas primeiras avaliações e à medida que a incidência aumentava, os gradientes se tornaram mais suaves, provavelmente pela formação de focos secundários, mas não foram observadas epidemias explosivas, uma vez que a doença não ultrapassou 30% em nenhuma área. Fagan (1984a) mencionou que a dispersão ocorre na direção do

vento prevalente, podendo atingir poucas plantas vizinhas na linha e não ultrapassariam as linhas adjacentes, com possível envolvimento dos colhedores de frutos. Segundo Timmer et. al. (1994), os mecanismos de dispersão deste patógeno a longas distâncias não eram muito claros e até o momento ainda não são conhecidos.

As epidemias explosivas de doenças em plantas normalmente estão associadas a períodos curtos de latência e elevada capacidade de dispersão, como mencionado por Vanderplank (1963) para a requeima da batateira causada por *Phytophthora infestans* e ferrugem do trigo causada por *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, mas são exceção na natureza. O período de latência de *C. acutatum* é curto em flores de citros, variando de 2 a 5 dias em laranja doce (FAGAN, 1979; TIMMER, 1999), mas a capacidade de disseminação de *Colletotrichum* é limitada (BAILEY; JEGER, 1992), ocorrendo predominantemente via respingos de chuva em citros (FAGAN, 1979, 1984a; DENHAM; WALLER, 1981; TIMMER et al. 1994). Desta forma, ainda não se consegue explicar como uma doença causada por *Colletotrichum* possa ocorrer de forma repentina e causar perdas de até 100% conforme mencionado por Timmer et. al. (1994).

Este surgimento repentino da doença com evolução rápida também foi relatado por Porto (1993), mas apenas Agostini, Gottwald e Timmer (1993) na Flórida (EUA) estudaram a dinâmica espacial da doença e o progresso temporal por meio de modelos matemáticos. No entanto, observando-se este trabalho, nenhum dos modelos utilizados parece ter sido apropriado às curvas de progresso das epidemias. De acordo com os autores, o modelo de Gompertz apresentou melhor ajuste aos dados em relação aos modelos exponencial, logístico e monomolecular, mas as epidemias da podridão floral parecem seguir outro padrão. Esses ajustes às curvas podem gerar conclusões equivocadas. No trabalho, as maiores incidências foram observadas em Lake Alfred (EUA) mesmo com baixa quantidade de chuvas, mas os autores mencionam que as maiores taxas de progresso da doença ocorreram em Gainesville (EUA), devido à melhor distribuição das chuvas.

O estudo do progresso temporal de epidemias é realizado com o uso de modelos matemáticos de crescimento da doença no tempo. Os modelos mais comumente

utilizados para descrever o progresso de doenças em plantas são: linear, monomolecular, exponencial, Gompertz e logístico (NUTTER Jr., 1997). A seleção do modelo deve ser baseada no grau de ajuste de cada um aos dados através do coeficiente de determinação (R^2) entre os valores observados e previstos, no padrão de distribuição dos resíduos e dos valores médios do desvio padrão dos parâmetros estimados para cada modelo testado (CAMPBELL; MADDEN, 1990; BERGAMIN FILHO, 1995; MADDEN; HUGHES; VAN DE BOSCH, 2007).

O modelo linear é utilizado para doenças onde os incrementos ($dy/dt = r$) são constantes no tempo. Mas para a maioria das doenças em plantas o modelo monomolecular é mais utilizado que o linear para descrever o progresso de doenças onde não há disseminação planta-a-planta, uma vez que considera a redução da quantidade de tecido sadio na área ($1-y$) com o aumento da incidência (y), ou seja, o incremento da doença ($dy/dt = r(1-y)$) é alto no início da epidemia e decresce com o tempo, pois a quantidade de tecido sadio também decresce (CAMPBELL; MADDEN, 1990; NUTTER Jr., 1997).

O modelo exponencial ou logarítmico é utilizado para doenças disseminadas planta-a-planta dentro da área, ou seja, o número de novos indivíduos infectados será maior quanto maior for o número de indivíduos infectados na área. O incremento da doença ($dy/dt = r*y$) é diretamente proporcional ao nível de incidência (y) na área e à taxa de progresso da doença (r). Assim como o modelo exponencial, os modelos logístico e de Gompertz também são utilizados para epidemias com disseminação planta-a-planta e nestes dois modelos são consideradas a redução na quantidade de indivíduos sadios ($1-y$) à medida que a epidemia aumenta. O modelo logístico apresenta o incremento ($dy/dt = r*y(1-y)$) e ponto de inflexão quando a incidência da doença atinge 50% formando uma curva sigmóide simétrica. Já o modelo de Gompertz é representado pela equação diferencial $dy/dt = r*y(-\ln(y))$, com maiores incrementos quando a incidência atinge aproximadamente 37% sendo uma alternativa ao uso do logístico quando as taxas atingem o máximo mais rapidamente (CAMPBELL; MADDEN, 1990; MADDEN; HUGHES; VAN DE BOSCH, 2007; NUTTER Jr., 1997).

Existem diferentes formas de analisar os padrões de distribuição espacial de plantas doentes. Dentre as análises podemos citar algumas mais comumente utilizadas, tais como: índice de dispersão (D), aplicação da lei de Taylor modificada (MADDEN; HUGHES, 1995), cálculo da correlação interclasse (XU; RIDOUT, 2000), teste “ordinary run” (MADDEN et. al., 1982), autocorrelação espacial (CAMPBELL; MADDEN, 1990), análise de focos (NELSON, 1996), ajustes de modelos estocásticos espaço-temporais (GIBSON; AUSTIN, 1996; GOTTWALD et al., 1999) e modelos autolísticos (KRAINSKY et. al., 2008).

O índice de dispersão é baseado na relação entre a variância observada e a variância teórica dos dados (UPTON; FINGLETON, 1985). Normalmente a área é dividida em *quadrats* com tamanhos estabelecidos de forma retangular ou quadrangular. Estes índices não levam em consideração as coordenadas de cada medida, nem a localização da planta dentro do *quadrat*, mas são bastante utilizados na epidemiologia de doenças de plantas para descrever padrões de distribuição aleatórios ou agregados (BERGAMIN FILHO et al., 2002). A lei de Taylor foi proposta pelo mesmo em 1961 e modificada por Madden e Hughes (1995), onde a distribuição espacial é indicada pela equação: $\log(\text{variância observada}) = \log(A) + b \log(\text{variância binomial})$. Quando $\log(A) = 0$, ou seja, $A = 1$ e $b = 1$ e a variância observada é igual à variância binomial a distribuição é ao acaso. A agregação é indicada por valores de $b > 1$ ou $\log(A) > 0$. Uma vantagem da lei de Taylor em relação ao índice de dispersão é que esta análise permite determinar o padrão espacial de todo o conjunto de dados (MADDEN; HUGHES, 1995; MADDEN; HUGHES; VAN DE BOSCH, 2007).

A principal razão para se estudar a dinâmica espacial de epidemias está associada ao fato de se poder expressar o padrão de dispersão do patógeno. Entretanto, interpretações de padrões podem ser realizadas de forma incorreta uma vez que padrões semelhantes podem ser gerados a partir de diferentes mecanismos de dispersão do patógeno (BERGAMIN FILHO et al., 2002). O estudo da dinâmica espacial juntamente com o progresso temporal possibilita fazer interpretações mais corretas do comportamento de uma determinada epidemia no campo (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

A distribuição espacial de plantas sintomáticas nos auxilia na compreensão dos mecanismos de dispersão da doença em diferentes ambientes e um padrão espacial de uma população doente raramente é uniforme (UPTON; FINGLETON, 1995). Para investigar a natureza dessa não-uniformidade é necessário descrever os padrões espaciais das populações do hospedeiro e do patógeno, estabelecer como esses padrões estão relacionados e descrever como estes são afetados por variações espaciais do ambiente biótico e abiótico (BERGAMIN FILHO et. al., 2002). Nenhuma dessas informações, tanto dos padrões espaciais quanto do progresso temporal, está disponível no patossistema *C. acutatum* – citros.

2.2.2 Material e Métodos

Os experimentos de epidemiologia da PFC em condições de campo foram conduzidos em pomares de laranja doce com 2-4 anos de idade de 2008 a 2011 nos municípios de Santa Cruz do Rio Pardo e Taquarituba, ambos localizados na região Sudoeste do Estado de São Paulo.

2.2.2.1 Coleta de dados climáticos

Para coleta dos dados climáticos de temperatura, precipitação, velocidade do vento, umidade relativa do ar e período de molhamento foi utilizada uma estação meteorológica da marca Davis®, modelo: “Vantage Pro2 - Sem fio”, em cada uma das duas fazendas onde foram conduzidos os experimentos de epidemiologia da doença. As informações foram coletadas e arquivadas a cada 30 minutos.

2.2.2.2 Descrição das áreas experimentais

Em Santa Cruz do Rio Pardo foram selecionadas, em pomar comercial, duas áreas (áreas 1 e 2) e em Taquarituba foi selecionada uma área (área 3) para realização dos ensaios. Nas três áreas foram selecionadas 500 plantas (20 linhas com 25 plantas cada) que não receberam tratamento com fungicida durante o florescimento.

- **Área experimental 1 (Santa Cruz do Rio Pardo/SP)**

Coordenadas geográficas: 22°49.562' S e 49°22.024' O; Altitude: 575 m

O pomar selecionado foi de laranja doce 'Valencia' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertada em citrumelo 'Swingle' [*Citrus paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] com plantio em abril de 2006. O espaçamento era de 3,0 m entre plantas e 7,0 m entre linhas. O pomar no sentido leste fazia divisa com um pomar velho (17 a 20 anos) e no sentido oeste com culturas anuais. Ao sul, o pomar estendia-se até a divisa com outros pomares velhos (17 a 20 anos). Ao norte o pomar era cercado por cerca viva. Neste pomar as linhas de plantio foram dispostas no sentido nordeste-sudoeste (Figura 2.1).

- **Área experimental 2 (Santa Cruz do Rio Pardo/SP)**

Coordenadas geográficas: 22°47.010' S e 49°23.524' O; Altitude: 645 m

O pomar selecionado foi de laranja doce 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertada em limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) com plantio em abril de 2007. O espaçamento era de 2,8 m entre plantas e 6,5 m entre linhas. O pomar fazia divisa com pomares velhos (mais de 15 anos) ao leste e entre eles tinha uma cerca viva. Ao sul e ao oeste o pomar estava circundado por outros da mesma idade e ao norte continuava até fazer divisa com uma área de pastagem. As linhas de plantio estavam dispostas no sentido sudeste-noroeste (Figura 2.1).

- **Área experimental 3 (Taquarituba/SP)**

Coordenadas geográficas: 23°36.898' S e 49°14.290' O, Altitude 661 m

O pomar selecionado foi de laranja doce 'Valencia' enxertada em citrumelo 'Swingle' com plantio em dezembro de 2007. O espaçamento era de 2,8 m entre plantas e 6,5 m entre linhas. O pomar estava circundado por outros da mesma idade nos sentidos leste, oeste e sul, mas ao norte fazia divisa com uma área de culturas anuais (Figura 2.1).

*Imagens retiradas do Google Earth® em 08/11/2010.

Figura 2.1 - Descrição das áreas experimentais (A). As áreas 1 e 2 estão localizadas em Santa Cruz do Rio Pardo/SP e a área 3 em Taquarituba/SP. P1 e P25 são as plantas N°1 e N°25 dentro das linhas e L1 e L20 são as linhas de plantio N°1 e N°20. Não foram realizadas pulverizações com fungicidas nas três áreas

2.2.2.3 Avaliações e coleta de dados experimentais

• Área experimental 1

Em 2008 foram realizadas quatro avaliações de sintomas em flores nos dias: 08/08, 16/08, 27/08 e 03/09. Em 2009 foram realizadas nove avaliações (05/08, 11/08, 18/08, 27/08, 01/09, 08/09, 14/09, 18/09 e 24/09). Em 2010 foram realizadas quatro avaliações de sintomas em flores (13/10, 21/10, 02/11 e 08/11). Em todas as avaliações foram identificadas plantas com flores fechadas ou sem flores (0), plantas com flores

abertas e assintomáticas (1) e plantas com flores sintomáticas (2). Em dezembro de 2008 e de 2009 e em janeiro de 2011 foram realizadas as avaliações da incidência de plantas com cálices persistentes. Em julho de 2009 e de 2010 foram avaliadas as produções (peso e número de frutos) referentes aos florescimentos de 2008 e de 2009, respectivamente. Em junho de 2009 foi realizada a mensuração do número de cálices persistentes existentes por planta e sua retirada das mesmas.

- **Área experimental 2**

Em 2008, 2009 e 2010 foram realizadas avaliações de sintomas em flores. Em 2008 as avaliações foram realizadas nos dias: 08/09, 17/09, 27/09 e 02/10, em 2009 nos dias: 12/08, 28/08, 09/09, 15/09, 21/09 e 25/09 e em 2010 nos dias: 05/08, 11/08, 15/08, 23/08, 31/08, 13/09 e 22/09, conforme descrito para a área experimental 1. Em fevereiro de 2009, dezembro de 2009 e dezembro de 2010 foram realizadas as avaliações de incidência de plantas com cálices persistentes e do número de cálices persistentes por planta. Em junho de 2009 e junho de 2010 os cálices foram retirados das plantas. Em julho de 2009 foi realizada a colheita referente ao florescimento de 2008.

- **Área experimental 3**

Em 2008 a área foi demarcada, mas nenhuma planta floresceu. Em 2009 as avaliações de sintomas em flores foram iniciadas e realizadas nos dias: 07/08, 10/08, 12/08, 17/08, 19/08, 21/08, 24/08, 26/08, 31/08, 02/09, 07/09, 09/09, 11/09, 14/09, 16/09, 18/09 e 21/09. Em 2010 as avaliações foram realizadas nas seguintes datas: 03/08, 10/08, 20/08, 03/09, 12/09 e 22/09, conforme descrito para a área 1. Em 2009, além da avaliação de incidência de plantas com flores sintomáticas, todos os ramos com flores sintomáticas foram marcados e o número total de flores, flores abertas e flores sintomáticas foram avaliados por ramo. Em dezembro de 2009, fevereiro de 2010 e dezembro de 2011 foram realizadas as avaliações de cálices persistentes por meio da incidência de plantas com cálices persistentes e número de cálices por planta. Na ocasião, os cálices foram retirados das plantas. Em junho de 2010 foi avaliado o número de frutos por planta.

2.2.2.4 Análise do progresso temporal das epidemias

Os modelos exponencial, monomolecular, logístico e Gompertz foram ajustados aos dados de incidência de plantas sintomáticas ao longo do tempo por meio de regressões não-lineares:

Exponencial:

$$y = y_0 \exp (r \cdot x) \quad (1)$$

Monomolecular:

$$y = y_{\max} \cdot (1 - (y_{\max} / y_0) \cdot \exp(-r \cdot x)) \quad (2)$$

Logístico:

$$y = y_{\max} / (1 + ((y_{\max} - y_0) / y_0) \cdot \exp(-r \cdot x)) \quad (3)$$

Gompertz:

$$y = y_{\max} \cdot (\exp(-(-\log(y_0 / y_{\max})) \cdot \exp(-r \cdot x))) \quad (4)$$

Em que:

y = proporção de plantas afetadas no tempo x ;

y_0 = parâmetro do inóculo inicial;

r = parâmetro da taxa de progresso da doença;

$y_{\max}$ = parâmetro relacionado à estimativa da assíntota;

x = tempo (dias).

A escolha do melhor modelo foi feita através do grau de ajuste aos dados com base no coeficiente de determinação (R^2) entre os valores observados e previstos, do padrão de distribuição dos resíduos e dos valores médios do desvio padrão dos parâmetros y_0 , $y_{\max}$ e r estimados para cada modelo testado (BERGAMIN FILHO, 1995; CAMPBELL; MADDEN 1990; MADDEN; HUGHES; VAN DEN BOSCH, 2007).

2.2.2.5 Caracterização da dinâmica espacial das epidemias

Foram construídos mapas cumulativos de incidência para cada avaliação de plantas sintomáticas transformados em uma matriz (x, y, z), em que x = linha de plantio, y = planta na linha e z = condição da planta (0 para planta sem flor ou assintomática e 1

para sintomática). Um mapa foi construído para a incidência de cálices persistentes (0 para ausência e 1 para presença) em cada área e ano de avaliação. Com os dados de sintomas em pétalas foram realizadas análises utilizando *quadrats* do tamanho 3 x 2 (plantas na linha x linha de plantio) para caracterizar o padrão espacial da doença através do índice de dispersão (D) e aplicação da lei de Taylor modificada.

- Índice de dispersão (D)

O índice de dispersão (D) é função da variância observada (V_{obs}) e da variância binomial (V_{bin}). O valor de D foi estimado para cada avaliação de sintomas em flores na área 1 (2008, 2009 e 2010), área 2 (2009) e área 3 (2009) por meio da eq. (5):

$$D = V_{obs}/V_{bin} \quad (5)$$

onde:

$$V_{obs} = \sum (X_i - np)^2 / n^2 (N-1); \quad (6)$$

$$V_{bin} = p(1-p) / n. \quad (7)$$

O afastamento da aleatoriedade foi determinado por meio de teste Qui-quadrado, com $n-1$ graus de liberdade ao nível de 5% de significância. Valores de D significativamente iguais a 1,0 indicam distribuição ao acaso de plantas sintomáticas numa determinada data de avaliação (hipótese de nulidade). Por outro lado, valores de D significativamente maiores que 1,0 indicam agregação (MADDEN; HUGHES; VAN DEN BOSCH, 2007).

- Aplicação da lei de Taylor modificada

A lei de Taylor modificada relaciona, por meio de polinômio de primeiro grau, a variância observada (V_{obs}) e a variância binomial esperada (V_{bin}) para uma distribuição aleatória ou ao acaso. Quando os dados são expressos em incidência, a distribuição binomial é a que propicia o melhor ajuste para condições de aleatoriedade. Nesse caso, $\log(V_{obs}) = \log(A) + b \log(V_{bin})$, onde $\log(A)$ e b são parâmetros. Foram consideradas como variável independente o logaritmo da variância binomial estimada para cada avaliação e como variável dependente o logaritmo da variância observada. A significância das relações entre $\log(V_{obs})$ e $\log(V_{bin})$ foi determinada pelo teste F a 5% de probabilidade e a adequação do ajuste do modelo aos dados foi avaliada por meio

do coeficiente de determinação (R^2) e do padrão dos resíduos. A igualdade do parâmetro b a 1,0 foi testada por meio do teste t a 5% de probabilidade usando a estimativa do parâmetro e seu desvio padrão. A hipótese alternativa considerada foi $b > 1,0$. Valores de b significativamente maiores que 1,0 foram considerados indicativos de agregação, a qual varia com a incidência da doença. Já valores de b iguais a 1,0 com $\log(A) > 0$ indicaram agregação constante e valores de $b = 1$ e $\log(A) = 0$, o indicativo é de aleatoriedade e menores que 1,0 de regularidade (LARANJEIRA, 1997; MADDEN; HUGHES, 1995).

2.2.2.6 Relação de dependência de plantas sintomáticas entre os anos

Para verificar se as plantas que apresentaram flores sintomáticas em um determinado ano eram as mesmas que estavam com flores sintomáticas no ano seguinte foi utilizado o teste Qui-quadrado, que verifica em que medida os valores observados desviam-se dos valores esperados, ou seja, calculou-se o valor da dispersão para duas variáveis (dois anos) de escala nominal. A probabilidade (p) das plantas sintomáticas na primeira avaliação do ano seguinte ser as mesmas plantas do ano anterior foi calculada para a área 2 (entre 2008 e 2009) e para a área 3 (entre 2009 e 2010) utilizando este teste ao nível de 5% de probabilidade.

2.2.2.7 Correlação entre flores sintomáticas e cálices persistentes

Em 2009, na área 3, foram marcados todos os ramos que apresentaram sintomas e avaliou-se o número total de flores, o número de flores sintomáticas e posteriormente o número de cálices persistentes e de frutos fixados. Análise de correlação entre o número de flores sintomáticas e de cálices persistentes no mesmo ramo foi realizada para os ramos sintomáticos.

2.2.2.8 Avaliação da porcentagem de flores sintomáticas por planta

Em 2009, na área 2, ao final das avaliações foram escolhidas 20 plantas ao acaso e avaliou-se a porcentagem de flores sintomáticas por planta, contando-se 100 flores para expressar a “severidade” da doença dessas plantas. Em 2010, na área 1, foi avaliada a porcentagem de flores com sintomas em todas as 500 plantas.

2.2.3 Resultados

2.2.3.1 Análise do progresso temporal das epidemias

Na Figura 2.2A está representado o florescimento e a ocorrência da PFC na área 1 durante o ano de 2008. Chuvas entre 10 e 40 mm ocorreram em quatro dias durante o período de florescimento (Figura 2.2B). O início da doença ocorreu no 16º dia e a primeira chuva no 13º dia, ou seja, três dias após a condição favorável foram observados os primeiros sintomas. Aos 27, 38 e 41 dias após início do florescimento também ocorreram chuvas, mas as chuvas ocorreram de forma isolada (Figura 2.2B) e a doença atingiu 25% de plantas com flores sintomáticas ao final do florescimento (Figura 2.2A). As temperaturas (mínima e máxima) variaram de 7 a 35°C e, em alguns casos, com a ocorrência das chuvas a amplitude térmica diminuiu (Figura 2.2B).

Figura 2.2 – Incidência da podridão floral, florescimento e variáveis climáticas em Santa Cruz do Rio Pardo (área 1) em 2008. (A) Florescimento em proporção de plantas com flor (linhas pontilhadas), incidência da doença em proporção de plantas com flor sintomática (pontos) e curva do modelo logístico ajustada aos dados de incidência da doença (linha contínua); (B) Temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-) e precipitação pluviométrica diária em mm (barras). Dia 0 corresponde a 24/08/2008

No ano de 2009, epidemias explosivas foram observadas nas áreas 1 e 2 e a doença atingiu 100% das plantas nas duas áreas. Pode-se observar nas Figuras 2.3A e 2.4A, que a doença passou de 5-12% para 73-97% em um intervalo muito curto de tempo (9 a 13 dias) devido à ocorrência de três dias seguidos com chuvas (Figuras 2.3B e 2.4B). Na área 1, chuvas de 5 a 70 mm ocorreram durante o florescimento em dias consecutivos (Figura 2.3B), com aumento do molhamento foliar e UR>90% que atingiram períodos prolongados de mais de 72 horas (Figura 2.3C). Após a ocorrência de 3 dias chuvosos (12º, 13º e 14º) com períodos de molhamento de 13, 24, 24 e 23 horas entre os dias 11 e 14 (Figura 2.3B), a doença apresentou um crescimento abrupto atingindo em torno de 80% de incidência de plantas com flores sintomáticas (Figura 2.3A). Posteriormente, a ocorrência de chuvas nos dias 29, 30, 34 e 35 elevou o molhamento para valores diários acima de 18 horas (Figura 2.3C) e foram suficientes para que a doença atingisse todas as plantas da área (Figura 2.3A). De maneira geral, em 2009 a amplitude térmica diminuiu nos dias de ocorrência de chuvas (Figura 2.3B).

Figura 2.3 – Incidência da podridão floral, florescimento e variáveis climáticas em Santa Cruz do Rio Pardo (área 1) em 2009. (A) Florescimento em proporção de plantas com flor (linhas pontilhadas), incidência da doença em proporção de plantas com flor sintomática (pontos) e curva do modelo logístico ajustada aos dados de incidência da doença (linha contínua); (B) Temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-) e precipitação pluviométrica diária em mm (barras); (C) Molhamento foliar em horas (barras claras) e horas diárias com umidade relativa do ar (UR) acima de 90% (barras escuras). Dia 0 corresponde a 05/08/2009

Na área 2, localizada na mesma fazenda, porém com plantas mais novas, a doença se comportou da mesma maneira (Figura 2.4A). Observa-se que as primeiras chuvas ocorreram nos dias 5, 6 e 7 após início do florescimento (Figura 2.4B), quando aproximadamente 30% das plantas estavam com flores, acarretando numa menor porcentagem de plantas sintomáticas na avaliação do dia 12 (Figura 2.4A). Entretanto,

nos dias 22, 23, 27 e 28 chuvas ocorreram na área (Figura 2.4B) e na avaliação realizada no dia 29 praticamente todas as plantas (98%) já apresentavam sintomas (Figura 2.4A). Como as áreas 1 e 2 estão na mesma fazenda, os dados climáticos são similares, variando-se apenas o início do florescimento e a incidência da doença (Figuras 2.3 e 2.4).

Figura 2.4 – Incidência da podridão floral, florescimento e variáveis climáticas em Santa Cruz do Rio Pardo (área 2) em 2009. (A) Florescimento em proporção de plantas com flor (linhas pontilhadas), incidência da doença em proporção de plantas com flor sintomática (pontos) e curva do modelo logístico ajustada aos dados de incidência da doença (linha contínua); (B) Temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-) e precipitação pluviométrica diária em mm (barras); (C) Molhamento foliar em horas (barras claras) e horas diárias com umidade relativa do ar (UR) acima de 90% (barras escuras). Dia 0 corresponde a 12/08/2009

Em 2009 na área 3, que está localizada no município de Taquarituba, foram observados 12 dias com chuvas variando de 5 a 77 mm durante os 45 dias do florescimento (Figura 2.5B). Estas chuvas foram suficientes para aumentar o período de molhamento na maioria desses dias e, em alguns casos, foram observados 2 a 3 dias seguidos com 24 horas de molhamento (Figura 2.5C). Este foi o primeiro ano de florescimento destas plantas nesta área que foram transplantadas em dezembro de 2007. Desta forma, do total de 500 plantas, 437 (87%) floresceram (Figura 2.5A). Como esta área está distante (aproximadamente 5 km) de outras áreas de citros com histórico da PFC e este foi o primeiro florescimento, mesmo com a ocorrência de quatro dias chuvosos na primeira metade do florescimento (11°, 12°, 13° e 16° dia após início do florescimento) e, posteriormente, mais cinco dias na segunda metade (27°, 28°, 30°, 32° e 33°) (Figura 2.5B), apenas uma planta apresentou sintomas nas avaliações entre o 19° e 35° dia. No 38° dia o número de plantas sintomáticas aumentou para 21 plantas (4,2%) e dois dias após para 35 plantas (7%) quando praticamente todas as plantas já apresentavam flores no estágio de queda de pétalas, chegando ao final do florescimento (Figura 2.5A). Neste município, assim como em Santa Cruz do Rio Pardo onde estão localizadas as áreas 1 e 2, a amplitude térmica foi reduzida nos dias chuvosos (Figura 2.5B).

Figura 2.5 – Incidência da podridão floral, florescimento e variáveis climáticas em Taquarituba (área 3) em 2009. (A) Florescimento em proporção de plantas com flor (linhas pontilhadas) e incidência da doença em proporção de plantas com flor sintomática (pontos); (B) Temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-) e precipitação pluviométrica diária em mm (barras); (C) Molhamento foliar em horas (barras claras) e horas diárias com umidade relativa do ar (UR) acima de 90% (barras escuras). Dia 0 corresponde a 07/08/2009

No ano de 2010, o florescimento na área 1 foi atrasado devido ao longo período de déficit hídrico ocorrido entre julho e setembro. Desta forma, as plantas floresceram nos meses de outubro e novembro, período em que foram observados seis dias chuvosos durante os 35 dias de florescimento (Figura 2.6B). O período de florescimento foi mais rápido, mas a incidência da doença atingiu 47,2% das plantas (Figura 2.6A). As

primeiras plantas sintomáticas foram observadas no 14º dia após início do florescimento, após a ocorrência de uma chuva isolada no 7º dia quando aproximadamente 50% das plantas apresentavam flores. Na avaliação do dia 26 a porcentagem de plantas com sintomas atingiu 40%, chuvas foram observadas anteriormente nos 17º e 22º dias. Ao final do florescimento (35º dia) a doença atingiu 47% das plantas (Figura 2.6A), após a ocorrência de dois dias chuvosos isolados nos 29º e 32º dias (Figura 2.6B). O florescimento ocorreu em outubro/novembro, ao contrário dos outros anos, que foi em agosto/setembro. A ocorrência de chuvas em 2010 não estava associada à redução na amplitude térmica conforme ocorreu em alguns casos nos anos anteriores. Em dias chuvosos a temperatura máxima variou entre 29 e 35°C e a mínima entre 14 e 18°C (Figura 2.6B).

Figura 2.6 – Incidência da podridão floral, florescimento e variáveis climáticas em Santa Cruz do Rio Pardo (área 1) em 2010. (A) Florescimento em proporção de plantas com flor (linhas pontilhadas), incidência da doença em proporção de plantas com flor sintomática (pontos) e curva do modelo logístico ajustada aos dados de incidência da doença (linha contínua); (B) Temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-) e precipitação pluviométrica diária em mm (barras). Dia 0 corresponde a 08/10/2010

Em 2010 na área 2, observa-se que o florescimento ocorreu normalmente por um período de aproximadamente 50 dias (Figura 2.7A). Não foi observada nenhuma planta sintomática, pois apenas no 34º dia ocorreu uma chuva de menos de 10 mm, quando o florescimento já estava praticamente no final (40% de plantas com flores) (Figura 2.7A). O período de molhamento foliar e o número de horas com umidade relativa do ar acima de 90% no dia da chuva foram de 14 e 13 horas, respectivamente. Nos demais dias durante o florescimento este molhamento e a UR>90% permaneceram abaixo de 12 horas (Figura 2.7C). Vale ressaltar que as chuvas e a ocorrência de períodos de molhamento foliar prolongados ocorreram somente 51 dias após início do florescimento, quando já havia ocorrido a queda das pétalas de todas as plantas (Figuras 2.7A e 2.7C). Assim como nos anos anteriores, as chuvas que ocorreram nos meses de agosto/setembro durante o florescimento estiveram associadas a menores diferenças entre as temperaturas máximas e mínimas observadas, que tendem a se aproximar de 20°C. Nota-se que o florescimento ocorreu durante um período seco, evidenciado pela ocorrência de umidades relativas mínimas abaixo de 20% em vários dias (Figura 2.7B).

Figura 2.7 – Florescimento e variáveis climáticas em Santa Cruz do Rio Pardo, na área 2 em 2010. (A) Florescimento em proporção de plantas com flor (linhas pontilhadas) e precipitação pluviométrica em mm (barras); (B) Temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-) e umidade relativa do ar (UR) mínima diária em porcentagem (barras); (C) Molhamento foliar em horas (barras claras) e horas diárias com UR acima de 90% (barras escuras). Dia 1 corresponde a 05/08/2010

Na área 3, o florescimento também ocorreu em um período de clima mais seco, assim como na área 2, com valores de umidade relativa mínima em torno de 20% em vários dias (Figura 2.8B). O período de florescimento foi de aproximadamente 50 dias com apenas um dia de chuva no 36° dia (Figura 2.8A), mas foram observadas flores sintomáticas em 7 plantas (1,4%) durante este período. Nos dias em que ocorreram as chuvas durante ou após o florescimento, a amplitude térmica foi reduzida (Figura 2.8B), assim como nos anos anteriores neste período de agosto/setembro. Nota-se que o

período de molhamento diário e o número de horas diárias com UR > 90% foi superior a 12 horas apenas no primeiro dia do florescimento, onde praticamente todas as plantas estavam com botões florais fechados e no 36º dia após a ocorrência de uma chuva de 10 mm. Após o término do florescimento, no 54º, 55º e 56º dia, também foram observados períodos de molhamento prolongados (Figura 2.8C). O número de horas com UR>90% e de molhamento foram similares somente quando os valores eram superiores a 12 horas, pois em valores inferiores essas duas variáveis apresentam valores mais discrepantes (Figura 2.8C).

Figura 2.8 – Incidência da podridão floral, florescimento e variáveis climáticas em Taquarituba na área 3 em 2010. (A) Florescimento em proporção de plantas com flor (linhas pontilhadas), incidência da doença em proporção de plantas com flor sintomática (pontos) e precipitação pluviométrica em mm (barras); (B) Temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-) e umidade relativa do ar (UR) mínima diária em porcentagem (barras); (C) Molhamento foliar em horas (barras claras) e horas diárias com UR acima de 90% (barras escuras). Dia 1 corresponde a 03/08/2010

O modelo logístico foi o que melhor se ajustou aos dados da doença para as três áreas nos anos em que ocorreram epidemias (Tabela 2.1). No ano de 2008, na área 1, o modelo logístico foi ajustado com um $R^2 = 0,99$ (Tabela 2.1) e resíduos melhor distribuídos (dados não mostrados). Em 2009, epidemias explosivas ocorreram nas áreas 1 e 2 e o modelo logístico apresentou $R^2 = 0,99$ e $R^2 = 0,98$, com altas taxas diárias de progresso da doença ($r = 0,34$ e $r = 0,54$), respectivamente (Tabela 2.1). Na área 3, como o florescimento já estava na fase de queda de pétalas quando a incidência da doença começou a aumentar, o máximo observado foi de 7% de plantas sintomáticas (Figura 2.5A), não sendo possível ajustar nenhum modelo à epidemia devido à baixa incidência final de plantas sintomáticas e ao baixo número de pontos da curva. Em 2010, na área 1, o modelo logístico também foi o que apresentou o melhor ajuste aos dados desta epidemia com inóculo inicial (y_0) menor que 0,001 e taxa diária de progresso (r) de 0,55 (Tabela 2.1). Na área 2 a doença não ocorreu em 2010 e na área 3 a doença atingiu 1,2% de plantas sintomáticas e, desta forma, não foi possível ajustar nenhum modelo aos dados. Para a maioria das epidemias o modelo de Gompertz também apresentou bons ajustes aos dados, mas ajustes estes inferiores aos encontrados para o modelo logístico (Tabela 2.1).

Para as quatro epidemias os modelos monomolecular e exponencial não apresentaram bons ajustes, exceto para a epidemia na área 1 em 2008 onde o exponencial apresentou bom ajuste (dados não mostrados).

Tabela 2.1 - Parâmetros estimados através dos modelos Logístico e de Gompertz para os dados de incidência da podridão floral dos citros nas áreas experimentais 1 e 2 em três anos onde houve epidemia da doença

Ano - Área	Modelos	Parâmetros						
		R ²	y _{max}	Erro y _{max}	y ₀	Erro y ₀	r	erro r
2008 - área 1	Logístico	0,98	0,3	0,001	<0,001	<0,001	0,22	0,002
	Gompertz	0,97	0,58	-	<0,001	-	0,06	-
2009 - área 1	Logístico	0,99	0,97	0,046	0,001	0,002	0,34	0,086
	Gompertz	0,98	1,03	-	<0,001	-	0,17	-
2009 - área 2	Logístico	0,98	0,98	<0,001	<0,001	<0,001	0,54	0,002
	Gompertz	0,98	1,00	-	<0,001	-	0,26	-
2010 - área 1	Logístico	0,99	0,48	0,001	<0,001	0	0,55	0,012
	Gompertz	0,95	0,48	-	0	-	0,23	-

^aOs modelos Logístico e de Gompertz foram ajustados aos dados de progresso da doença em flores usando $y = y_{\max} / (1 + ((y_{\max} - y_0) / y_0) \cdot \exp(-r \cdot x))$ e $y = y_{\max} \cdot (\exp(-(-\log(y_0 / y_{\max})) \cdot \exp(-r \cdot x)))$, respectivamente, onde y é a doença em proporção, x refere-se ao tempo em dias, $y_{\max}$ é a assíntota, y_0 é o inóculo inicial e r é a taxa diária de progresso. R² refere-se ao o coeficiente de determinação e o 'Erro' representa o erro padrão da estimativa dos parâmetros.

2.2.3.2 Caracterização da dinâmica espacial das epidemias

Para as análises espaciais foram gerados mapas de distribuição da doença para as três áreas, sendo que em cada área foram selecionadas quatro avaliações de incidência de sintomas em flores e após o período de queda fisiológica dos frutos foi gerado um mapa de incidência de cálices persistentes para cada ano nas três áreas (Figuras 2.9, 2.10, 2.11).

Figura 2.9 - Distribuição espacial de plantas na área 1 no município de Santa Cruz do Rio Pardo em 2008, 2009 e 2010. Quadrados pretos indicam plantas sintomáticas (flores sintomáticas ou cálices persistentes) e quadrados brancos indicam plantas assintomáticas. A extremidade superior corresponde à linha 1 e a inferior à linha 20, com a planta 1 à esquerda e planta 25 à direita

Figura 2.10 - Distribuição espacial de plantas na área 2 no município de Santa Cruz do Rio Pardo em 2008, 2009 e 2010. Quadrados pretos indicam plantas sintomáticas (flores sintomáticas ou cálices persistentes) e quadrados brancos indicam plantas assintomáticas. A extremidade superior corresponde à linha 1 e a inferior à linha 20, com a planta 1 à esquerda e planta 25 à direita

Figura 2.11 - Distribuição espacial de plantas na área 3 no município de Taquarituba em 2008, 2009 e 2010. Quadrados pretos indicam plantas sintomáticas (flores sintomáticas ou cálices persistentes) e quadrados brancos indicam plantas assintomáticas. A extremidade superior corresponde à linha 1 e a inferior à linha 20, com a planta 1 à esquerda e planta 25 à direita

- **Índice de dispersão (D)**

Foi observada agregação de plantas em incidências superiores a 12,6% (Tabela 2.2). Para a área 1 com os dados de incidência de flores sintomáticas de 2008, os valores do índice de dispersão (D) foram significativamente ($p < 0,05$) iguais a 1,0 nas três primeiras avaliações, o que caracteriza um padrão aleatório (ao acaso) de distribuição espacial da doença no campo. Já na última avaliação, quando a incidência foi superior a 25%, o valor do D foi de 1,32, caracterizando padrão de distribuição agregado da doença. Em 2009 os resultados foram semelhantes com $D = 1,0$ nas duas primeiras avaliações com incidência menor que 5,0%, indicando padrão de distribuição ao acaso e $D > 1,0$ nas duas avaliações subsequentes, quando as incidências foram superiores a 70%, indicando padrão agregado. Em 2010, os resultados também foram semelhantes aos anos anteriores com agregação ocorrendo nas duas últimas avaliações quando a incidência de plantas com flores sintomáticas atingiu valores acima de 45%, já nas duas primeiras avaliações a incidência foi muito baixa e o padrão observado foi ao acaso. Para a área 2 em 2009 observou-se valores do D iguais a 1,0 para as duas últimas avaliações onde a incidência da doença já era praticamente 100% e $D > 1,0$ (padrão agregado) na primeira avaliação quando a incidência já era de 12,6%. Na área 3 em 2009 e 2010, os valores de D foram iguais a 1,0 em todas as avaliações, caracterizando um padrão aleatório de distribuição da doença no campo (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Índice de dispersão (variância observada/variância binomial), com *quadrats* de tamanho 3x2 e padrões de distribuição espacial das avaliações de incidência de pétalas sintomáticas nas três áreas durante o florescimento nos anos em que ocorreram epidemias da podridão floral dos citros

Data	Incidência (%)	N° de <i>quadrats</i>	Variância observada	Variância binomial	Índice de dispersão	Padrão ($p=0,05$)
Área 1 - Ano 2008						
09/09/08	0,6	80	0,00069	0,00069	0,99	Ao acaso
18/09/08	4,4	80	0,00668	0,00666	1,00	Ao acaso
26/09/08	15,4	80	0,02375	0,02173	1,09	Ao acaso
03/10/08	25,2	80	0,04077	0,03159	1,29	Agregado
Área 1 - Ano 2009						
05/08/09	3,8	80	0,00701	0,00601	1,16	Ao acaso
18/08/09	5,0	80	0,00872	0,00791	1,10	Ao acaso
27/08/09	72,6	80	0,07426	0,03259	2,27	Agregado
01/09/09	80,4	80	0,05797	0,02603	2,22	Agregado
Área 1 - Ano 2010						
13/10/10	0,2	80	0,00034	0,00034	1,00	Ao acaso
21/10/10	1,0	80	0,00133	0,00137	0,97	Ao acaso
03/11/10	45,0	80	0,05864	0,04125	1,42	Agregado
08/11/10	47,2	80	0,06149	0,04154	1,48	Agregado
Área 2 - Ano 2009						
28/08/09	12,6	80	0,02496	0,01822	1,36	Agregado
09/09/09	97,8	80	0,00280	0,00306	0,91	Ao acaso
15/09/09	98,8	80	0,00133	0,00137	0,97	Ao acaso
Área 3 - Ano 2009						
26/08/09	0,2	80	0,00034	0,00034	1,00	Ao acaso
14/09/09	4,2	80	0,00614	0,00697	0,88	Ao acaso
16/09/09	7,0	80	0,01184	0,01126	1,05	Ao acaso
Área 3 - Ano 2010						
25/08/10	1,4	80	0,00224	0,00239	0,93	Ao acaso

* Valores do índice de dispersão iguais a 1,0 caracteriza padrão de distribuição ao acaso e maiores que 1,0, padrão agregado.

- **Aplicação da Lei de Taylor modificada**

Na regressão entre os logaritmos das variâncias binomiais e das variâncias observadas o valor da interseção da reta (A) não diferiu significativamente ($p < 0,05$) de zero para as avaliações de 2008 da área 1 e foi maior que zero nas avaliações de 2009, mas o coeficiente angular da reta (b) não diferiu de 1,0, nos dois anos nesta área. Para as áreas 2 e 3 em 2009, o valor da interseção da reta (A) não diferiu de zero e o coeficiente angular da reta (b) não diferiu de 1,0, representando também um padrão de distribuição aleatório da doença. Para a área 1 em 2010, os valores da interseção da reta e do coeficiente angular foram diferentes de 0 e 1, respectivamente, caracterizando um padrão agregado da doença (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Valores dos parâmetros Log (A) e b da equação de regressão linear de ajuste a lei de Taylor modificada com *quadrats* de tamanho 3x2 (plantas na linha x linhas de plantio) das três áreas nos anos em que ocorreram epidemias da podridão floral

Área 1 - 2008		Área 1 - 2009		Área 1 - 2010		Área 2 - 2009		Área 3 - 2009	
Log (A) ¹	b	A	b	A	b	A	b	A	b
0,15	1,05	0,55*	1,18	0,28*	1,09*	0,38	1,15	0,03	0,99

¹Valores com (*) indicam “ A ” estatisticamente superior a 0 e “ b ” superior a 1 ($p < 0,05$).

Na Figura 2.12 estão mostradas as relações entre $\log(V_{\text{obs}})$ e $\log(V_{\text{bin}})$ de cada área e ano e a relação dos dados agrupados de todas as análises realizadas. Para os dados agrupados, o valor do parâmetro “Log (A)” foi significativamente maior que 0 (zero) e o valor do parâmetro “ b ” foi maior que 1,0 (Figura 2.12F).

Figura 2.12 - Relação entre o logaritmo da variância binomial e o logaritmo da variância observada nas avaliações de incidência de plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*) com sintomas de podridão floral para o tamanho de *quadrat* 3 x 2 na área 1 em 2008 (A), 2009 (B) e 2010 (C), área 2 em 2009 (D) todas em Santa Cruz do Rio Pardo/SP e área 3 em 2009 (E) em Taquarituba/SP. Os dados de todas as áreas foram agrupados (F). Na equação $y [\log (V_{obs})] = \log (A) + b \cdot x [\log (V_{bin})]$

2.2.3.3 Relação de dependência de plantas sintomáticas entre os anos

Na área 2, apenas 8 das 26 plantas sintomáticas, na última avaliação, realizada em 2008, apresentaram sintomas na primeira avaliação de 2009. Desta forma, 55 das 63 plantas que apresentaram sintomas na primeira avaliação em 2009, não mostraram flores sintomáticas e/ou cálices persistentes no ano anterior (Tabela 2.4). Por outro lado, 18 plantas que apresentaram sintomas em flores e/ou cálices persistentes em 2008 não foram as primeiras a apresentarem sintomas no ano seguinte. Sendo assim, as primeiras plantas sintomáticas no ano são significativamente diferentes daquelas que apresentaram sintomas no ano anterior ($p=0,05$).

Tabela 2.4 - Número de plantas sintomáticas e assintomáticas na última avaliação de 2008 e primeira de 2009 na área 2 no município de Santa Cruz do Rio Pardo

Última avaliação/2008	Primeira avaliação/2009		Total
	sintomática	assintomática	
sintomática	8	18	26
assintomática	55	419	474
Total	63	437	500

*Análise pelo teste Qui-quadrado com $gl=1$, onde X^2 calculado foi maior que o X^2 tabelado ($p=0,05$) indicando não haver relação entre as primeiras plantas sintomáticas em 2009 com as sintomáticas em 2008.

Para a área 3, observou-se o mesmo padrão descrito anteriormente. Em 2010 apenas uma das 7 plantas que apresentaram sintomas estava sintomática no ano anterior (2009) que apresentou um total de 89 plantas com sintomas. Como o número de plantas sintomáticas em 2010 foi baixo (1 em 500), o teste qui-quadrado não foi utilizado, pois não é recomendado para este caso (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 - Número de plantas sintomáticas e assintomáticas em 2009 e em 2010 na área 3 no município de Santa Cruz do Rio Pardo

Ano (2008)	Ano (2009)		Total
	sintomática	assintomática	
sintomática	1	87	88
assintomática	6	406	412
Total	7	493	500

2.2.3.4 Correlação entre flores sintomáticas e cálices persistentes

Do total de 40 ramos com flor sintomática, 17 apresentaram o mesmo número de flores com sintomas e de cálices persistentes, 11 ramos apresentaram mais flores sintomáticas que cálices persistentes e 12 ramos apresentaram mais cálices persistentes que flores sintomáticas, demonstrando não haver correlação entre sintomas em pétalas e retenção do cálice na mesma flor ($R^2=0,08$ e $p>0,07$). Deste modo, não há necessidade de formação de sintomas em pétalas para que o cálice seja retido e em alguns casos, mesmo havendo expressão de sintomas na flor não necessariamente haverá formação do cálice persistente no ramo.

2.2.3.5 Avaliação da porcentagem de flores sintomáticas por planta

Na área 2 a porcentagem de flores sintomáticas por planta foi variável entre as diferentes plantas avaliadas com mínimo em torno de 15% e máximo atingindo 75% na avaliação do dia 11/09 em que praticamente todas as plantas apresentaram flores sintomáticas (Figura 2.13).

Figura 2.13 - Porcentagem de flores sintomáticas em 20 plantas na área 2 em 10/09/2009. A posição da planta é referente à localização na área (20 linhas com 25 plantas), sendo as plantas 1 e 25 (a primeira e última da linha 1) e 476 e 500 (a primeira e última da linha 20)

Em 2010 na área 1, na última avaliação em 08/10 quando 47% das plantas apresentavam sintomas, foi observado que a porcentagem de flores sintomáticas nessas plantas variou de 1 a 90%, com a maioria (37%) das plantas na faixa de 1 a 10% de flores sintomáticas (Figura 2.14). Foi realizada análise de correlação entre a porcentagem de flores sintomáticas e o número de cálices persistentes por planta nesta área e os valores do coeficiente de correlação foram muito baixos ($r = 0,33$).

Figura 2.14 - Flor sintomática por planta, em porcentagem, na última avaliação de 2010 (08/11/2010) na área 1 (20 linhas de plantio e 25 plantas por linha). A porcentagem foi obtida pela contagem de 100 flores por planta

2.2.4 Discussão

A PFC ocorreu de forma repentina e explosiva no ano de 2009 nas duas áreas onde já havia ocorrido no ano anterior, fato este explicado pelo alto número de dias com chuvas (12 dias) coincidindo com o período onde havia tecidos suscetíveis. A doença apresentou os maiores incrementos de incidência após dois ou três dias consecutivos de chuvas com prolongamento do molhamento foliar. No ano anterior (2008) na área 1 a doença ocorreu, porém não foi explosiva. Este fato pode ser explicado pela ocorrência de apenas quatro chuvas isoladas. Em 2010, a doença atingiu metade das

plantas e também não ocorreram chuvas em dias consecutivos, sendo observados seis dias chuvosos bem distribuídos em um período de florescimento mais curto.

Nas quatro situações em que ocorreram epidemias de PFC, a ocorrência das chuvas associadas a um aumento do período de molhamento foliar proporcionou um incremento da doença e, quanto maior o número de dias com chuvas, maior foi a incidência ao final do florescimento. Denham e Waller (1981), trabalhando com a PFC em Belize, observaram incrementos acentuados da doença em épocas com períodos de molhamento prolongados (em torno de 20 horas) com pelo menos dois dias de chuvas seguidos, independente do volume de chuva. Esses autores notaram que algumas chuvas de até 10 mm com molhamento foliar diário mantido abaixo de 10 horas não promoveu incremento da PFC, similares aos encontrados neste trabalho. O mesmo também foi observado por Agostini, Gottwald e Timmer (1993) na Flórida, onde a presença de tecidos suscetíveis e inóculo juntamente com a ocorrência de períodos de chuva promoveram crescimento da doença. Fitzell e Peak (1984), trabalhando com antracnose em manga causada por *C. gloeosporioides*, relataram que a chuva é necessária para dispersar os conídios e causar uma epidemia e mencionaram ser similar ao encontrado para culturas como citros, café e mirtilo.

Para explicar o caráter explosivo das epidemias de PFC, podem-se considerar duas hipóteses: uma delas parte do pressuposto que o inóculo já estaria presente na área, mas as plantas somente apresentam os sintomas quando as condições são favoráveis para a dispersão do inóculo das folhas para as flores e ocorrência da infecção em cada planta individualmente. Neste caso, os apressórios precisariam germinar, formar os conídios secundários e esses conídios seriam disseminados das folhas para as flores, germinando e infectando as mesmas. Desta forma, uma planta pode estar produzindo o inóculo nas folhas, mas se este inóculo não atingir as flores, não haverá expressão de sintomas na mesma. Outra hipótese seria que o inóculo inicial estaria vindo de outras plantas da área ou de fora da área disperso por insetos conforme mencionado por Peña e Duncan (1989), por implementos transportando pétalas sintomáticas (TIMMER, 1990), por colhedores de frutos (FAGAN 1984a) ou possivelmente pelo vento e, desta maneira, os sintomas seriam causados em plantas

sem reserva própria de inóculo do ano anterior, mas contendo flores em expansão ou abertas (tecidos suscetíveis).

De acordo com Timmer et al. (1994) as epidemias de podridão floral ocorrem repentinamente e se tornam explosivas causando severas perdas. Os resultados apresentados aqui corroboram esta afirmação uma vez que a incidência passou de 5-12% para 73-97% em um intervalo muito curto (9-13 dias). Mas ainda não podemos afirmar se o inóculo inicial já estaria presente e distribuído por toda a área ou se estaria sendo disperso por insetos, principalmente os polinizadores. No ano de 2009, pôde-se observar que a doença apenas ocorreu de forma generalizada a partir do momento em que foi observado um nível de inóculo considerável sendo produzido nas flores das plantas e, posteriormente, passou a ser disperso para as demais flores sadias, contribuindo para o aumento explosivo das epidemias.

Epidemias da PFC apresentaram um melhor ajuste ao modelo logístico. Um bom ajuste também foi observado para o modelo de Gompertz. De acordo com Agostini, Gottwald e Timmer (1993), para as epidemias de podridão floral na Flórida (EUA), melhores ajustes foram encontrados para o modelo de Gompertz, mas bons ajustes também foram encontrados para os modelos logístico e exponencial quando avaliou-se a doença como incidência nas flores abertas. Entretanto, vale ressaltar que nos experimentos conduzidos por estes autores, uma planta foi inoculada com *C. acutatum* e mantida no centro da parcela, diferente dos ensaios conduzidos aqui em que foi utilizado o inóculo natural da área. Outro ponto importante a ser mencionado é que esses autores realizaram os ajustes aos modelos com o emprego da regressão linear aplicada aos dados transformados, ao invés da regressão não-linear, provavelmente devido às limitações de programas estatísticos à época das análises. Desta forma, as assíntotas das curvas foram estimadas em 100%, mas a incidência máxima foi de 30% (em botões florais) e 70% (em plantas). Estes ajustes inadequados podem gerar interpretações equivocadas relacionadas ao comportamento da doença no tempo.

As taxas diárias de progresso da doença variaram bastante nas áreas e anos em que a doença ocorreu no sudoeste paulista, chegando a atingir valores de $r_L = 0,55$, que são similares às maiores taxas ($r = 0,5$) encontradas para as epidemias explosivas de

requeima da batata e da ferrugem do trigo conforme descrito por Vanderplank (1963), causadas por patógenos cuja disseminação principal é realizada através do vento.

Na área 3 as chuvas ocorreram em grande quantidade em 2009 durante a abertura das flores assim como nas áreas 1 e 2, mas a doença atingiu apenas 7% de incidência final (área 3) ao contrário dos 100% observados nas outras áreas (áreas 1 e 2). Desta forma, entende-se que é necessário, além de chuvas sequenciais com aumento do período de molhamento foliar, ter um nível mínimo de inóculo nas plantas para que ocorram as epidemias explosivas. Denham e Waller (1981) observaram um único caso de baixa porcentagem da PFC após a ocorrência de chuva forte e período de molhamento prolongado, sendo justificado pelo fato do florescimento estar no início e de ser baixa a quantidade de inóculo.

A distribuição de plantas com podridão floral mostra padrões de agregação quando a incidência mostrou 12,6% de plantas com flores sintomáticas. Em praticamente todas as áreas durante os três anos, o padrão espacial da doença no início foi aleatório e a partir do momento que a incidência atingiu o nível 12,6% a doença passa a apresentar um padrão agregado. Segundo Bergamin Filho et al. (2002) o padrão espacial está relacionado à dispersão do patógeno, sendo um padrão aleatório associado geralmente a patógenos dispersos à longa distância, como pelo vento, ou seja, a probabilidade de uma planta sadia receber inóculo é igual para todas. Por outro lado, patógenos disseminados a curtas distâncias, como por respingos de chuvas, apresentam padrões agregados, pois as plantas sadias mais próximas das fontes de inóculo têm maior probabilidade de receber inóculo. Estes autores ainda mencionam que a interpretação da dispersão não é tão simples, pois a maioria das doenças pode apresentar mais de um mecanismo de disseminação.

Conforme mencionado por Denham e Waller (1981), a disseminação de *C. acutatum* em citros a curtas distâncias ocorre principalmente através de chuvas com ventos. De acordo com Peña e Duncan (1989), alguns insetos poderiam disseminar este patógeno a longas distâncias, que segundo Timmer (1999) teria baixa contribuição para a ocorrência de epidemias explosivas. A importância de outros agentes de disseminação como abelhas, mudas e o vento ainda é desconhecida, mas como a

doença se inicia de forma aleatória, estas formas de dispersão têm grandes chances de contribuir para dispersão do inóculo primário e permitir o início da epidemia que vai se tornar explosiva após sucessivos dias com chuvas e molhamento prolongado.

Os valores dos parâmetros da lei de Taylor da podridão floral (Tabela 3) foram próximos aos encontrados por Laranjeira (1997) para a clorose variegada dos citros, causada por bactéria e transmitida por vetor (cigarrinha), para tamanhos de *quadrats* de 2 x 2 e 3 x 3, que apresentou leve agregação devido a prováveis vôos curtos do inseto sem necessariamente pousarem em plantas adjacentes. Os valores também são similares aos encontrados por Bergamin Filho et al. (2000) para o cancro cítrico após introdução da larva minadora que alterou o padrão espacial de altamente agregado (sem minadora) para moderadamente agregado (com minadora) ou ao acaso (com minadora e alta densidade de inóculo nas proximidades).

Os valores também se assemelham aos encontrados para a tristeza dos citros, causada por vírus, quando a disseminação é feita pela espécie de pulgão *Aphis gossypii*, apresentando padrão ao acaso, pois este inseto tem hábitos de vôos longos. Por outro lado, quando a disseminação é realizada pela espécie de pulgão *Toxoptera citricida* que tem vôos curtos, os resultados da lei de Taylor mostram valores de A e b superiores aos encontrados para a podridão floral, indicando maior agregação das plantas (GOTTWALD et al., 1997).

Além disso, os valores para a podridão floral são inferiores aos valores de b encontrados por Czermainski (2006) para a leprose dos citros, sendo $b = 1,30$ e $\text{Log}(A) = 1,01$ para o mesmo tamanho de *quadrat*. Esta doença é causada por vírus e transmitida por ácaros e sua expansão ocorre em torno dos focos primários, com padrões altamente agregados (BASSANEZI; LARANJEIRA, 2006). No patossistema *Colletotrichum kahawae* em café também não se conhece a origem do inóculo primário, mas foi verificado que a distribuição deste patógeno é diferente da distribuição de *C. acutatum* em citros, pois ocorre em focos pequenos restritos às plantas mais próximas, apenas através de auto-inoculação e dispersão lateral de conídios, sem direção preferencial, dando a entender que a dispersão seria devido às chuvas, com a

possibilidade de o inóculo sobreviver nos focos das epidemias do ano anterior (BEDIMO et al., 2007).

Baseado nos resultados obtidos para outros patossistemas e nos obtidos aqui para a podridão floral, podemos inferir que há grande possibilidade dos insetos (ex.: abelhas) ou das correntes de vento associadas às chuvas estarem relacionados principalmente com a disseminação primária de *C. acutatum* em pomares de citros.

Na literatura não há trabalhos envolvendo o efeito do vento na disseminação do inóculo da podridão floral. Sabe-se que os conídios secundários são formados nas folhas sem formação de acérvulos com mucilagem, portanto, não dependeriam da água das chuvas para dissolver a mucilagem e disseminá-los. No trabalho de Agostini, Gottwald e Timmer (1993) foi inoculada apenas a planta central de uma área isolada de outras com a doença, mas observaram-se focos secundários na área até 15 m distantes deste foco central, indicando haver uma possível contribuição de insetos ou do vento associado às chuvas na disseminação. Não há relatos da existência de ascósporos no campo, o que poderia explicar uma possível disseminação deste inóculo pelo vento a longas distâncias. A título de exemplo, Fitzel e Peak (1984) mencionam que os ascósporos parecem não ter um papel epidemiológico no ciclo da antracnose da manga causada por *C. gloeosporioides*. Fagan (1984a) não observou presença da forma perfeita do agente causal em pétalas, ramos ou cálices secos, mas encontrou alguns em folhas caídas, provavelmente seriam de *Glomerella cingulata* (forma perfeita de *C. gloeosporioides*) hoje considerado habitante natural e saprófita em folhas, que naquela época era considerado agente causal da PFC e não de *G. acutata* forma perfeita de *C. acutatum* o agente causal da podridão floral.

Os dados obtidos aqui corroboram os relatados por Denham e Waller (1981) que, nas condições de Belize, observaram incrementos da podridão floral com redução na temperatura após as chuvas e períodos de molhamento. Esses autores mencionaram que somente a queda de temperatura sem ocorrência de chuvas não alterou os índices da podridão floral, sendo a temperatura uma variável climática com pouca importância direta sobre a ocorrência de epidemias, mas associada diretamente ao desenvolvimento e duração do período de florescimento.

Segundo Agostini, Gottwald e Timmer (1993) quanto maior for a distribuição das chuvas durante o florescimento, maior será a intensidade da doença, cujo inóculo pode ser disseminado a longas distâncias através de chuvas com ventos. Mas foi observado que nas condições do sudoeste paulista, além da distribuição das chuvas, as epidemias explosivas foram associadas a dois ou mais dias com chuvas sequenciais, promovendo aumento do molhamento foliar, principalmente no período de expansão das pétalas e abertura da maioria das flores. Denham e Waller (1981) observaram a maior porcentagem de lesões em flores no estágio de flor aberta (73,2%) seguidos pelo estágio de queda de frutos (22,2%) e alongação dos botões (9%). Vale ressaltar que estes mesmos autores citam que a média da duração do estágio de alongação dos botões foi de 4,5 dias e de flores abertas foi de 3,2 dias. Portanto, as lesões observadas nas flores abertas podem ser oriundas de infecções ocorridas no estágio anterior de alongação dos botões, uma vez que o período de incubação e latência da doença pode variar de 2 a 5 dias, dependendo das condições climáticas (DENHAM; WALLER, 1981; TIMMER, 1990).

Desta forma, a maior concentração de chuvas em pequeno intervalo de tempo parece ser mais importante que a ocorrência das mesmas distribuídas em intervalos de 7 ou mais dias. Agostini, Haberle e Morón (1995) mencionaram que os maiores incrementos de PFC parecem estar associados a chuvas com volumes superiores a 20 mm. Porto, Rossetti e Dornelles (1979) observaram que a doença foi mais severa em condições de alta umidade por períodos de 2 a 3 dias e precipitação superior a 25 mm. A podridão floral nas condições do sudoeste paulista, a região mais favorável do Estado, apresentou progresso semelhante ao observado tanto em Belize por Denham e Waller (1981) quanto na Flórida (EUA) por Agostini, Gottwald e Timmer (1993), com epidemias sempre associadas a períodos de molhamento prolongados que ocorrem associados a dias chuvosos.

Não houve correlação entre plantas doentes de um determinado ano com as primeiras plantas doentes no início da epidemia no ano seguinte (Tabela 4). Assim, o inóculo pode estar vindo de fora da área a cada ano, sendo disseminado por agentes como vento e insetos alcançando as plantas aleatoriamente ou já está distribuído

uniformemente na área, mas a expressão dos sintomas ocorre somente em plantas onde o microclima é favorável para a infecção e colonização do patógeno nas flores.

Os cálices persistentes não são fontes de inóculo importantes para a PFC, uma vez que o inóculo pode estar presente em folhas e ramos da planta. A poda dos cálices da planta não acarretou redução da doença no campo. Nas áreas onde se realizou a poda dos cálices persistentes antes do florescimento, a doença ocorreu após períodos com chuvas e molhamento foliar e atingiu até 100% das plantas com incidências de flores sintomáticas de até 80%. Vale ressaltar que o efeito da retirada desses cálices persistentes sobre o desenvolvimento de ramos ou formação de flores não foi avaliado e não está em foco nesta discussão. Foi observado em todas as áreas, florescimento e frutificação em ramos contendo cálices do ano anterior, mas não foi mensurada a porcentagem de fixação de frutos em ramos com e sem estes cálices. Futch, Hebb e Sonoda (1989) e Sonoda e Hebb (1991) também não observaram efeito da remoção destes cálices sobre o florescimento e produção das plantas na Flórida e mencionam que a presença de cálices persistentes aglomerados nos ramos é apenas indicativo que a doença tenha sido problema na área.

As avaliações de sintomas em pétalas foram realizadas semanalmente nas áreas 1 e 2, portanto, ao observar uma porcentagem sempre maior de plantas com cálices persistentes em relação a flores sintomáticas, imagina-se que poderia ser devido apenas a não observação dos sintomas entre as avaliações. Vale ressaltar que não foram realizadas avaliações em estádios anteriores e posteriores àqueles com tecidos das pétalas visíveis, pelo fato de não se observar sintomas em tecidos verdes da planta. Outras partes da flor como o gineceu (estigma e estilete) também não foram avaliados. Apesar de ocorrer sintomas nestas partes florais conforme descrito por Lin et. al. (2001), os mesmos podem ser confundidos com necrose fisiológica do estigma/estilete, requerendo em alguns casos, isolamento do patógeno para identificação de possível causa biótica. De acordo com Cintra (2009), as inoculações nos estádios com botões ainda fechados também acarretam queda de frutos e retenção de cálices. Desta forma, em alguns casos pode haver queda das flores e dos frutos sem haver expressão dos sintomas, explicando a observação aqui de até 2 a 4 vezes mais

cálices persistentes em relação a flores sintomáticas. Na área 3, onde as observações foram realizadas a cada 2-4 dias durante o florescimento em 2009, pôde-se perceber que o número de plantas com cálices persistentes foi 2,5 vezes maior que o de flores sintomáticas. Em 23 dos 40 ramos marcados com flores sintomáticas, o número de cálices persistentes foi maior ou menor que o de flores sintomáticas, não havendo uma correlação entre o número de cálices persistentes e flores sintomáticas no mesmo ramo. Vale ressaltar que a formação dos cálices persistentes se dá normalmente pela alteração na produção de hormônios na planta (LAHEY et al., 2004; LI et al., 2003). Essas alterações também poderiam ser influenciadas por outros fatores além da infecção e colonização do fungo.

C. acutatum sobrevive até 28 dias após a inoculação nas folhas de citros em casa-de-vegetação, embora em condições de campo durante o ano a população apresente bastante variação, podendo inclusive deixar de ser detectada (AGOSTINI; TIMMER, 1994). Essa sobrevivência nas folhas poderia estar associada a infecções quiescentes conforme descrito por esses autores. Denham e Waller (1981) acreditam ter pouca chance de sucesso as tentativas de erradicar o inóculo nas folhas com uso de fungicidas antes do florescimento baseado na epidemiologia da doença e em trabalhos com patossistemas similares como *Colletotrichum* em café. Para esses autores, o foco seria a proteção com fungicidas durante toda a florada principal. Estas evidências somadas aos padrões aleatórios de distribuição da doença observados no início das epidemias reforçam esta hipótese de baixa eficiência de controle antes do florescimento, uma vez que o inóculo poderia ser disperso durante o florescimento por outras vias além de chuvas com ventos e ser depositado sobre as flores recém-abertas e desprotegidas.

2.3 Conclusões

O padrão espacial das plantas com podridão floral no campo foi predominantemente ao acaso no início das epidemias, sugerindo participação de outros agentes na dispersão do patógeno além das chuvas com ventos que parece ter importante contribuição na agregação da doença em incidências maiores.

O progresso temporal da podridão floral é bem descrito pelo modelo logístico. Epidemias explosivas de podridão floral estão associadas à ocorrência de chuvas e períodos prolongados de molhamento durante o florescimento.

Os cálices persistentes não são fontes de inóculo importantes para a ocorrência das epidemias de podridão floral e não estão correlacionados com os sintomas em pétalas.

Referências

- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 420-425, 1994.
- AGOSTINI, J.P., GOTTWALD, T.R., TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 485-490, 1993.
- AGOSTINI, J.P.; HABERLE, T.J.; MORÓN, P.P. El *Colletotrichum* Y La caída prematura de frutas em La citricultura Del Alto Parana, Misiones, Argentina. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 97-106, 1995.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 11, p. 1377-1382, 1992.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: Biology, Pathology, and Control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388p.
- BARBOSA, A.C.; SCHADECK, R.J.G.; DO CARMO, A.E.; GRAF, L.V.; TOMÁZ, R.; DE SOUZA, C.F.; MENDES, J.; RANDI, M.A.F.; BUCHI, I.D. Morphology, lipid body and vacuole dynamics during secondary conidia formation in *Colletotrichum acutatum*: laser scanning confocal analysis. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 117-124, 2006.
- BASSANEZI, R.B.; LARANJEIRA, F.F. Spatial patterns of leprosis and its mite vector in comercial citrus groves in Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 56, n. 1, p. 97-106, 2006.
- BEDIMO, J. A. M.; BIEYSSE, D.; CILAS, C.; NOTTÉGHEN, J. L. Spatio-temporal dynamics of arabica coffee berry disease caused by *Colletotrichum kahawae* on a plot scale. **Plant Disease**, v. 91, p. 1229-1236, 2007.

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de progresso da doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H., AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 602-626.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Ceres, 1996. 289 p.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F.F.; GOTTWALD, T.R. Epidemiology of citrus canker in Brazil with and without the asian citrus leafminer. In: INTERNATIONAL CITRUS CANCER RESEARCH WORKSHOP, 1., 2000, Fort Pierce. **Proceedings...** Fort Pierce: International Citrus Canker Research Workshop, 2000. p. 6.

BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F.F. Análise Espacial de Epidemias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 10, p. 155-218, 2002.

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

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

CINTRA, G.S. **Podridão floral dos citros: variabilidade, sobrevivência e controle do agente causal, *Colletotrichum acutatum***. 2009. 103 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

CZERMAINSKI, A.B.C. **Dinâmica temporal e especial de populações do patossistema leprose dos citros em condições naturais de epidemia**. 2006. 90 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

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

EASTBURN, D.M.; GUBLER, W.D. Strawberry anthracnose: Detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, p.161-163, 1990.

_____. Effects of soil moisture and temperature on the survival of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, p. 841-842, 1992.

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

_____. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: I. Disease epidemiology. **Turrialba**, Turrialba, v. 34, p. 173-177, 1984a.

_____. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial/ground spraying. **Turrialba**, Turrialba, v. 34, p. 179-186, 1984b.

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

_____. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 109-28, 1994.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B. Fungicide treatments for control of Postbloom fruit drop of citrus (*Colletotrichum acutatum*) in 'Pera' sweet orange trees. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society of Citriculture, 2000. p.145.

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

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

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

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

GIBSON, G.V.; AUSTIN, E.J. Fitting and testing spatiotemporal stochastic models with application in plant epidemiology. **Plant Pathology**, Oxford, v.45, p.172-184, 1996.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e de *C. gloeosporioides*, obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 10- 14, 1997.

GOES, A.; MORETTO, K.C.K.; DE WIT, C.P. Effect of ferbam alone or in combination with benomyl for the control of citrus postbloom fruit drop. In: INTERNATIONAL SOCIETY CITRICULTURE, 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Proceedings of International Society of Citriculture, 2000. p. 1003-1005.

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

GOTTWALD, T. R.; GIBSON, G.J.; GARNSEY, S.M.; IREY, M. Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of citrus tristeza virus spread by stochastic modeling. **Phytopathology**, Saint Paul, v.89, n. 7, p.603-608, 1999.

GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; IREY, M.; BORBO, N, J. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. **Fruits**, Paris, v. 52, p. 397–404, 1997.

HUGHES, G.; GOTTWALD, T.R. Survey methods for assessment of citrus tristeza virus incidence when *Toxoptera citricida* is the predominant vector. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 7, p. 487-494, 1999.

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

KRAINSKI, E.T.; RIBEIRO JÚNIOR, P.J.; BASSANEZI, R.B.; FRANCISCON, L. Autologistic model with an application to the citrus sudden death disease. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, p. 541-547, 2008.

KRANZ, J. **Epidemics of plant diseases**: mathematical analysis and modeling. Berlin: Springer, 1974. 170 p.

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

LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros**. 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

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

_____. Strawberry plant extracts stimulate secondary conidiation by *Colletotrichum acutatum* on symptomless leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 10, p. 1285-1291, 2003b.

LI, W.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K.R. Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, p. 578-583, 2003.

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

MADDEN, L.V.; HUGHES, G. Plant disease incidence: distribution, heterogeneity and temporal analysis. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 33, p.529-564, 1995.

MADDEN L.V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. Saint Paul: APS Press, 2007. 421 p.

MADDEN, L.V.; LOUIE, R.; ABT, J.J.; KNOKE, J.K. Evaluation of tests for randomness of infected plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 195-198, 1982.

McMILLAN, R.T.; TIMMER, L.W. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 81, 1989.

NELSON, S.C. A simple analysis of disease foci. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p.332-339. 1996.

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

NUTTER Jr., F.W. Quantifying the temporal dynamics of virus epidemics: a review. **Crop Protection**, Oxford, v.16, p. 603-618, 1997.

OROZCO SANTOS, M.; GONZÁLEZ GARZA, R. Caída de fruto pequeño y su control en naranja 'Valencia' en Veracruz. **Agricultura Técnica en México**, México, v. 12, n. 2, p. 259-269, 1986.

PEÑA, J.E.; DUNCAN, R. Role of arthropods in the transmission of post bloom fruit drop. In: Florida State Horticultural Society, 1989, Tampa. **Proceedings...** Tampa: Florida State Horticultural Society. 1989. p. 249-251.

PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop in Brazil and Florida: occurrence and control by fungicides. In: INTERNATIONAL SOCIETY CITRICULTURE, 9., 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society Citriculture, 2000. p. 1051-1052.

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

PORTO, O. M. Comparação de programas para controle químico da queda anormal de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. p. 481-487.

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

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

ROSSETTI, V.; CARVALHO, M.L.V.; VECHIATO, M.H.; BATISTA, F.A.S. Estudos sobre a queda prematura de frutos cítricos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. p. 641-654.

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

SONODA, R.M.; HEBB, J.W. Postbloom fruit drop in the Indian River citrus growing area: history and present status. **Citrus Industry**, Bartow, v. 72, p. 12-81, 1991.

SOUZA FILHO, B.F.; BATISTA, F.A.S.; EMIDIO FILHO, J.; TRINDADE, J. Controle químico da mancha aureolada e da queda dos frutos jovens em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p. 216-220.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology, and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 523-537.

TIMMER, L.W. Status of postbloom fruit drop in Florida Citrus. **The Citrus Industry**, Bartow, v. 71, n. 2, p. 30-33, 1990.

_____. Diseases of fruit and foliage. In: TIMMER, L.W.; DUNCAN, L.W. **Citrus health management**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1999, p.107-115.

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. **Colletotrichum**: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 300-316

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

UPTON, G.J.G.; FINGLETON, B. **Spatial data analysis by example**: point pattern and quantitative data. New York: John Wiley, 1985. 410p.

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

XU, X.M.; RIDOUT, M.S. Effects of quadrat size and shape, initial epidemic conditions, and spore dispersal gradient on spatial statistics of plant disease epidemics. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p.738-750, 2000.

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

3 SENSIBILIDADE DE *Colletotrichum acutatum* A FUNGICIDAS E CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS

Resumo

A principal medida de controle da podridão floral dos citros (PFC) é a utilização de pulverizações com fungicidas. Os principais produtos utilizados no Brasil são difenoconazole e carbendazim. Entretanto, os resultados obtidos em campo com esses fungicidas são bastante variáveis. O estudo da sensibilidade de *C. acutatum* a estes fungicidas deve ser realizado para verificar se as causas da ineficiência no controle da doença estão associadas com resistência. Um sistema de previsão para o controle da PFC (PFD-FAD) foi proposto para as condições do Estado de São Paulo, mas o mesmo ainda não é aceito pelos citricultores. Objetivou-se com este estudo: i) avaliar a sensibilidade de isolados de *C. acutatum* do Estado de São Paulo aos fungicidas carbendazim e difenoconazole; ii) verificar o efeito destes fungicidas em diferentes intervalos de aplicação no campo; iii) comparar o efeito dos mesmos com misturas formuladas em casa-de-vegetação e no campo; iv) avaliar o efeito de pulverizações baseadas em informações climáticas e estágio de desenvolvimento das flores em comparação ao uso de calendário fixo e do sistema PFD-FAD no controle da PFC e; v) estabelecer uma função de dano para a PFC. Em laboratório, nenhum dos 255 isolados de *C. acutatum* coletados em 2008 em seis diferentes municípios do Estado de São Paulo apresentou resistência aos fungicidas carbendazim e difenoconazole. Em casa-de-vegetação, o efeito do carbendazim foi comparado ao efeito da mistura trifloxistrobina + tebuconazole e ambos reduziram o número de flores sintomáticas quando aplicados em pré-inoculação ou 24 horas em pós-inoculação, mas 48 horas após a inoculação, apenas a mistura foi eficiente. No campo, a utilização da primeira aplicação de difenoconazole e duas seguintes de carbendazim ou vice-versa, em diferentes intervalos, não foi suficiente para reduzir danos causados pela PFC sobre a produção. Por outro lado, quatro aplicações de carbendazim, difenoconazole, ciprodinil + fludioxonil ou três aplicações de trifloxistrobina + tebuconazole foram necessárias para controlar a PFC e reduzir os danos na produção, uma vez que as chuvas ocorreram entre a terceira e quarta pulverização. Dentre os produtos testados, a mistura trifloxistrobina + tebuconazole foi a mais eficiente, sendo recomendada para o controle da PFC. Esquemas de pulverização baseados apenas em condições climáticas e estágio de desenvolvimento das flores foram comparados ao sistema calendário da fazenda e ao sistema PFD-FAD em quatro experimentos em 2010 e a incidência da PFC foi inferior a 5%, pois o florescimento coincidiu com condições desfavoráveis para a doença. Em dois esquemas propostos foi realizada uma pulverização e no sistema calendário da fazenda foram realizadas três pulverizações, que por sua vez, foram desnecessárias. Uma função de dano foi estabelecida para a PFC com os dados de cinco experimentos conduzidos em laranja 'Pera', onde correlação negativa significativa com R^2 de 0,43 foi obtida para as variáveis flores sintomáticas (x) e produção relativa (y), através do modelo exponencial negativo [$y = 97,459 \cdot \exp((-0,011) \cdot x)$].

Palavras-chave: Resistência a fungicidas; Mistura fungicida; Função de dano; Programas de pulverização

Abstract

The postbloom fruit drop (PFD) is mainly controlled by fungicide sprays. In Brazil the most commonly used fungicides are difenoconazol and carbendazim, but field results are highly variable. A baseline sensitivity test should be performed to verify if this inefficacy is associated with fungal resistance to these fungicides. A forecasting system for PFD control (PFD-FAD) was proposed for São Paulo State conditions, but it has not been accepted by the citrus farmers. The aims of this study were to: i) determine the baseline sensitivity of *C. acutatum* isolates from São Paulo State to carbendazim and difenoconazol, ii) evaluate the efficiency of these fungicides at different application intervals in the field, iii) compare the effectiveness of these fungicides with that of mixtures formulated in greenhouse and in the field, iv) evaluate the effect of fungicide application based on weather conditions and flowers stage compared to the fixed calendar spraying schedule and the PFD-FAD system to PFD control and, v) establish a damage function to PFD. None of the 255 isolates of *C. acutatum* collected during 2008 from six São Paulo State municipalities showed resistance to carbendazim or difenoconazol *in vitro*. In the greenhouse, the efficacy of carbendazim was compared with that of the mixture of trifloxystrobin + tebuconazol. Both treatments reduced the incidence of symptomatic flowers when applied prior inoculation or 24 h after inoculation. However, only the mixture was effective when applied 48 h after inoculation. In the field, the first application of difenoconazol and carbendazim in the following two, or vice versa, at different intervals was not sufficient to reduce the damage caused by PFD in the yield. Moreover, four applications of carbendazim, difenoconazol e ciprodinil + fludioxonil or three applications of trifloxystrobin + tebuconazol were needed to PFD control and damage reduction in the yield, since the rains occurred between the third and fourth spraying. Among the tested fungicides, the trifloxystrobin + tebuconazol mixture was the most efficient and recommended for the PFD control. The fungicide application schedule based only on weather conditions and flowers stage was compared to the forecasting system (PFD-FAD) and to the farm spraying schedule in four experiments and the PFD incidence was less than 5%, because the flowering period coincided with unfavorable weather conditions to PFD occurrence. In two proposed treatments, one spraying was performed and three other ones in the farm schedule what were, in fact, unnecessary. The damage function was estimated for the PFD with the data of five experiments carried out in Pera sweet orange and significant correlation with R^2 of 0.43 was obtained for the variables symptomatic flowers (x) and relative yield (y) with the negative exponential model [$y = 97.459 \cdot \exp((-0.011) \cdot x)$].

Keywords: Fungicide resistance; Fungicide mixture; Damage function; Schedule of spraying

3.1 Introdução

A podridão floral dos citros (PFC) é causada por *Colletotrichum acutatum* sendo comum nas áreas úmidas das Américas. Os sintomas da doença são expressos nas pétalas e no pistilo. Após infecção das flores, ocorre abscisão dos frutos e formação dos cálices persistentes que permanecem nas plantas por vários meses (TIMMER et al., 1994). Em São Paulo, a doença se expressa em maior intensidade e com maior frequência nas regiões localizadas no sudoeste do Estado, sendo observada em todas as variedades comerciais de citros (FEICHTENBERGER, 1994).

O controle da PFC é basicamente realizado através de pulverizações preventivas com fungicidas durante o período de florescimento (FEICHTENBERGER, 1994; TIMMER, 2000). Benomil e captafol eram os principais fungicidas utilizados no controle da doença até a proibição dos mesmos (PORTO, 1993). No Brasil, alguns trabalhos foram realizados com benzimidazóis, triazóis, folpet e mancozeb e estes se tornaram os principais produtos utilizados para o controle da PFC após a proibição do benomil e captafol (FEICHTENBERGER; SPÓSITO, 2000; GOES et al., 2008; PERES, 2002), com destaque para benzimidazóis e triazóis.

Os fungicidas de ação sistêmica atuam em sítios de ação específicos aumentando a probabilidade de seleção de isolados resistentes aos mesmos (DE WAARD et al., 1993). O monitoramento da resistência é importante para verificar se ela é realmente a causa da ineficiência no controle. Dentre as estratégias de manejo de resistência estão o uso de misturas, rotação de grupos químicos, restrição do número de aplicações por safra, utilização da dose recomendada e adoção de manejo integrado (BRENT, 1995).

Os fungicidas benzimidazóis agem sobre a divisão celular e apresentam atividade seletiva para a β -tubulina de fungos (KENDALL et al., 1994). O uso intensivo dos benzimidazóis pode resultar na seleção de isolados resistentes em um curto período de tempo, conforme ocorreu na década de 70 alguns anos após introdução destes no mercado. Quando a resistência aos benzimidazóis já está estabelecida, ela acaba se tornando persistente e a aplicação desses produtos sobre populações resistentes normalmente agrava o problema (BRENT, 1995). Os fungicidas triazóis são

utilizados no controle de antracnoses, mas a avaliação de resistência é pouco estudada para este grupo, embora já existam fungos resistentes a fungicidas deste grupo químico em diferentes culturas. Esses fungicidas inibem a biossíntese de esteróis, componente estrutural da membrana dos fungos. (WONG; MIDLAND, 2007). No Brasil não há trabalhos realizados para verificar a presença de isolados de *C. acutatum* resistentes a triazóis.

Segundo Goes et al. (2008), mesmo quando as pulverizações para o controle de PFC são realizadas sob condições muito controladas, a doença pode não ser reduzida a níveis satisfatórios. Alguns trabalhos realizados com um determinado fungicida podem apresentar diferentes resultados. Para o controle da PFC no Brasil existem poucos grupos químicos registrados (BRASIL, 2011), mas nem todos têm apresentado resultados satisfatórios (FEICHTENBERGER, 1994; GOES et al., 2008). Este problema também ocorre na Flórida, onde atualmente apenas as estrobirulinas individualmente ou em misturas com o ferbam são recomendadas (PERES; DEWDNEY, 2011).

Os sistemas de previsão são importantes para doenças que, embora de ocorrência esporádica, causam danos e perdas (FRY, 1982). Como a podridão floral é controlada principalmente através de pulverizações preventivas com fungicidas (PERES, 2002; GOES et al., 2008), muitos citricultores realizam as pulverizações mesmo em anos onde as condições não são favoráveis para a ocorrência da doença. Para a PFC existe um sistema de previsão (PFD-FAD) disponível para uso no Estado de São Paulo (PERES, 2002), mas o mesmo praticamente não é utilizado pelos citricultores. A razão alegada pelos citricultores para o desuso do programa é sua elevada complexidade e sua inacurácia em situações em que condições ambientais favoráveis ocorrem quando as flores estão abertas e no início do processo de senescência das pétalas. A adaptação e/ou simplificação desse sistema, levando em consideração principalmente as condições favoráveis para infecção pode ser uma ferramenta útil para o controle da podridão floral.

Este estudo foi proposto com os seguintes objetivos: i) verificar se existem isolados de *C. acutatum* no Estado de São Paulo com resistência ao difenoconazole (triazol) e ao carbendazim (benzimidazol); ii) avaliar a eficácia do carbendazim e do

difenoconazole, em diferentes intervalos de aplicação no campo, sobre a PFC; iii) avaliar o efeito de novas misturas formuladas no controle da PFC em casa-de-vegetação e no campo; iv) avaliar o efeito de pulverizações baseadas em informações climáticas e estágio de desenvolvimento das flores em comparação ao uso de calendário fixo e do sistema PFD-FAD no controle da PFC e; v) estabelecer uma função de dano para a PFC.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão Bibliográfica

3.2.1.1 Sensibilidade de *Colletotrichum* spp. a fungicidas

A resistência de fungos a fungicidas ocorre devido à sobrevivência e posterior dispersão dos indivíduos que sofreram mutação em genes relacionados à resistência. Essa mutação pode ocorrer em um único gene ou em vários genes, com diferentes mecanismos, envolvendo principalmente modificações no sítio primário de ação dos fungicidas sobre o fungo (BRENT, 1995).

O uso inadequado de produtos pode levar à resistência, conforme relatado para os carbamatos, benzimidazóis, dicarboxamidas e fenilalaninas nos anos 80. Para a detecção da resistência realizam-se estudos de sensibilidade denominados “baselines” (definição de um perfil de sensibilidade de um fungo alvo a um fungicida), avaliando a resposta de indivíduos antes da exposição do mesmo a um fungicida. Esses estudos são utilizados no monitoramento de resistência comparando populações expostas e não expostas e também para o registro de qualquer fungicida antes do mesmo ser recomendado para uso, utilizando as populações não expostas (RUSSEL, 2004).

O monitoramento da resistência é importante para verificar se as causas da ineficiência no controle estão associadas com resistência, além de poder verificar se as estratégias de manejo da resistência estão apresentando resultados positivos. Este monitoramento deve ser realizado de um a dois anos antes da introdução do produto no mercado e durante os anos nas áreas onde o mesmo está sendo utilizado (BRENT, 1986). Cuidados devem ser tomados para não extrapolar resultados de laboratório para

o campo, uma vez que alguns fungicidas podem inibir o patógeno completamente *in vitro* com concentrações de 1-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas no campo podem ser necessários de 50-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do fungicida (BRENT, 1994).

Segundo Peres et al. (2002) nunca foram registrados casos de ineficiência de controle da PFC devido a resistência de *C. acutatum* a fungicidas. Entretanto, o principal fungicida utilizado no controle da PFC foi o benomil do grupo dos benzimidazóis e existem diversos relatos de resistência de outras espécies de *Colletotrichum* a este fungicida. O uso desse grupo químico sempre foi generalizado na cultura dos citros, inclusive no Brasil e nos Estados Unidos. Mesmo com a recomendação de utilização desse grupo químico em misturas, em muitos casos ele foi aplicado sozinho, favorecendo a seleção de populações resistentes.

Conforme mencionado por Wong e Midland (2007), a resistência aos triazóis, que pertencem ao grupo dos DMIs, já foi encontrada em diferentes fungos em algumas culturas. Esses fungicidas são muito utilizados no controle de doenças. Ao contrário dos benzimidazóis, a resistência a este grupo é considerada quantitativa, ou seja, quando a resistência é observada há necessidade de aumentar a dose e/ou reduzir os intervalos de aplicação para obter um controle adequado. Esses autores encontraram indícios de resistência de *C. cereale* para quatro fungicidas DMIs. Apesar de muito utilizados em manejo de *Colletotrichum*, a resistência de espécies deste gênero a esses fungicidas não têm sido muito estudada.

De acordo com Koenraadt, Somerville e Jones (1992), as substituições na posição 198 do ácido glutâmico por lisina, glicina ou alanina na proteína do fuso mitótico conferiram altos níveis de resistência de *Venturia inaequalis* ao benomil (benzimidazol). Já mutantes com substituição da fenilalanina por lisina no códon 200 na mesma proteína apresentaram resistência moderada. Mesmo após 10 anos da interrupção do uso do benomil, isolados resistentes foram encontrados de *V. inaequalis* foram encontrados no campo. Wong et al. (2008) demonstraram haver resistência de *C. cereale* a benzimidazóis e mencionaram que este fato já foi observado em outros trabalhos para as espécies *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. coffeanum*, *C. lindemuthianum* e *C. graminicola*. A resistência de *C. cereale* a benzimidazóis foi

conferida pela substituição do ácido glutâmico por lisina no códon 198 da β -tubulina observada *in vitro* com testes para tiofanato-metílico e *in vivo* para dois benzimidazóis (tiofanato-metílico e benomil).

Peres (2002) e Peres et al. (2004) observaram alterações nos códons 198 e 200 na β -tubulina apenas de *C. gloeosporioides* isolados de citros. Esse autores, assim como Goes e Kimati (1998), encontraram inibições do crescimento de *C. acutatum* isolados de citros em torno de 80 a 90% em meio de cultura contendo benomil em altas concentrações (1000-2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Por outro lado, *C. gloeosporioides* foi totalmente inibido em concentrações iguais ou superiores a 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nos dois trabalhos, *C. acutatum* foi considerado como não altamente sensível e não altamente resistente ao benomil. Apesar disso, o benomil foi efetivo no controle da podridão floral no campo (GOES; KIMATI, 1998).

Peres (2002) mencionou que o risco de resistência de *C. acutatum* aos benzimidazóis é menor comparado a *C. gloeosporioides*. Chung et al. (2006) estudaram o efeito do tiofanato-metílico sobre diferentes isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* oriundos de várias culturas e observaram que todos os isolados de *C. acutatum* foram considerados poucos sensíveis, mas os isolados de *C. gloeosporioides* foram divididos em sensíveis, pouco sensíveis, com resistência intermediária e resistentes.

Nakaune e Nakano (2007) mostraram que a resistência adquirida por *C. acutatum* a benzimidazóis é diferente da resistência encontrada para as demais espécies de *Colletotrichum* e não ocorre devido a substituições de aminoácidos na β -tubulina. Segundo os autores, o gene CaBEN 1 codifica uma proteína que exerce uma função essencial nesta resistência, sendo requerida na ativação da transcrição da *CaTUB1* (sequência da β -tubulina) e induzindo a super-expressão desta. Neste trabalho, o isolado transformante (sem alteração na β -tubulina, mas com expressão do gene CaBEN 1 interrompida) teve seu crescimento totalmente inibido com 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de benomil e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tiofanato-metílico. Já o isolado selvagem cresceu em concentrações de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e os genes da β -tubulina foram semelhantes para os dois isolados (transformante e selvagem). Permanece obscuro o mecanismo pelo qual a

proteína codificada pelo gene CaBEN1 induz o aumento na expressão e codificação de proteína da sequência gênica da β -tubulina (*CaTUB1*), mas esta super-expressão é essencial para a resistência ao benzimidazol (benomil).

3.2.1.2 Controle químico da podridão floral dos citros

O controle de doença pode ser feito através da prevenção de sua chegada em áreas onde o inóculo ainda não está presente através de medidas de exclusão. Pode ser feito pela erradicação da doença de uma área onde ela existe ou através da proteção de tecidos suscetíveis antes ou durante o processo de infecção através de medidas de proteção e imunização, sendo a proteção a mais relacionada com o controle químico que tem como objetivo atrasar ou interromper o progresso da doença de forma que ela não exceda o nível desejado (WHETZEL 1925; 1929 apud KIMATI; BERGAMIN FILHO, 1995).

O controle químico de doenças, assim como a utilização de variedades resistentes são as estratégias de controle de doenças em plantas mais importantes, entretanto, a epidemiologia da doença é sem dúvida a base para o sucesso no uso destas estratégias (VANDERPLANK, 1963). Desta forma, o controle de doenças deve ser sempre estabelecido após o entendimento das relações patógeno-hospedeiro-ambiente, além de estabelecer a etiologia correta da doença, uma vez que decisões de controle podem ser tomadas de forma incorreta caso a epidemiologia e/ou etologia não estejam esclarecidas, como foi o caso da podridão floral inicialmente controlada por 2,4-D (FAGAN, 1984). Apenas após ter a etiologia esclarecida, a doença passou a ser controlada por fungicidas.

O controle químico tem sido a opção mais usada para o controle da podridão floral. As pulverizações com fungicidas visam proteger as flores da infecção do patógeno durante o florescimento. O número de aplicações pode variar em função das condições climáticas e da uniformidade e duração do período de florescimento das plantas (FEICHTENBERGER, 1994) e a eficiência do controle está associada ao estágio de desenvolvimento da flor e ao intervalo de aplicação (PRATES, 1991).

Desde que a podridão floral teve sua etiologia associada a fungo, em 1979, os fungicidas benomil e captafol foram os produtos mais eficientes no controle da doença (FAGAN, 1984). Mas desde a época que estes fungicidas foram banidos do mercado, outros têm sido testados para o controle da doença, sem resultados muito consistentes (GOES et al., 2008). Porto (1993) menciona que após a proibição do captafol não foi encontrado outro produto que apresentasse resultados satisfatórios e semelhantes aos dele. Os fungicidas registrados atualmente para o controle de *Colletotrichum* spp. em citros no Brasil são os benzimidazóis (carbendazim e tiofanato-metílico) triazóis (difenoconazole e tebuconazole), estrobirulina + triazol (trifloxistrobina + tebuconazole; azoxistrobina + difenoconazole), ditiocarbamatos (mancozebe) ditiocarbamato + oxazolidinadiona (mancozebe + famoxadona), captan (dicarboxamida) e cúpricos (BRASIL, 2011), embora nem todos sejam eficazes no controle da podridão floral causada por *C. acutatum*.

O benomil foi um produto eficiente para o controle da podridão floral antes de sua proibição e esta idéia é compartilhada por pesquisadores do Brasil, de Belize, dos Estados Unidos e da Argentina. Prates (1991) e Feichtenberger (1991) mencionaram que bons resultados foram encontrados com a utilização de benomil no Brasil. Fagan (1984) observou em Belize melhores resultados para as aplicações com captafol e benomil em relação ao captan e ao tiabendazol, com uma atividade residual maior do captafol. A mistura benomil + captafol foi a que apresentou os melhores resultados. Timmer e Zitko (1992) encontraram bons resultados com benomil e captafol no controle da PFC e Timmer (2000) relatou que o benomil era o principal produto para o controle da doença naquela época e o uso em conjunto com o ferbam seria essencial para o manejo de resistência. Segundo Agostini, Haberle e Morón (1995) o benomil e o carbendazim foram eficientes para o controle da podridão floral na Argentina.

No trabalho realizado na Flórida (EUA), por Peres, Souza e Timmer (2000), foi avaliado o efeito das estrobirulinas, que apresentaram resultados inferiores aos do benomil no controle de sintomas nas flores, mas apresentaram o mesmo número de frutos fixados que o tratamento com benomil quando utilizados nas doses mais altas. O intervalo entre as segunda e terceira pulverizações foi de 17 dias e duas chuvas

ocorreram 5 e 6 dias após a segunda pulverização, ou seja, a terceira pulverização foi realizada 11 dias após as chuvas e este intervalo foi suficiente para a doença aumentar de 5-9% para 39-48% nos tratamentos com estrobirulinas. Mas no tratamento com benomil praticamente não houve incremento da doença.

Goes et al. (2008) avaliaram os efeitos do carbendazim e do difenoconazole e encontram bons resultados com o uso do carbendazim em três e quatro pulverizações que aumentaram a produção em 55 e 75% em relação ao tratamento controle, respectivamente. Já o difenoconazole não promoveu incrementos na produção. Em alguns ensaios nenhum fungicida apresentou incrementos na produção, mesmo reduzindo a doença em relação ao tratamento controle. Estes autores mencionam que diferenças entre os resultados podem ser explicadas pela intensidade da doença em cada ano e a capacidade produtiva das plantas em cada área, uma vez que diferenças entre tratamentos podem ser maiores em pomares mais produtivos.

Prates e Rodrigues (1995) relataram que dentre as dificuldades do controle estão a identificação do momento correto de aplicação e a escolha correta do produto. A eficiência pode variar com o local e com o ano, sendo necessária a obtenção de dados locais de clima e da doença, visando monitorá-la corretamente. O volume de calda deve ser adequado para garantir cobertura e deposição em todas as inflorescências interna e externamente na planta.

Além da escolha do melhor produto, o número de aplicações a ser utilizado deve ser bem equacionado, de modo a evitar desperdício, resistência do patógeno ao fungicida e reduzir a chance de contaminação ambiental. O número de pulverizações vai depender de diferentes fatores como duração do período de florescimento, que pode ser prolongado por até 60 dias nos períodos mais frios no Estado de São Paulo (GOES et al., 2008).

Em citros, como em qualquer outra cultura há problemas ligados à tecnologia de aplicação. A eficácia dos defensivos é dependente da regulagem, calibração e manutenção dos equipamentos de pulverização. Qualquer que seja o alvo, a pulverização deve produzir uma cobertura adequada do mesmo (RAMOS; RAETANO; PIO, 2005). A utilização de baixo volume de calda fungicida no controle de doenças dos

citros vem sendo testada com sucesso no controle de podridão floral e outras doenças fúngicas como a pinta preta dos citros (*Guignardia citricarpa*) e a mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) (FEICHTENBERGER; SANTOS; SPÓSITO, 2010).

3.2.1.3 Controle da podridão floral dos citros com o uso de sistema de previsão

O uso indiscriminado de fungicidas pode acarretar diferentes problemas para o ambiente, a saúde humana e ainda selecionar populações resistentes dos patógenos. A busca por estratégias que visam reduzir e otimizar o uso de produtos químicos são essenciais. O uso de sistemas de previsão, além de reduzir o número de pulverizações e o dano causado ao homem e ao ambiente, pode conferir maior lucro ao produtor (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1995). Sistemas de previsão se caracterizam por previsões da ocorrência ou não de doenças em plantas em níveis de importância econômica (FRY, 1985 apud COAKLEY, 1988).

Um sistema de previsão deve obrigatoriamente ser baseado em dados confiáveis, ser testado e aprovado para a região onde se pretende utilizá-lo, ser simples para ser aceito, ser avaliado apenas para doenças de ocorrência esporádica, com fácil detecção e com controle disponível (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Segundo Coakley (1988) os sistemas de previsão precisam atender a quatro requisitos, sendo eles: i) a doença causa danos econômicos, ii) a intensidade da doença varia entre as safras, iii) medidas para o controle da doença estão disponíveis e são economicamente viáveis e, iv) existem estudos relacionando a ocorrência da doença com condições climáticas. Bergamin Filho e Amorim (1995) mencionam que mesmo o sistema seguindo todas essas características, normalmente os produtores não os utilizam, pois preferem não arriscar e ter um gasto maior com as pulverizações recompensado por uma maior segurança.

Um sistema de previsão para a podridão floral dos citros foi desenvolvido por Timmer e Zitko (1993) para as condições da Flórida. Este sistema foi criado para reduzir o número de aplicações de fungicidas no controle PFC. Esses autores relacionaram a incidência da doença (% de flores afetadas em 20 plantas) ao número de flores que

estariam sintomáticas após 4 dias. Esta previsão foi relacionada à quantidade total de chuva nos 5 dias anteriores, numa tentativa de prever a incidência e decidir pela aplicação ou não de fungicidas. Duas equações, a eq. (8) e eq. (9) foram geradas em dois anos diferentes e deram origem a uma terceira equação bem diferente, eq. (10). Em 1989 a equação gerada ao final foi:

$$y = -0,44 + 0,62 (TD)^{1/2} + 0,26 (R)^{1/2} \times 100 - 0,57 (LW)^{1/2}, \text{ com } R^2 = 0,753 \quad (8)$$

Para 1991 a equação gerada ao final foi:

$$y = -53,9 + 1,23 (TD)^{1/2} + 0,94 (R)^{1/2} \times 100 + 6,78 (LW)^{1/2}, \text{ com } R^2 = 0,657 \quad (9)$$

onde: y = previsão de % de flores afetadas, TD = número de flores doentes em 20 plantas 3-4 dias antes da data, R = total de chuvas em mm 4-8 dias antes da data e LW = número de horas de molhamento foliar – 50 horas (10 horas por dia) por um período de 4-8 dias antes da data alvo. Os dados dos dois anos foram analisados conjuntamente e deram origem a uma nova equação (eq. 10), a qual, confrontada aos dados originais, produziu um $R^2 = 0,578$ e foi estabelecida como:

$$y = -7,15 + 1,28 (TD)^{1/2} + 0,44 (R)^{1/2} \times 100 \quad (10)$$

Nas equações, a temperatura e a umidade relativa foram excluídas por não serem fatores significantes nos três anos de avaliação, já o molhamento foliar foi excluído da nova equação gerada com os dados dos dois anos por apresentar uma pequena porcentagem da variabilidade e ser de difícil utilização pelos produtores. Dificuldades foram encontradas para gerar a porcentagem de flores sintomáticas mínima para indicar pulverização, estabelecendo-se o valor de 20%. Além disso, não foi considerada a quantidade de flores na planta, o que poderia gerar erros conforme mencionado pelos autores, que deixam claro a necessidade de mais informações básicas a fim de melhorá-lo.

Timmer e Zitko (1996) avaliaram a acurácia do modelo desenvolvido por eles em 1993 (eq. 10) para as condições da Flórida. Os autores notaram que o sistema foi mais preciso quando a doença apresentou níveis baixos ou moderados. Mas quando ocorreu uma chuva forte sem inóculo ou ausência de chuva com inóculo, as previsões apresentavam diferenças para os valores observados no campo. Além disso, as chuvas

rápidas com período de molhamento curto também geraram erros na previsão. Após as chuvas seguidas de frentes frias as plantas secam mais rapidamente e o sistema pode gerar níveis previstos superiores aos observados. Esses autores notaram a necessidade de ser utilizada a variável molhamento foliar e também a duração da chuva, que deveriam ser adicionadas ao sistema de previsão proposto por eles.

Timmer e Brown (2000) adicionaram a variável molhamento foliar ao modelo e o mesmo passou a se basear na quantidade de inóculo do fungo presente na área, na ocorrência de chuvas e no molhamento foliar dos últimos cinco dias. Deste modo, a equação passou a ser:

$$y = -13,13 + 1,16\sqrt{TD} + 0,48\sqrt{R} \times 100 + 1,77 \sqrt{LW} \times 5 \quad (11)$$

onde: y = porcentagem de flores infectadas previstas para 4 dias a frente, TD = total de flores infectadas em 20 plantas, R = chuvas (mm) total nos últimos 5 dias e LW = média do número de horas de molhamento foliar acima de 10 horas nos últimos 5 dias. A aplicação de fungicidas é recomendada quando a incidência da doença for superior a 20%, o florescimento deve ser suficiente economicamente para justificar a pulverização e nenhuma pulverização ter sido realizada nos últimos 10-14 dias. Os talhões com cálices persistentes devem ser examinados com atenção e aqueles com plantas estressadas florescendo antes da florada principal devem ser examinados duas vezes por semana. Eliminação de plantas estressadas e evitar irrigação por aspersão durante o florescimento também contribuem para reduzir a severidade da doença.

Posteriormente, a avaliação deste sistema foi realizada em pomares brasileiros (PERES, 2002; PERES et al., 2004). O uso do sistema resultou em menor número de aplicações de defensivos, sem que houvesse diminuição na produção de frutos em relação ao controle preventivo tradicional. No entanto, a quantidade de doença nos pomares que utilizaram o sistema de previsão foi superior em relação àqueles onde foi utilizado o sistema de controle tradicional. No sistema desenvolvido foi considerada a equação modificada (eq. 11) por Timmer e Brown (2000), além de outros fatores como estágio da florada, histórico nos últimos cinco anos, quantidade de inóculo no ano anterior baseado em cálices persistentes, suscetibilidade da variedade e condições fitossanitárias do pomar, atribuindo-se valores de risco para cada fator incluindo-os no

sistema de previsão. Além desses fatores foram considerados no mínimo 7 dias os intervalos entre as pulverizações.

Dentre as modificações necessárias para tornar o sistema mais preciso, seria importante esclarecer quais estádios florais são mais suscetíveis e quantas horas de molhamento são necessárias para infecção em cada um dos estádios. Denham e Waller (1981) e Denham (1988) mencionam que são necessárias de 12 a 18 horas para infecção e as epidemias ocorrem quando há chuvas durante o florescimento. Timmer (1999) menciona que este valor é em torno de 10 a 12 horas. Além disso, o sistema PFD-FAD recomenda pulverização no mínimo a cada 7 dias, mas após a abertura das pétalas, provavelmente este intervalo poderia ser aumentado, pois não há mais expansão dos tecidos das pétalas. Segundo Timmer (2000) os produtos normalmente apresentam controle por 10-14 dias.

Alguns autores fizeram observações importantes nos diferentes trabalhos realizados com podridão floral. Dentre eles, Porto et al. (1979) mencionaram que a doença tornava-se grave somente após períodos úmidos por dois ou três dias e com uma precipitação superior a 25 mm. Segundo Timmer et al. (1994) e Timmer (2000), o efeito da temperatura sobre a PFC pode ser direto, atuando sobre o fungo, e indireto, influenciando na duração do período de florescimento das plantas. Em temperaturas baixas, o florescimento das plantas é mais prolongado, contribuindo para que as flores fiquem expostas à ação do fungo por mais tempo. Denham e Waller (1981) relatam que o calendário de três pulverizações poderia passar para apenas uma se antes da ocorrência das condições favoráveis pudéssemos fazer as previsões com exatidão.

De acordo com Arauz (2000), normalmente há uma variabilidade associada a condições favoráveis para a infecção de *Colletotrichum* de maneira geral e isto se torna um problema na elaboração de sistemas de previsão das doenças causadas por espécies deste gênero, podendo explicar algumas falhas encontradas nas previsões e explicando a baixa adesão de agricultores aos sistemas até hoje propostos. Segundo este autor, os sistemas de previsão funcionaram bem apenas nas regiões onde foram elaborados não sendo recomendado extrapolar o uso para outras regiões sem antes avaliar a eficácia do mesmo.

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Coleção de isolados

Em pomares de citros de seis diferentes municípios do Estado de São Paulo (Barretos, Mogi-Guaçu, Pedranópolis, Gavião Peixoto, Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo) foram coletados 255 isolados de *C. acutatum* causando sintomas em flores em 2008 (Figura 3.1). Em Pedranópolis foram coletados isolados de áreas onde não há histórico de utilização dos fungicidas carbendazim e difenoconazole. Nas demais áreas foram coletados isolados de *C. acutatum* de pomares que habitualmente utilizam esses fungicidas no controle da doença, incluindo pomares das fazendas em que os experimentos de epidemiologia e controle químico da podridão floral foram realizados. Os isolados foram obtidos inicialmente pelo plaqueamento de pétalas sintomáticas em ágar-água a 2% e, em seguida, isolamento do fungo por repicagem em meio de cultura BDA. As colônias típicas de *C. acutatum* desenvolvidas no meio de cultura foram padronizadas através de cultivo monospórico. Todos os isolados foram caracterizados geneticamente como *C. acutatum* por PCR com primer universal ITS4 juntamente com os primers espécie-específicos Calnt2. A conservação dos isolados foi realizada em papel de filtro estéril contendo estruturas do fungo, armazenados em tubos com sílica-gel e mantidos em geladeira à temperatura de 7°C.

Figura 3.1 - Localização dos seis municípios onde foram coletados os isolados de *Colletotrichum acutatum* no Estado de São Paulo

3.2.2.2 Ensaios com fungicidas em laboratório

3.2.2.2.1 Detecção e caracterização de populações de *C. acutatum* resistentes aos fungicidas carbendazim e difenoconazole

Os fungicidas foram adicionados individualmente ao meio BDA fundente para obter concentrações do carbendazim de 0; 1,0; 5,0; 10; 50; 100 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e concentrações do difenoconazole de 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O meio foi vertido em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, usando aproximadamente 20 mL de meio por placa. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados de uma placa de Petri com cultura de sete dias de idade de cada um dos isolados de *C. acutatum* e colocados no centro de uma placa com meio acrescido de uma das concentrações de fungicida. A placa foi incubada a 25°C no escuro. Transcorridos sete dias, o diâmetro das colônias foi mensurado em duas direções perpendiculares, obtendo-se o diâmetro médio da colônia (DMC). Para cada concentração/fungicida, foi calculada a inibição do crescimento da colônia (ICC) para cada isolado, pela eq. (12)

$$\text{ICC} = (\text{DMC}_{\text{sf}} - \text{DMC}_{\text{f}} / \text{DMC}_{\text{sf}}) \times 100 \quad (12)$$

em que,

DMC_{sf} é o diâmetro médio das colônias em BDA sem fungicida;

DMC_{f} é o diâmetro médio da colônia obtido em cada concentração de fungicida.

Foi estimada a CE_{50} (concentração efetiva para inibição do crescimento micelial em 50%) para os isolados estudados. Os isolados foram avaliados em grupos e em cada ensaio utilizou-se apenas uma repetição (placa mensurada em dois sentidos). Para determinar a reprodutibilidade e a variação inerente dos ensaios já realizados, cinco isolados foram escolhidos e utilizados em todos os ensaios, sendo utilizada nova solução fungicida para cada ensaio. Posteriormente, os valores de CE_{50} obtidos nos diferentes ensaios foram comparados entre si de acordo com a metodologia utilizada por Wong e Midland (2007).

3.2.2.3 Ensaios com fungicidas em casa-de-vegetação

3.2.2.3.1 Efeito pré- e pós-inoculação do fungicida carbendazim e da mistura (trifloxistrobina + tebuconazole) no controle de *C. acutatum*

Para avaliar o efeito pré- e pós-inoculação do carbendazim e da mistura (trifloxistrobina + tebuconazole) no controle de *C. acutatum* em casa-de-vegetação, foram realizados três experimentos de fevereiro a maio de 2010 no Fundecitrus em Araraquara/SP. Para avaliar o efeito pré-inoculação, botões florais de plantas de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] com idade de 3-4 anos foram pulverizadas com carbendazim (5g/L), trifloxistrobina + tebuconazole (40 mg/L + 80 mg/L) ou água e, após 6 horas (tempo suficiente para a secagem da calda fungicida aplicada), suspensão de conídios de *C. acutatum* (5×10^5 conídios.mL⁻¹) foi pulverizada em ramos reprodutivos contendo entre 10 e 15 flores nos estádios R4 (pétalas totalmente expandidas) e R5 (flor aberta). Após a inoculação, esses ramos reprodutivos foram mantidos em câmara úmida por 24 horas. A incidência de flores sintomáticas foi avaliada de 4 a 7 dias após a inoculação. Para avaliação do efeito pós-inoculação dos fungicidas, as flores foram pulverizadas previamente com a suspensão de conídios de *C. acutatum* e as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas. No momento da retirada da câmara úmida e após 24 horas foram realizadas as pulverizações dos fungicidas ou de água (controle). A avaliação da incidência de flores sintomáticas também foi realizada de 4 a 7 dias após a inoculação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, cada unidade experimental sendo constituída por um vaso contendo uma planta com um ramo reprodutivo. O experimento foi analisado no esquema fatorial (3 momentos de pulverização x 3 tratamentos com produtos). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.2.4 Ensaios com fungicidas no campo

3.2.2.4.1 Coleta dos dados climáticos

Para coleta dos dados climáticos de temperatura, precipitação, umidade relativa do ar e período de molhamento foram utilizadas duas estações meteorológicas da

marca Davis[®], modelo: “Vantage Pro2 - Sem fio”, sendo uma em Santa cruz do Rio/SP Pardo e a outra em Taquarituba/SP.

3.2.2.4.2 Determinação do intervalo de aplicação dos diferentes princípios ativos no controle da doença

Foram realizados três experimentos, sendo dois em Santa Cruz do Rio Pardo e um em Taquarituba. Em Santa cruz do Rio Pardo os ensaios foram realizados no mesmo talhão, em 2008 e 2009, de laranja ‘Pera’ enxertada em tangerina ‘Cleópatra’ com espaçamento de 3,8 x 7,5 m e transplântio em 1990. Em Taquarituba o ensaio foi conduzido em 2009 em um talhão de laranja ‘Pera’ enxertada em Limão ‘Cravo’ transplantado em 1992 com espaçamento de 3,0 x 7,0 m. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com 4 repetições e 18 plantas por parcela. Entre os blocos foi mantida uma bordadura de uma rua inteira de plantas. Os fungicidas carbendazim (Derosal 500SC[®]) e difenoconazole (Score[®]) foram avaliados para diferentes intervalos de aplicação em 13 tratamentos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Descrição dos tratamentos com pulverizações de difenoconazole e carbendazim em diferentes épocas, com início nos estádios de botões verdes e fechados, realizados em Santa Cruz do Rio Pardo e Taquarituba em 2008 e 2009

Tratamentos	Época das pulverizações					
	Início	7 dias	10-11 dias	14 dias	17-18 dias	21 dias
1	difenoconazole	carbendazim		carbendazim		
2	difenoconazole			carbendazim		
3	difenoconazole		carbendazim			carbendazim
4	difenoconazole	carbendazim			carbendazim	
5	difenoconazole		carbendazim		carbendazim	
6	difenoconazole				carbendazim	
7	carbendazim	difenoconazole		difenoconazole		
8	carbendazim			difenoconazole		
9	carbendazim		difenoconazole			difenoconazole
10	carbendazim	difenoconazole			difenoconazole	
11	carbendazim		difenoconazole		difenoconazole	
12	carbendazim				difenoconazole	
13			Controle (sem pulverização)			

Em Santa Cruz do Rio Pardo as pulverizações foram realizadas com pulverizador Martignani® Turbo II Motorizado com volume de calda de 1300 L/ha e em Taquarituba com Turbo Atomizador Jacto® Arbus 4000 – Valencia com volume de calda de 1000 L/ha. As pulverizações foram iniciadas nos estádios R1/R2 (ANEXO). Para o experimento de 2008 as concentrações de carbendazim e difenoconazole utilizadas foram de 1000 e 125 g de i.a./2000 L de água, respectivamente. Nos experimentos do ano seguinte foram utilizadas as doses citadas anteriormente por hectare. As avaliações foram realizadas em 10 ramos reprodutivos marcados por planta, nas duas plantas centrais da parcela, contando-se o número total de flores e de flores sintomáticas por ramo 5-7 dias após a última pulverização. Três meses após o período de queda fisiológica de frutos foi avaliado o número de cálices persistentes e o número de frutos fixados por ramo. A produção foi avaliada nas quatro plantas centrais da parcela durante a colheita nas respectivas áreas no ano subsequente. Foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.2.4.3 Eficiência de diferentes princípios ativos no controle da doença

Foram realizados dois experimentos em 2009, um em talhão de laranja ‘Pera’ enxertada em Tangerina ‘Cleópatra’ com espaçamento de 3,8 x 7,5 m e transplântio em 1990 em Santa Cruz do Rio Pardo e outro em Taquarituba, em um talhão de laranja ‘Pera’ enxertada em Limão ‘Cravo’ transplantado em 1992 com espaçamento de 3,0 x 7,0 m. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com 4 repetições e 18 plantas por parcela. Os fungicidas carbendazim (Derosal 500SC®), difenoconazole (Score®), trifloxistrobina + tebuconazole (Nativo®) e ciprodinil + fludioxonil (Switch 62,5WG®, 37,5% + 25% i.a.; Syngenta Proteção de cultivos LTDA) foram pulverizados nas doses de 1000 g/ha (carbendazim), 125 g/ha (difenoconazole), 80 + 160 g/ha (trifloxistrobina + tebuconazole) e 93,75 + 62,5 g/ha (ciprodinil + fludioxonil), em duas, três ou quatro pulverizações durante o florescimento com intervalos de aplicação de sete dias, iniciando nos estádios R1 e R2 do florescimento (ANEXO). As pulverizações foram realizadas utilizando os mesmos pulverizadores e volume de calda citados no item anterior. As avaliações de pétalas sintomáticas, cálices persistentes e frutos

fixados foram realizadas no mesmo período das mencionadas no item anterior. A produção foi avaliada nas quatro plantas centrais da parcela no ano subsequente.

3.2.2.4.4 Controle químico da doença baseado em condições climáticas e nos estádios de desenvolvimento das flores

Foram realizados quatro experimentos em 2010, sendo dois no município de Santa Cruz do Rio Pardo e dois no município de Taquarituba. Os ensaios foram realizados em um pomar de laranja ‘Pera’ e outro de ‘Valencia’ com idade entre 19 e 21 em cada município. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com 4 repetições e 18 plantas por parcela. Entre os blocos foi mantida uma bordadura de uma rua inteira de plantas. O fungicida trifloxistrobina + tebuconazole (Nativo®) foi utilizado na dosagem de 800 mL/ha quando necessário nos diferentes tratamentos descritos abaixo:

T1 - Controle: sem pulverização com fungicida;

T2 - Sistema calendário (fazenda): pulverização no sistema calendário da fazenda com intervalos em torno de 7-10 dias e um total de 3 a 4 pulverizações, iniciando no estádio R1/R2 (ANEXO);

T3 - Sistema PFD-FAD: pulverização em função do sistema desenvolvido por Peres (2002) para as condições do Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://pfd.ifas.ufl.edu/default.asp?lng=prt>>;

T4 - Sistema proposto A: pulverização realizada um dia após ocorrência de molhamento foliar acima de 14 horas nos estádios R1 a R3 e acima de 12 horas nos estádios R4 a R7. A ocorrência de chuvas, com molhamento foliar mantido abaixo dos valores citados acima, não indicava pulverização. O intervalo mínimo entre as pulverizações foi de 7 dias até R5 e de 10 dias após este estádio;

T5 - Sistema proposto B: semelhante ao sistema proposto A, mas com pulverização realizada um dia após ocorrência de molhamento foliar acima de 16 horas nos estádios R1 a R3.

T6 - Sistema proposto C: não pulverizar até o estádio R3, independentemente da condição climática (flores ainda fechadas e menos suscetíveis). Nos estádios R4 a R7,

pulverizar um dia após a condição de 12 horas de molhamento foliar. O intervalo mínimo entre as pulverizações foi de 7 dias até R5 e de 10 dias após este estágio;

O número mínimo de horas de molhamento foliar foi estabelecido em 12 horas, pois a germinação de conídios *in vitro* observada neste período de molhamento foi de 40% e a melanização dos apressórios ocorreu em menos de 50% dos conídios germinados, nas temperaturas entre 16 e 32 °C (dados não publicados). Nos testes em flores, nas fases de pétalas totalmente expandidas (R4) e flor aberta (R5) houve expressão de sintomas acima de 10% em período de molhamento foliar igual ou superior a 12 horas, mas nos estádios anteriores a estes, sintomas foram observados em molhamentos foliares de 24 horas (dados não publicados).

As pulverizações foram realizadas utilizando os mesmos pulverizadores e volume de calda citados no item 3.2.2.4.2 para os respectivos municípios. As avaliações de pétalas sintomáticas, cálices persistentes e frutos fixados foram realizadas no mesmo período das mencionadas no item 3.2.2.4.2. Foi realizada análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.2.5 Elaboração de uma função de dano para a podridão floral

As relações entre as variáveis porcentagem de flores sintomáticas/ramo e produção e entre o número de cálices persistentes/ramo e produção foram analisadas para os dados dos três experimentos do item 3.2.2.4.2 e para os dois experimentos do item 3.3.3.4.3 conduzidos em 2008/2009 e 2009/2010 a fim de estabelecer uma função de dano para a podridão floral na variedade Pera, considerada dentre as laranjas doces, umas das mais suscetíveis à doença. Cada experimento foi composto por 13 tratamentos, sendo 4 blocos e 2 plantas avaliadas por parcela, totalizando 104 plantas em cada um dos cinco experimentos. Os dados de cada parcela (2 plantas) foram agrupados para realização das análises. Para cada experimento foram realizados ajustes dos modelos linear (eq. 13) e exponencial negativo (eq. 14) aos dados, para as diferentes variáveis, sendo:

$$y = a - b \cdot x \quad (13)$$

$$y = a \cdot \exp^{(-b \cdot x)} \quad (14)$$

em que: a é o parâmetro do intercepto e b é o parâmetro de inclinação e tem-se a definição de y e x na fórmula:

i) y = produção em kg/planta, x = porcentagem de flores sintomáticas por ramo.

ii) y = Produção em kg/planta, x = número de cálices persistentes por ramo.

O coeficiente de determinação (R^2) e o padrão de resíduo foram utilizados para a escolha do melhor modelo para representar a relação entre as variáveis. O parâmetro b do modelo escolhido para cada experimento foi comparado pelo teste t para realização ou não da análise agrupada dos dados de todos os experimentos. Todas as análises e ajustes foram realizadas no programa STATISTICA 7 (Stat Soft Inc., Tulsa, OK).

Para as análises entre flores sintomáticas e produção, uma equação foi gerada para cada experimento individualmente e o valor do parâmetro a (intercepto) foi utilizado como estimativa da produção na ausência da doença. Em seguida, o valor deste parâmetro foi ajustado para 100 e estimou-se a produção relativa nas demais parcelas de cada experimento. Os dados dos cinco experimentos foram agrupados (parâmetro b significativamente iguais) e estimou-se uma equação geral para a relação entre flores sintomáticas e produção para os cinco experimentos. Para cálices persistentes não foi realizado agrupamento dos dados dos cinco experimentos.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Ensaios com fungicidas em laboratório

Para o fungicida difenoconazole foi construído um histograma com as CE_{50} estimadas para os isolados testados das diferentes populações. Pode-se observar que a maioria dos isolados (28%) da população não exposta apresentou valor da CE_{50} de $0,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, valor similar ao dos isolados da população exposta ao fungicida no campo, que teve 22% dos isolados com CE_{50} de $0,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em ambas as populações, as menores CE_{50} foram de $0,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e as maiores foram $0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$, não havendo diferenças entre elas quanto à sensibilidade ao fungicida difenoconazole (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Distribuição da sensibilidade dos isolados de *Colletotrichum acutatum* ao fungicida difenoconazole baseado na CE₅₀ (concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento) dos isolados da população exposta e da não exposta ao fungicida no campo

Não houve diferenças entre as médias obtidas para as populações dos seis diferentes municípios do estado. A média da CE₅₀ da população não exposta (município de Pedranópolis - PD) não diferiu significativamente das médias das populações expostas aos fungicidas no campo dos demais municípios, que apresentaram valores na faixa de 0,10 a 0,12 µg.mL⁻¹ (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Médias das CE₅₀ das seis populações de *Colletotrichum acutatum* em meio de cultura contendo o fungicida difenoconazole. PD representa a população de isolados não expostas ao fungicida no campo e as demais (BT - Barretos, GP - Gavião Peixoto, TQ - Taquarituba, MO - Mogi Guaçu e ST - Santa Cruz R. Pardo) representam as populações que foram expostas ao fungicida no campo em cinco diferentes municípios do estado

Para o carbendazim não foi possível calcular a CE₅₀, pois a inibição do crescimento micelial para todos os isolados testados foi em torno de 50-60% em todas as concentrações avaliadas (1,0 a 1000 µg.mL⁻¹). Pode-se observar que os isolados das seis populações obtidas de municípios localizados em diferentes regiões do estado apresentaram crescimentos semelhantes em todas as concentrações testadas e também no tratamento controle onde apresentaram crescimento na faixa de 5,71 a 5,88 cm após 7 dias. Na menor concentração de carbendazim (1 µg.mL⁻¹), o crescimento foi em torno de 2,89 a 3,02 cm e na maior concentração (1000 µg.mL⁻¹) o crescimento foi em torno de 2,57 a 2,64 cm (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Diâmetro da colônia (cm) dos isolados das seis populações de *Colletotrichum acutatum* em diferentes concentrações do fungicida carbendazim. A população de Pedranópolis representa a população de isolados não exposta e as demais representam as populações que foram expostas ao fungicida no campo

Município	Concentração de carbendazim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)						
	0	1	10	50	100	500	1000
Barretos	5,84 $\pm$ 0,28	2,89 $\pm$ 0,14	2,82 $\pm$ 0,12	2,83 $\pm$ 0,12	2,82 $\pm$ 0,12	2,78 $\pm$ 0,12	2,57 $\pm$ 0,14
Gavião Peixoto	5,83 $\pm$ 0,25	2,96 $\pm$ 0,10	2,91 $\pm$ 0,06	2,93 $\pm$ 0,06	2,92 $\pm$ 0,07	2,82 $\pm$ 0,18	2,64 $\pm$ 0,10
Taquarituba	5,86 $\pm$ 0,26	2,92 $\pm$ 0,12	2,87 $\pm$ 0,11	2,88 $\pm$ 0,10	2,87 $\pm$ 0,13	2,80 $\pm$ 0,11	2,61 $\pm$ 0,10
Mogi Guaçu	5,82 $\pm$ 0,21	2,93 $\pm$ 0,09	2,86 $\pm$ 0,10	2,84 $\pm$ 0,16	2,86 $\pm$ 0,10	2,79 $\pm$ 0,09	2,62 $\pm$ 0,07
Sta. C. R. Pardo	5,88 $\pm$ 0,28	3,02 $\pm$ 0,09	2,89 $\pm$ 0,11	2,82 $\pm$ 0,24	2,82 $\pm$ 0,24	2,79 $\pm$ 0,14	2,63 $\pm$ 0,10
Pedranópolis	5,71 $\pm$ 0,24	2,89 $\pm$ 0,10	2,84 $\pm$ 0,05	2,85 $\pm$ 0,07	2,85 $\pm$ 0,06	2,79 $\pm$ 0,06	2,59 $\pm$ 0,07

A maioria dos isolados das populações expostas (32%) e da população não exposta (38%) tiveram seu crescimento inibido em 55% na concentração de 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a maioria dos isolados das populações expostas (37%) e da não exposta (44%) ao fungicida no campo tiveram 58-60% do seu crescimento inibido, não havendo diferenças quanto à sensibilidade ao fungicida carbendazim em meio de cultura (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Frequência (%) de isolados na população exposta e não exposta ao fungicida carbendazim nas diferentes faixas de inibição de crescimento micelial em meio de cultura contendo carbendazim nas concentrações de 1 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

3.2.3.2 Ensaios com fungicidas em casa-de-vegetação

Tanto o carbendazim quanto a mistura fungicida (trifloxistrobina + tebuconazole) apresentaram um bom efeito quando utilizados como protetor (pré-inoculação), reduzindo significativamente o número de flores sintomáticas em relação ao tratamento controle (Tabela 3.3). Ambos apresentaram efeito 24 horas após a inoculação e somente a mistura apresentou efeito 48 horas após a inoculação. Quando a mistura foi pulverizada 24 e 48 horas após a inoculação a redução de flores sintomáticas foi de 95% e 60%, respectivamente, em relação ao tratamento controle. Já o fungicida carbendazim não diferiu significativamente do tratamento controle quando aplicado 48 horas após a inoculação, mas quando pulverizado 24 horas após a inoculação reduziu em 58% o número de flores sintomáticas em relação ao tratamento controle, embora tenha sido menos eficiente que a mistura trifloxistrobina + tebuconazole (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Flores com sintomas de podridão floral (%) causada por *Colletotrichum acutatum* sob efeito da pulverização de carbendazim ou da mistura fungicida (trifloxistrobina+tebuconazole) em pré (-6h) e pós-inoculação (+24h e +48h) em plantas de laranja doce em casa-de-vegetação

Tratamentos	Tempo da pulverização em relação à inoculação					
	(-) 6 horas		(+) 24 horas		(+) 48 horas	
Controle (água)	84,10	Aa	95,83	Aa	83,33	Aa
Carbendazim	8,24	Cb	35,33	Bb	68,54	Aa
Triflox. + tebucon.	4,04	Bb	4,96	Bc	31,74	Ab

*As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.3.3 Ensaios com fungicidas no campo

3.2.3.3.1 Determinação do intervalo de aplicação dos diferentes princípios ativos no controle da doença

Os intervalos de aplicação dos fungicidas carbendazim e difenoconazole variaram de 7 a 18 dias em duas ou três pulverizações durante o período de florescimento em 2008 e 2009 (Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6). No experimento conduzido em

2008 em Santa Cruz do Rio Pardo, o número de frutos fixados e cálices persistentes por ramo e a produção (kg/planta) foram semelhantes em todos os tratamentos e não diferiram significativamente ($p < 0,05$) do tratamento controle. Observa-se o número de cálices persistentes por ramo variou de 1,5 a 3,4 e o número de frutos fixados por ramo permaneceu abaixo de 1,0 por planta na maioria dos tratamentos. A produção deste talhão foi baixa neste ano, em torno de uma caixa de 40,8 kg/planta (Tabela 3.4). Durante o florescimento, ocorreram três chuvas, aos 9, 16 e 23 dias após o início do florescimento (Figura 3.5).

Tabela 3.4 - Efeito dos fungicidas difenoconazole e carbendazim em diferentes intervalos de aplicação no controle da podridão floral durante o período de florescimento em pomar de laranja 'Pera' em Santa Cruz do Rio Pardo na safra 2008-2009

Tratamentos	Dias após início do florescimento ^(a)						Cálices persistentes ^(b)	Frutos fixados ^(c)	Produção (kg/planta) ^(d)
	0	7	11	14	18	21			
T1	Dif ^(e)	Carb		Carb			2,81 ^{NS*}	0,83 ^{NS*}	35,65 ^{NS*}
T2	Dif			Carb			3,09	0,74	33,59
T3	Dif		Carb			Carb	1,63	0,69	41,47
T4	Dif	Carb			Carb		1,99	0,94	37,69
T5	Dif		Carb		Carb		2,38	0,88	37,40
T6	Dif				Carb		1,50	0,79	39,87
T7	Carb	Dif		Dif			2,24	0,85	39,28
T8	Carb			Dif			2,00	0,91	38,48
T9	Carb		Dif			Dif	1,69	0,88	40,88
T10	Carb	Dif			Dif		2,14	1,00	37,81
T11	Carb		Dif		Dif		2,14	0,78	36,95
T12	Carb				Dif		1,70	0,89	48,11
T13			Controle				3,41	0,79	42,08

^aAs pulverizações iniciaram-se entre os estádios R1 e R2 do florescimento. ^bNúmero médio de cálices persistentes por ramo marcado. ^cNúmero médio de frutos fixados por ramo marcado. ^dProdução média em kg/planta. ^e(Dif)=pulverização de difenoconazole na dosagem de 500 mL de Score[®]/2000 L da água e (Carb)=pulverização de carbendazim na dosagem de 2 L de Derosal[®]/2000 L de água. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{NS} = Não significativo a 5% no teste F.

Figura 3.5 - Variáveis climáticas em Santa Cruz do Rio Pardo durante o florescimento em 2008. Dia 0 (28/08/2008) refere-se à primeira pulverização no estádio R1/R2. Nos dias 7, 11, 14, 18 e 21 realizaram-se as pulverizações subsequentes. Barras representam precipitação pluviométrica diária (mm). Linhas representam as temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-)

Nos experimentos conduzidos em 2009, alguns tratamentos com fungicidas diferiram do tratamento controle para a variável flor sintomática nos dois municípios e para produção apenas no município de Taquarituba (Tabelas 3.5 e 3.6). Em Santa Cruz do Rio Pardo apenas nos tratamentos T2 e T6 a porcentagem de flores sintomáticas não diferiu significativamente do tratamento controle (Tabela 3.5). Observa-se que tratamentos com 14% de flores sintomáticas diferiram significativamente do controle (65%), mas a produção nesses tratamentos foi de 58 kg/planta e não diferiu do tratamento controle que produziu 27 kg/planta (Tabela 3.5). Além da variável produção, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos no número de frutos (variou de 0,09 a 0,38 por ramo) e no número de cálices persistentes por ramo, que variou de 5,0 a 8,0 (Tabela 3.5). Os estádios de desenvolvimento nos ramos marcados foram: no dia 0 (50% em R1 e 50% em R2), dia 7 (50% R2 e 50% R3), dia 11 (20% R2, 60% R3 e 20% R4), dia 14 (75% R3 e 25% R4), dia 18 (50% R3 e 50% R4), dia 21 (25% R3, 50% R4 e 25% R5) e dia 28 (30% R4, 60% R5 e 10% R6).

Tabela 3.5 - Efeito dos fungicidas difenoconazole e carbendazim em diferentes intervalos de aplicação no controle da podridão floral durante o período de florescimento em um pomar de laranja 'Pera' no município de Santa Cruz do Rio Pardo na 2009-2010

Trat.	Dias após início do florescimento ^(a)						Flores sintomáticas ^(b)		Cálices persistentes ^(c)	Frutos fixados ^(d)	Produção (kg/planta) ^(e)			
	0	7	11	14	18	21								
T1	Dif ^(f)	Carb		Carb			26,80	b	7,00	NS*	0,21	NS*	49,83	NS*
T2	Dif			Carb			34,89	ab	6,57		0,24		40,96	
T3	Dif		Carb			Carb	26,30	b	4,69		0,26		44,07	
T4	Dif	Carb			Carb		27,41	b	5,39		0,30		40,50	
T5	Dif		Carb		Carb		25,47	b	6,94		0,21		43,77	
T6	Dif				Carb		34,99	ab	6,98		0,26		39,15	
T7	Carb	Dif		Dif			16,51	b	5,68		0,33		51,40	
T8	Carb			Dif			24,09	b	6,99		0,28		39,41	
T9	Carb		Dif			Dif	23,67	b	6,28		0,21		49,08	
T10	Carb	Dif			Dif		14,75	b	5,06		0,38		58,06	
T11	Carb		Dif		Dif		16,23	b	6,60		0,34		47,45	
T12	Carb				Dif		14,03	b	5,35		0,32		58,35	
T13			Controle				65,52	a	8,14		0,09		27,76	

^aAs pulverizações iniciaram-se entre os estádios R1 e R2 do florescimento. ^bPorcentagem de flores sintomáticas por ramo marcado. ^cNúmero médio de cálices persistentes por ramo marcado. ^dNúmero médio de frutos fixados por ramo marcado. ^eProdução média em kg/planta. ^f(Dif)=pulverização de difenoconazole na dosagem de 500 mL de Score[®]/1300 L da água e (Carb)=pulverização de carbendazim na dosagem de 2 L de Derosal[®]/1300 L de água. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS = Não significativo a 5% no teste F.

As chuvas ocorreram nos dias 18, 19, 20 e 24 após início do florescimento, com períodos de molhamento foliar com valores acima de 12-14 horas nos dias das chuvas ou dias subsequentes à ocorrência das mesmas. A temperatura média em praticamente todos os dias foi abaixo de 20°C e a máxima abaixo de 30°C. Alguns dados de período de molhamento e umidade relativa do ar foram perdidos por problemas na estação meteorológica. Períodos com umidade relativa acima de 90% apresentam valores mais próximos aos períodos com molhamento foliar, quando os valores são acima de 12 horas (Figura 3.6).

Figura 3.6 - Variáveis climáticas em Santa Cruz do Rio Pardo durante o florescimento em 2009. Dia 0 (30/07/2009) refere-se à primeira pulverização no estádio R1/R2. (A) Barras representam a precipitação pluviométrica diária (mm) e as linhas representam as temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-). (B) Período de molhamento foliar em horas (barras claras) e horas diárias com umidade relativa do ar (UR) acima de 90% (barras escuras)

No experimento conduzido no município de Taquarituba houve diferenças entre os tratamentos para as variáveis flor sintomática e produção. A porcentagem de flores sintomáticas nos tratamentos T7, T8 e T10 foi menor em relação ao tratamento controle, mas os tratamentos não diferiram significativamente entre si. Apenas o tratamento T7 apresentou diferença em relação a outros tratamentos fungicidas na porcentagem de flores sintomáticas (Tabela 3.6). Entretanto, quando se analisa os dados de produção, os tratamentos T3, T4, T5, T9 e T11 foram os que apresentaram diferenças significativas para o tratamento controle, mas não diferiram entre si. A doença foi mais severa nesta área com 95% de flores sintomáticas no tratamento controle e produção de 6 kg/planta. Tratamentos com porcentagens de flores

sintomáticas acima de 70% não diferiram do tratamento controle (95%). O número de cálices persistentes variou de 7,7 a 10,5 por ramo e o de frutos fixados variou de 0,0 a 0,20 por ramo. A produção foi inferior a 18 kg/planta em todos os tratamentos (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Efeito dos fungicidas difenoconazole e carbendazim em diferentes intervalos de aplicação no controle da podridão floral durante o período de florescimento em um pomar de laranja 'Pera' no município de Taquarituba em 2009/2010

Trat.	Dias após início do florescimento ^(a)						Flores sintomáticas ^(b)	Cálices persistentes ^(c)	Frutos fixados ^(d)	Produção (kg/planta) ^(e)	
	0	7	11	14	18	21					
T1	Dif ^(f)	Carb		Carb			78,71 abc	7,72 NS*	0,09 NS*	12,81 abc	
T2	Dif			Carb			85,58 ab	8,28	0,06	12,25 abc	
T3	Dif		Carb			Carb	88,28 ab	9,01	0,08	14,18 bc	
T4	Dif	Carb			Carb		90,25 ab	7,98	0,14	15,81 bc	
T5	Dif		Carb		Carb		73,58 abc	7,29	0,10	15,50 bc	
T6	Dif				Carb		89,18 ab	8,96	0,09	11,73 abc	
T7	Carb	Dif		Dif			55,31 c	8,95	0,20	13,39 abc	
T8	Carb			Dif			69,32 bc	10,39	0,05	12,10 abc	
T9	Carb		Dif			Dif	85,70 ab	9,00	0,13	15,46 bc	
T10	Carb	Dif			Dif		67,50 bc	9,86	0,13	12,23 abc	
T11	Carb		Dif		Dif		72,15 abc	7,86	0,14	17,82 c	
T12	Carb				Dif		83,93 ab	10,54	0,01	8,41 ab	
T13			Controle				94,88 a	8,67	0,00	6,22 a	

^aAs pulverizações iniciaram-se entre os estádios R1 e R2 do florescimento. ^bPorcentagem de flores sintomáticas por ramo marcado. ^cNúmero médio de cálices persistentes por ramo marcado. ^dNúmero médio de frutos fixados por ramo marcado. ^eProdução média em kg/planta. ^f(Dif)=pulverização de difenoconazole na dosagem de 500 mL de Score®/1000 L da água e (Carb)=pulverização de carbendazim na dosagem de 2 L de Derosal®/1000 L de água. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS = Não significativo a 5% no teste F.

As chuvas foram observadas 1, 15, 16, 17, 18, 21, 32, 33, 35 dias após início do florescimento (Figura 3.7A) onde o número de horas com molhamento foliar e umidade relativa acima de 90% foram sempre acima de 12 horas após ocorrência das chuvas, com destaque para o período entre os dias 16 e 19 onde o molhamento ocorreu por mais de 80 horas sem interrupção (Figura 3.7B). A temperatura média foi em torno de 20°C, a máxima não ultrapassou 30°C e a mínima foi acima de 10°C na maioria dos dias (Figura 3.7A).

Figura 3.7 - Variáveis climáticas em Taquarituba durante o florescimento em 2009. Dia 0 (02/08/2009) refere-se ao estágio R1/R2 no dia da primeira pulverização. (A) Barras representam a precipitação pluviométrica diária (mm) e as linhas representam as temperaturas (°C) máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-). (B) Período de molhamento foliar em horas (barras claras) e horas diárias com umidade relativa do ar (UR) acima de 90% (barras escuras)

3.2.3.3.2 Eficiência de diferentes princípios ativos no controle da doença

Os resultados obtidos nos dois experimentos conduzidos na safra 2009-2010 nos municípios de Santa Cruz do Rio Pardo e Taquarituba encontram-se nas Tabelas 3.7 e 3.8, respectivamente. A mistura fungicida trifloxistrobina + tebuconazole apresentou os melhores resultados nas duas áreas. No tratamento onde foram realizadas quatro pulverizações, houve redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao tratamento controle para a percentagem de flores sintomáticas e número de cálices persistentes por ramo e houve aumento significativo para o número de frutos fixados por ramo e produção (Tabelas 3.7 e 3.8).

Em Santa Cruz do Rio Pardo, três pulverizações com a mistura trifloxistrobina + tebuconazole diferiu do tratamento controle para as quatro variáveis analisadas. A mistura ciprodinil + fludioxonil em quatro pulverizações não diferiu do tratamento controle apenas para o número de cálices persistentes e em três pulverizações diferiu do controle apenas para a variável flor sintomática. O fungicida difenoconazole diferiu do tratamento controle apenas para o número de frutos fixados e produção. O carbendazim em quatro pulverizações diferiu do controle apenas para a variável produção (Tabela 3.7).

No tratamento controle a porcentagem de flores sintomáticas foi de 50%, mas apenas tratamentos com valores inferiores a 15% apresentaram diferenças significativas em relação a este. Houve retenção de 6 cálices por ramo no tratamento controle que diferiu apenas dos tratamentos com valores abaixo de 1,75 cálices retidos por ramo. O tratamento controle apresentou valor de 0,13 frutos fixados/ramo e diferiu dos tratamentos com valores acima de 0,51 frutos fixados/ramo. A produção no tratamento controle foi de 30 kg/planta e diferiu dos tratamentos que apresentaram valores acima de 52 kg/planta (Tabela 3.7). Para todos os tratamentos onde foram realizadas apenas a primeira e a segunda pulverização dos fungicidas (misturas ou puros), não houve diferenças em relação ao tratamento controle para nenhuma das variáveis (Tabela 3.7).

As chuvas ocorreram nos dias 18, 19, 20 (entre as terceira e quarta pulverizações) e 24 (após a quarta pulverização), com molhamentos foliares com valores acima de 12-14 horas nos dias das chuvas ou dias subsequentes à ocorrência das mesmas. A temperatura média em praticamente todos os dias esteve abaixo de 20°C e a máxima abaixo de 30°C. Máxima e mínima próximas de 20°C foram observadas em dias chuvosos (Figura 3.6).

Tabela 3.7 - Efeito de diferentes fungicidas, em duas, três ou quatro pulverizações em intervalos de sete dias, no controle da podridão floral dos citros durante o período de florescimento em um pomar de laranja 'Pera' no município de Santa Cruz do Rio Pardo em 2009

Tratamentos	Dias após início do florescimento ^a				Flores sintomáticas ^(b)	Cálices persistentes ^(c)	Frutos fixados ^(d)	Produção (kg/planta) ^(e)
	0	7	14	21				
Difenoconazole	^f (+)	+	-	-	45,97 abc	8,10 a	0,16 ab	34,72 ab
Difenoconazole	+	+	+	-	26,30 abcd	4,78 abc	0,35 abc	40,93 abc
Difenoconazole	+	+	+	+	23,79 bcd	4,74 abc	0,51 bcd	52,74 bcd
Carbendazim	+	+	-	-	58,72 a	6,59 ab	0,29 abc	32,96 ab
Carbendazim	+	+	+	-	31,02 abcd	5,19 abc	0,40 abc	44,06 abc
Carbendazim	+	+	+	+	21,84 bcd	3,23 bcd	0,48 abc	61,48 cd
Trifloxistrobina + tebuconazole	+	+	-	-	23,08 bcd	4,67 abc	0,37 abc	46,50 abc
Trifloxistrobina + tebuconazole	+	+	+	-	4,24 d	1,75 cd	0,56 cd	71,92 de
Trifloxistrobina + tebuconazole	+	+	+	+	3,07 d	0,90 d	0,89 d	87,71 e
Fludioxonil + ciprodinil	+	+	-	-	47,14 abc	7,93 a	0,28 abc	29,42 a
Fludioxonil + ciprodinil	+	+	+	-	15,37 cd	3,99 bcd	0,49 abc	39,02 ab
Fludioxonil + ciprodinil	+	+	+	+	8,39 d	3,44 bcd	0,63 cd	53,33 bcd
Controle	-	-	-	-	50,15 ab	6,45 ab	0,13 a	30,11 a

^aAs pulverizações iniciaram-se entre os estádios R1 e R2 do florescimento. ^bPorcentagem de flores sintomáticas por ramo marcado. ^cNúmero médio de cálices persistentes por ramo marcado. ^dNúmero médio de frutos fixados por ramo marcado. ^eProdução média em kg/planta. ^f(+) = Pulverização com o respectivo fungicida e, (-) = não foi realizada pulverização com fungicida. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No experimento conduzido em Taquarituba, onde a doença apresentou maior incidência (92%) em relação ao experimento de Santa Cruz do Rio Pardo (50%) (Tabela 3.7), a eficiência dos fungicidas foi menor, mas a mistura trifloxistrobina + tebuconazole também apresentou os melhores resultados para o controle da PFC (Tabela 3.8). Houve redução na porcentagem de flores sintomáticas em relação ao tratamento controle para os tratamentos onde foram realizadas três ou quatro pulverizações de trifloxistrobina + tebuconazole ou ciprodinil + fludioxonil ou quatro pulverizações de difenoconazole. Para o número de cálices persistentes, houve redução em relação ao tratamento controle apenas no tratamento onde foram realizadas quatro pulverizações de trifloxistrobina + tebuconazole. Aumento no número de frutos fixados por ramo em relação ao tratamento controle também foi observado apenas no tratamento com quatro pulverizações de trifloxistrobina + tebuconazole. A produção foi maior nos tratamentos onde se realizaram três ou quatro pulverizações da mistura trifloxistrobina +

tebuconazole ou carbendazim, sendo que quatro pulverizações da mistura proporcionaram uma maior produção em relação dos demais tratamentos (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 - Efeito de diferentes fungicidas, em duas, três ou quatro pulverizações em intervalos de sete dias, no controle da podridão floral dos citros durante o período de florescimento em um pomar de laranja 'Pera' no município de Taquarituba em 2009

Tratamentos	Dias após início do florescimento ^(a)				Flor sintomática ^(b)	Cálices persistentes ^(c)	Frutos fixados ^(d)	Produção (kg/planta) ^(e)
	0	7	14	21				
Difenoconazole	^(f) +	+	-	-	88,14 a	10,35 a	0,04 a	7,38 ab
Difenoconazole	+	+	+	-	68,21 abc	9,33 abc	0,06 a	13,67 abc
Difenoconazole	+	+	+	+	56,19 bcd	8,76 abcd	0,08 a	15,24 abc
Carbendazim	+	+	-	-	84,92 ab	7,91 abcd	0,08 a	7,66 ab
Carbendazim	+	+	+	-	71,16 abc	6,29 bcd	0,16 a	17,92 bc
Carbendazim	+	+	+	+	77,44 ab	7,58 abcd	0,20 ab	22,95 c
Trifloxistrobina + tebuconazole	+	+	-	-	69,56 abc	10,00 a	0,11 a	10,31 abc
Trifloxistrobina + tebuconazole	+	+	+	-	33,19 d	5,91 cd	0,23 ab	20,71 c
Trifloxistrobina + tebuconazole	+	+	+	+	27,14 d	5,51 d	0,53 b	40,69 d
Fludioxonil + ciprodinil	+	+	-	-	81,47 ab	10,95 a	0,00 a	3,96 a
Fludioxonil + ciprodinil	+	+	+	-	36,35 d	9,99 a	0,00 a	7,36 ab
Fludioxonil + ciprodinil	+	+	+	+	46,50 cd	9,68 ab	0,10 a	13,00 abc
Controle	-	-	-	-	92,23 a	9,22 abc	0,01 a	5,78 ab

^aAs pulverizações iniciaram-se entre os estádios R1 e R2 do florescimento. ^bPorcentagem de flores sintomáticas por ramo marcado. ^cNúmero médio de cálices persistentes por ramo marcado. ^dNúmero médio de frutos fixados por ramo marcado. ^eProdução média em kg/planta. ^f(+) = Pulverização com o respectivo fungicida e, (-) = não foi realizada pulverização com fungicida. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A temperatura média foi em torno de 20°C (Figura 3.7A). Chuvas sequenciais ocorreram entre as terceira e quarta pulverizações, aproximadamente 9 dias após a segunda pulverização e se repetiram 11 dias após a quarta pulverização. Nos tratamentos onde foram realizadas apenas a primeira (dia 0) e segunda (dia 7) pulverizações, não houve diferenças em relação ao tratamento controle para nenhuma variável avaliada (Tabela 3.8), e neste período foi observado apenas uma chuva (dia 1) com molhamento foliar de 16 horas (Figura 3.7A e 3.7B), quando os botões ainda estavam verdes fechados.

A produção das plantas no tratamento onde se utilizou a mistura trifloxistrobina + tebuconazole em quatro pulverizações em Santa Cruz do Rio Pardo e Taquarituba apresentou um incremento de 191 e 604%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (sem pulverização). Três pulverizações da mistura ou quatro de carbendazim comparados com o tratamento controle apresentaram incrementos semelhantes nas faixas de 104-139% e 258-297%, para as duas fazendas, respectivamente. Em Santa Cruz do Rio Pardo, quatro pulverizações de difenoconazole ou da mistura ciprodinil + fludioxonil proporcionaram um incremento de 77 e 75% na produção em relação ao controle (Tabelas 3.7 e 3.8).

3.2.3.3.3 Controle químico da doença baseado em condições climáticas e nos estádios de desenvolvimento das flores

Condições favoráveis à infecção ocorreram apenas no talhão de laranja 'Pera' no município de Taquarituba (Tabela 3.9). Nesta fazenda, após as chuvas de 14,8 e 2,6 mm, que ocorreram nos primeiros dias do florescimento (dias 0 e 1), o clima voltou a ficar seco com molhamento foliar abaixo de 12 horas durante todo o florescimento (Figura 3.8). Nos tratamentos onde não foram realizadas pulverizações, a porcentagem de flores sintomáticas foi inferior a 5%, nos demais tratamentos a doença não ocorreu ou apresentou níveis em torno de 1%. O número de cálices persistentes e frutos fixados por ramo não diferiram entre os tratamentos (Tabela 3.9). A primeira pulverização foi realizada quando os botões ainda estavam verdes e fechados (estádios R1/R2) (ANEXO), já a segunda pulverização foi realizada após 10 dias (maioria dos botões em estágio R3) e a terceira pulverização seguiu o calendário da fazenda e foi realizada também com intervalo de 10 dias após a segunda (Tabela 3.9), com botões em estágio R4/R5. O clima estava muito seco e as temperaturas relativamente baixas (Figura 3.8), com desenvolvimento lento dos botões florais, descartando a quarta pulverização no sistema calendário da fazenda.

Tabela 3.9 - Eficiência dos diferentes esquemas de pulverização no controle da podridão floral dos citros durante o período de florescimento em um pomar de laranja 'Pera' no município de Taquarituba na safra 2010-2011

Tratamentos	Dias após início do florescimento ^(a)				Flores sintomáticas ^(b)	Cálices persistentes ^(c)	Frutos fixados ^(d)
	0	10	20	30			
Sistema calendário (fazenda)	+(^e)	+	+	-	0,00 b	0,71 ^{NS}	0,49 ^{NS}
Sistema proposto A	+	-	-	-	0,57 b	0,60	0,35
Sistema proposto B	+	-	-	-	1,24 b	0,76	0,30
Controle/PFD-FAD/Sistema C	-	-	-	-	4,23 a	1,04	0,42

^aAs pulverizações iniciaram-se entre os estádios R1 e R2 do florescimento. ^bPorcentagem de flores sintomáticas por ramo. ^cNúmero médio de cálices persistentes por ramo. ^dNúmero médio de frutos fixados por ramo. ^e(+) = Pulverização de trifloxistrobina + tebuconazole na dosagem de 80 + 160g(i.a.)/ha (800 mL de Nativo[®]) e (-) = não foi realizada pulverização com fungicida. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após a ocorrência de chuva nos dias 0 e 1, o período de molhamento foi de 24 e 18 horas, respectivamente, pois a chuva teve início na tarde do dia 0 e prolongou-se até o dia 1. Desta forma, as condições foram favoráveis para a ocorrência de infecção, mas entre os dias 2 e 8 a condição foi de umidade baixa com registros de no máximo uma hora de molhamento diário, que nos demais dias, esteve sempre abaixo de 12 horas. No início do florescimento a amplitude térmica foi menor em relação ao restante do período (Figura 3.8).

Figura 3.8 - Variáveis climáticas em Taquarituba durante o florescimento em 2010. Dia 0 (02/08/2010) refere-se ao estágio R1/R2 onde foi realizada a primeira pulverização no sistema calendário da fazenda. Barras claras representam o período de molhamento foliar (em horas) e as escuras representam a precipitação pluviométrica diária (mm). As linhas representam as temperaturas máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-)

Para os demais talhões, dois de laranja ‘Valência’ e um de laranja ‘Pera’ não foram observados sintomas em flores em nenhum tratamento. As condições ambientais foram desfavoráveis, mas as plantas do tratamento que seguiam o sistema calendário da fazenda foram pulverizadas três vezes. A primeira pulverização iniciou-se quando as plantas estavam com os botões florais no estágio ainda verdes e fechados. As demais pulverizações foram realizadas a cada 10 dias e não a cada 7 dias como nos anos anteriores, devido ao desenvolvimento lento dos botões florais influenciados principalmente pelas baixas temperaturas observadas nas duas primeiras semanas de florescimento em Taquarituba (Figura 3.8) e em Santa Cruz do Rio Pardo (Figura 3.9). As temperaturas e a duração do período de molhamento foliar para o município de Santa Cruz do Rio Pardo (Figura 3.9) foram similares às observadas anteriormente para o município de Taquarituba (Figura 3.8). Os períodos de molhamento foram inferiores a 12 horas durante todo o florescimento com ausência de chuvas, inviabilizando a ocorrência de infecções de *C. acutatum* e posterior expressão de sintomas (Figura 3.9).

Figura 3.9 - Variáveis climáticas em Santa Cruz do Rio Pardo durante o florescimento em 2010. Dia 0 (01/08/2010) refere-se ao estágio R1/R2 onde foi realizada a primeira pulverização no tratamento da fazenda. Não foi registrado chuvas no período. Barras representam o molhamento foliar (horas). Temperatura máxima (-▲-), média (-■-) e mínima (-◆-)

3.2.3.4 Elaboração de uma função de dano para a podridão floral dos citros

Para todos os experimentos conduzidos em 2008-2009 e 2009-2010 nos dois municípios, a redução na produção esteve associada ao aumento na porcentagem de flores sintomáticas. Para alguns experimentos a relação entre produção e cálices persistentes não foi significativa e o coeficiente de determinação relativamente baixo (dados não mostrados). O modelo exponencial negativo se mostrou melhor para descrever a relação entre produção e flores sintomáticas, com valores coeficientes de determinação variando de 0,07 a 0,39. A produção em Santa Cruz do Rio Pardo na ausência da doença foi estimada pelo modelo exponencial negativo em 41,74 kg/planta na área 1 e em 58,82 e 73,12 Kg/planta nas áreas 2 e 3. Em Taquarituba foi estimada em 24,51 e 33,67 kg/planta, nas áreas 4 e 5, respectivamente (dados não mostrados).

Houve correlação significativa entre a produção relativa e flores sintomáticas para as cinco áreas e não houve diferenças significativas entre os valores do parâmetro b (0,008 a 0,017) para as estimativas das curvas de produção relativa onde o intercepto (a) foi estimado como 100 (Tabela 3.10). Os coeficientes de determinação (R^2) apresentaram valores entre 0,07 e 0,43, mas todas as equações foram significativas ($p < 0,01$).

Tabela 3.10 - Coeficiente de determinação (R^2) e os parâmetros a e b e seus respectivos erros estimados pela equação exponencial negativa para os dados de produção relativa dos cinco experimentos realizados em Santa Cruz do Rio Pardo e Taquarituba nas safras 2008-2009 e 2009-2010

Áreas	R^2	a	erro a	b	erro b
1	0,11	100	4,91	-0,012	0,005
2	0,30	99,99	6,37	-0,010	0,002
3	0,43	99,99	6,84	-0,017	0,003
4	0,07	97,76	6,46	-0,008	0,004
5	0,30	99,99	17,61	-0,015	0,003

*Experimento com diferentes intervalos de aplicação (área 1 em 2008-2009 e áreas 2 e 4 em 2009-2010) e diferentes princípios ativos (áreas 3 e 5 em 2009-2010) realizados em Santa Cruz do Rio Pardo (áreas 1, 2 e 3) e em Taquarituba (áreas 4 e 5).

Os dados agrupados de produção relativa das cinco áreas encontram-se na Figura 3.10. A relação entre produção (y) e flor sintomática (x) foi expressa pela equação exponencial negativa estimada para os dados agrupados, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,43. Nota-se que na curva estimada por este modelo, mesmo quando se tem 100% de incidência há produção de frutos nas plantas em torno de 25%, embora em algumas plantas o valor tenha chegado próximo a zero (Figura 3.10).

Figura 3.10 - Produção relativa (proporção) em função da porcentagem de flores sintomáticas. Pontos representam as estimativas de produção em função da porcentagem de flores sintomáticas em cada parcela nas diferentes áreas experimentais. Linha contínua representa a estimativa dos dados em conjunto dos cinco experimentos, conduzidos em 2008-2009 e 2009-2010 em laranja 'Pera' com 17-20 anos, ajustados ao modelo exponencial negativo

3.2.4 Discussão

Neste estudo, os valores de CE_{50} do fungicida difenoconazole foram estabelecidos para os isolados de *C. acutatum* de diferentes regiões do Estado de São

Paulo, mas não foi possível calcular a CE_{50} para o carbendazim pelo fato do mesmo apresentar um crescimento similar em altas e baixas concentrações. Não foi encontrado nenhum isolado com crescimento distinto dos demais dentro de cada população e também não foi verificada diferença de sensibilidade entre população não-exposta (população baseline) e populações expostas aos dois fungicidas. *C. acutatum* foi altamente sensível ao fungicida difenoconazole com CE_{50} na faixa de 0,07-0,14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As CE_{50} encontradas para as diferentes populações de *C. acutatum* de citros neste trabalho são próximas a 0,156 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ encontrada para este fungicida com isolados de *C. acutatum* de morango relatadas por Freeman et al. (1997).

Goes e Kimati (1998) e Peres et al. (2002) utilizando benomil encontraram o mesmo padrão de redução das colônias de *C. acutatum* relatados aqui para o carbendazim em baixas e altas concentrações. Deste modo, benomil e carbendazim apresentam efeito similar sobre *C. acutatum in vitro* sendo que concentrações de 500 ou 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de benomil ou carbendazim inibem em torno de 50-60% do crescimento micelial deste fungo. Peres et al. (2004) não encontraram alterações de aminoácidos na β -tubulina de todos os isolados de *C. acutatum*. Vale ressaltar que, alguns anos depois, foi demonstrado que o mecanismo de resistência de *C. acutatum* aos benzimidazóis não está associado a essas alterações de aminoácidos na β -tubulina (NAKAUNE; NAKANO; 2007).

Segundo Mondal et al., (2005) um alto número de isolados pode ser necessário para detectar a resistência a fungicidas de *C. acutatum* em citros. Esta detecção se torna mais difícil pelo fato da PFC expressar sintomas apenas em flores restringindo a coleta de isolados e também pelo fato desta espécie apresentar uma insensibilidade moderada e natural aos benzimidazóis. Já a resistência aos triazóis pode ser difícil de ser detectada por ocorrer através de mudanças incrementais em tolerância na população. Desta forma, mesmo não sendo encontrada alteração na sensibilidade para estes isolados de *C. acutatum* aos fungicidas, o monitoramento da resistência deve ser realizado com frequência em áreas onde estes fungicidas são muito utilizados nos programas de pulverização e, estratégias anti-resistência descritas por Brent (1995), sempre que possível, devem ser adotadas.

Em casa-de-vegetação, a mistura fungicida (trifloxistrobina + tebuconazole) foi mais eficiente que o carbendazim na redução de flores sintomáticas, principalmente quando utilizada 48 horas após a inoculação, sendo promissora para uso no controle da doença no campo. Efeito de fungicida em pós-inoculação também foi observado por Peres et al. (2002), onde o benomil (benzimidazol) foi eficaz quando aplicado até 48 horas após a inoculação de *C. acutatum* em mudas de citros. Turechek, Peres e Werner (2006) observaram efeitos da estrobirulina (piraclostrobina) aplicada 24 horas após a inoculação de *C. acutatum* em plantas de morango para controle da flor preta.

Os resultados obtidos em casa-de-vegetação para formação de cálices persistentes e frutos fixados foram muito variáveis (dados não mostrados). No trabalho de inoculação em casa-de-vegetação realizado por Goes e Kimati (1997) também houve grande variação quando se inoculou *C. acutatum* com a porcentagem de cálices persistentes variando de 18 a 40%. Esses autores também não encontraram correlação entre flores sintomáticas e cálices persistentes e entre flores sintomáticas e número de frutos efetivos. Portanto, a avaliação de frutos fixados e cálices persistentes em plantas novas mantidas em vasos não são boas variáveis para se avaliar a doença e comparar tratamentos principalmente quando analisadas isoladamente.

A mistura trifloxistrobina + tebuconazole foi a que apresentou melhores resultados nos ensaios de campo em Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo. Nas duas fazendas as chuvas ocorreram após a terceira pulverização. Portanto, as duas primeiras pulverizações foram desnecessárias uma vez que a aplicação das mesmas não proporcionou redução significativa da doença, nem aumento na produção em relação ao tratamento sem pulverizações. A terceira pulverização que foi realizada no início das chuvas apresentou efeito em alguns tratamentos e foi essencial para evitar o início da epidemia na área, uma vez que as flores estavam nos estádios mais críticos (expansão das pétalas e abertura das flores). Entretanto, a quarta pulverização dos fungicidas, exceto da mistura trifloxistrobina + tebuconazole, foi necessária para o controle da doença nas duas áreas, pois ocorreram chuvas após as terceira e quarta pulverizações. Assim como em casa-de-vegetação, a mistura (triazol + estrobirulina) foi mais eficiente no controle da podridão floral no campo.

O carbendazim começou a ser utilizado principalmente após a proibição de uso do benomil e tem sido recomendado juntamente com o folpet e o difenoconazole para o controle da PFC no Brasil, mas esses produtos apresentam resultados variáveis nos diferentes ensaios de campo (GOES et al., 2008). Na literatura existem poucos trabalhos relacionados ao efeito do carbendazim em comparação ao benomil. Agostini, Heberle e Morón (1995) mencionaram que na Argentina os dois compostos controlaram a PFC reduzindo o número de cálices e aumentando o número de frutos, embora o benomil tenha sido mais eficiente.

O carbendazim em duas, três ou quatro pulverizações não diferiu do tratamento controle na redução de sintomas em pétalas nos experimentos no campo nos dois municípios, mas o tratamento com quatro pulverizações conferiu maior produtividade em relação ao tratamento controle nas duas áreas. Portanto, este produto apresenta algum efeito benéfico à planta, contribuindo para minimizar os danos causados pela doença, mesmo sem um bom controle da mesma. Goes e Kimati (1998) mencionaram que o benomil (benzimidazol) não apresentou bom controle de *C. acutatum in vitro* (40 a 60%), conforme foi visto aqui para o carbendazim (outro benzimidazol), mas esses autores acreditam que no campo o benomil tem sido eficiente para o controle da podridão floral devido a uma atividade hormonal ou pela inibição da produção de cutinase. O benomil em solução aquosa é hidrolisado e forma carbendazim e n-butilisocianato, o que explicaria o efeito similar ao carbendazim *in vitro* e no campo.

A mistura trifloxistrobina + tebuconazole tem registro recente no Brasil para controle de *C. acutatum* em citros e a mistura ciprodinil + fludioxonil ainda não tem registro para citros. Esta mistura estrobirulina + triazol começou a ser avaliada no campo em 2009/2010 para o controle da doença, portanto, não há trabalhos comparando seu uso com outros produtos recomendados para o controle da PFC como os benzimidazóis e outros grupos. Novos trabalhos são necessários visando confirmar a efetividade desta mistura em outras variedades, intervalos de aplicação, volumes de calda e dose de aplicação. Vale ressaltar que a mistura triazol + estrobirulina apresentou resultados bem superiores aos encontrados para os produtos mais utilizados e recomendados para o controle da PFC em duas áreas com histórico de

ocorrência da PFC, em ano com condições climáticas muito favoráveis para a ocorrência da doença e em variedade com florescimento desuniforme.

Neste trabalho foi estimada uma função de dano para a doença através da correlação entre sintomas em flores e produção apenas em pomares de laranja 'Pera' com idades em torno de 17-20 anos. Não é aconselhável fazer extrapolações para outras regiões com condições climáticas distintas e também para outras variedades, principalmente aquelas com florescimento mais uniforme. Para Bergamin Filho et al. (1995) estudos relacionados a danos recebem críticas uma vez que desconsideram a importância do hospedeiro. Desta forma, a função dano-doença pode nos auxiliar no momento de definir uma pulverização, uma vez que a porcentagem de flores sintomáticas nos fornece a estimativa de uma possível perda na produção. Laranjeira (2006) menciona que embora seja útil, a quantificação de danos é escassa principalmente para a cultura dos citros. Para a cultura dos citros se torna mais difícil estabelecer uma relação entre dano e doença uma vez que a produção das plantas é muito variável (Ye et al., 2008). No entanto, Gonçalves (2010) para a clorose variegada dos citros (CVC) e Bassanezi et al. (2011) para o huanglongbing (HLB) conseguiram estabelecer relações entre produção de citros e intensidade de doença por meio da equação exponencial negativa.

Denham e Waller (1981) relataram que os cálices persistentes seriam a melhor forma de se avaliar a eficiência de fungicidas, pois seriam sintomas diretos da doença, uma vez que as variáveis frutos fixados e produção podem ser influenciadas por outros fatores. Vale ressaltar que a formação dos cálices persistentes se dá normalmente pela alteração na produção de hormônios (LAHEY et al., 2004; LI et al., 2003) e também está sujeita a alterações causadas por outros fatores, já que em alguns ramos com muitos cálices persistentes pode-se observar frutos fixados. Não foi obtida aqui uma boa correlação entre cálices persistentes e produção nos experimentos de campo. Agostini, Haberle e Morón (1995) e Timmer et al. (1994) também mencionaram não haver correlação significativa entre cálices persistentes e produção devido a diferentes fatores envolvidos com a produção. Por outro lado, uma estimativa foi feita por Timmer e Zitko (1995), onde seriam perdidos de 5 a 6 frutos a cada 100 cálices persistentes.

Desta forma, a eficácia de fungicidas no controle da doença seria mais bem representada pela análise conjunta de sintomas em pétalas, cálices persistentes, frutos fixados e produção, selecionando-se sempre pomares com plantas mais uniformes.

Uma das dificuldades no controle da PFC no Brasil decorre do fato de ser necessário fazer as pulverizações em extensas áreas em curto período de tempo. A doença apresenta incrementos maiores principalmente no momento da expansão das pétalas e abertura das flores, período onde são evidenciados os sintomas típicos. Desta forma, é recomendável fazer uso de diferentes produtos durante a safra e direcionar os mais eficientes, como a mistura triazol + estrobirulina, para esses momentos mais críticos.

Há alguns anos Timmer (1999) relatou que 3 a 5 pulverizações seriam necessárias para proteção de citros contra os patógenos fúngicos em geral, uma vez que todas as doenças não ocorrem concomitantemente numa mesma área. Este autor menciona que o aumento do conhecimento contribuiria para reduzir o número de aplicações de fungicidas e melhorar o controle das doenças. Atualmente, no Estado de São Paulo, um número alto de aplicações de fungicidas tem sido utilizado para controle da PFC, chegando até a sete pulverizações. Com a distribuição da pinta preta dos citros, causada por *Guignardia citricarpa*, por todo o estado, são realizadas de duas a seis pulverizações após o florescimento. Em algumas áreas, dependendo das condições climáticas e da quantidade de inóculo das doenças, o controle das doenças fúngicas é realizado com mais de 10 pulverizações. Desta maneira, o cenário atual não é muito otimista.

No Estado de São Paulo o controle das doenças fúngicas deve ser planejado e realizado em conjunto, principalmente da podridão floral e da pinta preta, uma vez que para o controle de *C. acutatum* e *G. citricarpa* os produtos mais eficientes incluem os benzimidazóis e as estrobirulinas, aplicados durante o florescimento e a frutificação. Para a PFC esses fungicidas são recomendados em conjunto com ftalimidas ou triazóis e para a pinta preta juntamente com os cúpricos ou ditiocarbamatos. A utilização dos cúpricos é essencial nas primeiras pulverizações para o controle da pinta preta, pois

são eficazes no controle da verrugose e melanose (outras doenças dos citros de etiologia fúngica).

É importante realizar a rotação de grupos químicos de fungicidas e não repetir mais de duas vezes por safra o mesmo grupo químico (com mecanismo de ação) (BRENT, 1995). O número de produtos disponíveis para o controle destas doenças com diferentes mecanismos de ação é baixo e a necessidade de pulverização em alguns anos é alta, o que contribui para aumentar a probabilidade de seleção de populações de patógenos resistentes a fungicidas. Desta forma, a preocupação na escolha dos produtos deve começar no florescimento e terminar nas etapas posteriores da frutificação e, deve-se fazer uso de outras estratégias de manejo em conjunto com o controle químico.

Uma das estratégias a ser adotada visando à redução no número de pulverizações é a realização das mesmas baseadas em um sistema de previsão. Os trabalhos realizados aqui com o intuito de propor o uso de um sistema de previsão simplificado, baseado apenas nas condições climáticas (período de molhamento foliar associado às chuvas) e estágio de desenvolvimento das flores, foram realizados no ano de 2010, que por sua vez foi um ano muito seco. Em três dos quatro experimentos realizados na região sudoeste do estado, a mais vulnerável a ocorrência de epidemias da podridão floral, não houve condição favorável para a ocorrência da doença durante o florescimento. Nenhuma ou apenas uma pulverização foi recomendada nesses casos pelo sistema PFD-FAD e pelos sistemas simplificados propostos. Por outro lado, no sistema calendário foram realizadas três pulverizações durante o florescimento, pulverizações estas desnecessárias e utilizadas na maioria dos talhões.

No florescimento de 2009 a doença ocorreu de forma generalizada no Estado de São Paulo, mas em 2010, mesmo com uma possível presença de inóculo remanescente do ano anterior, a doença não ocorreu mesmo em pomares mais velhos considerados mais críticos devido ao maior acúmulo de inóculo ao longo dos anos. Desta maneira, seria recomendável desconsiderar o fator inóculo do ano anterior utilizado pelo Sistema de previsão PFD-FAD, onde os cálices persistentes são utilizados para representar a presença do fungo na área. Os cálices persistentes devem

ser utilizados para caracterizar se a área é crítica ou não a ocorrência da podridão floral.

O molhamento foliar foi utilizado como a principal variável a ser correlacionada com a doença nos sistemas propostos aqui, ou seja, se houver uma chuva rápida e o período de molhamento não for prolongado, não será necessário pulverizar. Por outro lado, considerando-se que sem a ocorrência de chuvas dificilmente haverá período de molhamento acima de 16 horas na maioria das áreas no Estado de São Paulo, a recomendação de pulverização neste caso sempre estará associada à ocorrência de chuvas com prolongamento do período de molhamento.

Para a podridão floral seria recomendado utilizar o sistema de previsão em anos sem ocorrência de chuvas ou com ocorrência de poucas chuvas durante o florescimento. Vale ressaltar que epidemias da doença são esporádicas e não causam danos severos em todos os anos em todas as regiões do Estado de São Paulo. Sendo assim, um sistema de previsão simplificado, baseado em poucas informações, pode contribuir para redução das pulverizações nos anos desfavoráveis para a ocorrência da doença como foi em 2010. Para anos muito chuvosos como foi o de 2009, seria muito arriscado utilizar qualquer sistema e o ideal seria realizar pulverizações a cada 7-10 dias, dependendo do desenvolvimento das flores. Essas recomendações para citros são similares às feitas por Arauz (2000), onde o mesmo preconiza que o uso dos sistemas de previsão para antracnose em manga deve ser adotado nas épocas secas onde as chuvas são esporádicas, mas na estação chuvosa a melhor estratégia seria o uso do calendário de pulverizações.

Coakley (1988) mencionou que para se validar a utilização de um sistema de previsão são precisos no mínimo 8-12 anos de dados obtidos em condições de campo em diferentes condições climáticas e recomenda analisar com cautela o uso dos dados obtidos em experimentos realizados com poucos anos de avaliação. Sendo assim, este sistema deve continuar sendo avaliado no campo até que esteja acurado e preciso, facilitando sua aceitação pelos citricultores.

3.3 Conclusões

As populações de *C. acutatum* amostradas no Estado de São Paulo não apresentaram resistência aos fungicidas carbendazim e difenoconazole.

A mistura fungicida trifloxistrobina + tebuconazole e o carbendazim têm efeito protetor e curativo no controle de *C. acutatum* em casa-de-vegetação, no entanto a mistura é mais eficiente.

No campo, a mistura trifloxistrobina + tebuconazole é mais eficiente que os demais fungicidas no controle de *C. acutatum*. Portanto, o esquema atual de pulverização com a utilização da primeira aplicação de difenoconazole e duas posteriores de carbendazim não é o mais eficiente.

A relação entre flores sintomáticas e produção em pomares de laranja 'Pera' é bem representada pelo modelo exponencial negativo.

Referências

AGOSTINI, J.P.; HABERLE, T.J.; MORÓN, P.P. El *Colletotrichum* Y La caída prematura de frutas em la citricultura Del Alto Parana, Misiones, Argentina. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 97-106, 1995.

AGUSTI, M.; ZARAGOZA, S.; BLEIHOLDER, H.; BUHR, L.; HACK, H.; KLOSE, R.; STAUB, R. The BBCH scale for describing phenological stages in citrus development. In: INTERNACIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 9., 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society of Citriculture, 2000. p. 445-446.

ARAUZ, L.F. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 600-611, 2000.

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; GASPAROTO, M.C.G.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivar in São Paulo State, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, em prelo, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://www.extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 fev. 2011.

BRENT, K.J. Detection and monitoring of resistant forms: an overview. In: _____. **Pesticide resistance-strategies and tactics for management**. Washington: National Academic Press, 1986. p. 298-312.

_____. Monitoring for fungicide resistance. In: DELP, C.J. (Ed.). **Fungicide resistance in North America**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1994.p. 9-11.

_____. **Fungicide resistance in crop pathogens: how it can be managed?** Brussels: GCPF, 1995. 54p. (FRAC Monograph 1).

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Sistemas de previsão e avisos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 627-646.

BERGAMIN FILHO, A.; LOPES, D.B.; AMORIM, L.; GODOY, C.V. Avaliação de danos causados por doenças de plantas. **Revisão anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 3, p. 133-184, 1995.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. Forecasting plant diseases. In: _____. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. p. 423-452.

CHUNG, W.H.; ISHII, H.; NISHIMURA, K.; FUKAYA, M.; YANO, K.; KAJITANI, Y. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 506-512, 2006.

COAKLEY, S.M. Variation in climate prediction of disease in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 163-181, 1988.

DENHAM, T.G. Postbloom fruit drop disease. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1988. p. 24-25.

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

DE WAARD, M.A.; GEORGOPOULOS, S.G.; HOLLOMON, D.W.; ISHII, H.; LEROUX, P.; RAGSDALE, N.N.; SCHWINN, F.J. Chemical control of plant diseases: problems and Prospects. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 403-421, 1993.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial/ ground spraying. **Turrialba**, Turrialba, v. 34, p. 179-186, 1984.

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

_____. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 109-28, 1994.

FEICHTENBERGER, E.; SPOSITO, M.B. 2000. Fungicide treatments for control of Postbloom fruit drop of citrus (*Colletotrichum acutatum*) in 'Pera' sweet orange trees. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: Proceedings of International Society of Citriculture, 2000. p.145.

FEICHTENBERGER, E.; SANTOS, J.M.F.; SPÓSITO, M.B. Pulverizações em baixo volume no controle das principais doenças fúngicas dos citros. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v.13, n. 74, p. 12-15, 2010.

FREEMAN, S.; NIZANI, Y.; DOTAN, S.; EVEN, S.; SANDO, T. Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse, and field conditions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 749-752, 1997.

FRY, W. E. **Principles of plant disease management**. New York: Academic Press 1982, 378 p.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e de *C. gloeosporioides*, obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 10-14, 1997.

_____. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos: resistente ou insensível ao benomyl? **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 246-253, 1998.

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

GONÇALVES, F.P. **Progresso poliético e quantificação de danos da clorose variegada dos citros em laranjeiras 'Natal' submetidas a déficits hídricos**. 2010. 120 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

KENDALL, S.; HOLLOMON, D.W.; ISHII, H.; HEANEY, S.P. Characterization of benzimidazole-resistant strains of *Rhynchosporium secalis*. **Pesticide Science**, New York, v. 40, n. 3, p. 175-181, 1994.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 692-709.

KOENRAADT, H.; SOMERVILLE, S.C.; JONES, A.L. Characteristics of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 1348-1354, 1992.

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

LARANJEIRA, F.F. Quantificação de danos causados por doenças em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 27, n. 1, p. 131-146, 2006.

LI, W.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K.R. Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, p. 578-583, 2003.

MONDAL, S.N.; BHATIA, A.; SHILTS, T.; TIMMER, L.W. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p.1186-1194, 2005.

NAKAUNE, R.; NAKANO, M. Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of beta-tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein CaBEN1. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 44, p.1324-1335, 2007.

PERES, N.A.R. **Modelo de previsão e controle da podridão floral dos citros causada por *Colletotrichum acutatum***. 2002. 113 p. Tese (Doutorado em Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho", Botucatu, 2002.

PERES, N.A.R.; DEWDNEY, M. M. **Postbloom fruit drop. 2011 Florida Citrus Pest Management Guide**. Gainesville: University of Florida Cooperative Extension Service, IFAS, 2011. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 03 fev. 2011.

PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop in Brazil and Florida: occurrence and control by fungicides. In: INTERNACIONAL SOCIETY CITRICULTURE, 9., 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society Citriculture, 2000. p. 1051-1052.

PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; FURTADO, E.L.; TIMMER, L.W. Evaluation of systems for timing of fungicide sprays for control of postbloom fruit drop of citrus in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 731-735, 2004.

PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; ZITKO, S.E.; TIMMER, L.W. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 6, p. 620-624, 2002.

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

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

PRATES, H.S. Ocorrência e controle da doença fúngica “Queda anormal de frutos jovens de citros”, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 12, n. 2, 523-538, 1991.

PRATES, H.S.; RODRIGUES, J.C.V. Situação atual, prejuízos e perspectivas de controle da podridão floral causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, 107-126, 1995.

RAMOS, H.H.; RAETANO, C.G.; PIO, L.C. Tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários em citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundag, 2005. p. 769-798.

RUSSELL, P.E. **Sensitivity baseline in fungicide resistance research and management**. Brussels: GCPF, 2004. 56p. (FRAC Monograph 3).

TIMMER, L.W. Diseases of fruit and foliage. In: TIMMER, L.W.; DUNCAN, L.W. **Citrus health management**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999, p.107-115.

_____. Postbloom fruit drop disease. In: TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. St. Paul: APS Press, 2000. p. 21-22.

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. **Colletotrichum**: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 300-316.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Timing of fungicide applications for control of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, p. 820-823, 1992.

_____. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 501-504, 1993.

_____. Early season indicators of postbloom fruit drop of citrus and the relationship of disease incidence and fruit production. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 1017-1020, 1995.

_____. Evaluation of a model for prediction of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 38-383, 1996.

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

TURECHEK, W.W.; PERES, N.A.; WERNER, N.A. Pre- and post-infection activity of pyraclostrobin for control of anthracnose fruit rot of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 862-868, 2006.

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

WONG, F.P.; MIDLAND, S.L. Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 1547-1555, 2007.

WONG, F.P.; DE LA CERDA, K.A.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; MIDLAND, S.L. Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 239-246, 2008.

YE, X.; SAKAI, K.; ASADA, S.; SASAO, A. Application of narrow-band TBVI in estimating fruit yield in citrus. **Biosystems Engineering**, London, v. 99, p. 179-189, 2008.

ANEXO

Estádios de desenvolvimento reprodutivo dos citros, desde a emergência da inflorescência até o início do desenvolvimento do fruto com o respectivo nome vulgar

Estádio	Nome vulgar	Descrição
R1 cabeça de alfinete	Emergência da inflorescência: flores visíveis e fechadas, com botões verdes e pouco visíveis, normalmente encobertos pelas folhas do ramo.
R2 pálito de fósforo	Emergência da inflorescência: flores ainda fechadas, porém mais visíveis com botões florais verdes ainda envolvidos pelas sépalas.
R3 cotonete	Emergência da inflorescência: alongamento das pétalas, sépalas envolvendo a corola (botões brancos).
R4 cotonete expandido	Emergência da inflorescência: maioria das flores com as pétalas totalmente expandidas, mas ainda fechadas.
R5 flor aberta (antese)	Florescimento: primeiras flores se abrem até início da queda de pétalas quando aproximadamente 50% da flores estão abertas
R6 queda de pétalas	Florescimento: maioria das pétalas já caíram até a queda de todas as pétalas
R7 queda de frutos (chumbinho)	Desenvolvimento do fruto: início do crescimento do ovário e da abscisão de frutos jovens

*Adaptado de Augusti et al. (2000) e do guia de fases de desenvolvimento dos citros - Stoller do Brasil S.A (www.stoller.com.br).