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

Pré-Penetração de *Guignardia psidii* em goiaba: influência da temperatura, duração do molhamento, idade dos frutos e concentração de etileno e dióxido de carbono

Maria Eugenia Escanferla

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

Piracicaba

2007

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

Pré-Penetração de *Guignardia psidii* em goiaba: influência da temperatura, duração do molhamento, idade dos frutos e concentração de etileno e dióxido de carbono

Maria Eugenia Escanferla

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

Piracicaba

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Escanferla, Maria Eugenia

Pré-penetração de *Guignardia psidii* em goiaba: influência da temperatura, duração do molhamento, idade dos frutos e concentração de etileno e dióxido de carbono / Maria Eugenia Escanferla. - - Piracicaba, 2007.

85 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Dióxido de carbono 2. Etileno 3. Fungo fitopatogênico 4. Goiaba 5. Molhamento –
Duração 6. Pinta-preta 7. Temperatura – Influências I. Título

CDD 634.421

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

Maria Eugenia Escanferla
Bióloga

Pré-Penetração de *Guignardia psidii* em goiaba: influência da temperatura, duração do molhamento, idade dos frutos e concentração de etileno e dióxido de carbono

Orientador:

Prof. Dr. NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR

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

Piracicaba

2007

Aos meus pais Luiz e Satie pelo amor e motivação dados durante todos os anos de minha vida;

A minha irmã Ana Carolina pela amizade e bons momentos de diversão e descontração;

Ao Renato pelo companheirismo, apoio e carinho em todos os momentos;

As amigas Helen e Larissa sempre presentes trazendo alegria e amizade.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amor e pela vida;

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e ao Setor de Fitopatologia, pelas condições oferecidas;

Ao Professor Doutor Nelson Sidnei Massola Júnior pela orientação e amizade;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

A professora Doutora Lilian Amorim pelo auxílio e orientação;

Ao produtor Ricardo Kumagai e sua esposa Cristina por contribuírem para elaboração de grande parte dos experimentos e pela amizade;

As amigas Sylvia e Raquel por auxiliarem neste trabalho e pela amizade;

A todos os professores do Setor de Fitopatologia pela amizade e ensinamentos concedidos;

A todos os funcionários do Setor de Fitopatologia, em especial ao Jeferson e a Linda, pela amizade e auxílio;

A todos os amigos do Setor de Fitopatologia, em especial a Cassiara e Sthela pela amizade;

Ao Professor Doutor Jacomino, a Gabriela e Marcos pelo auxílio e boa disposição para realização de determinados experimentos;

Aos funcionários da biblioteca pela disposição em ajudar, bom humor e auxílio nas correções;

Ao Roberto Carvalho, Luciano Rosa e José Pavani pelo incentivo e pelos primeiros conceitos formados na área de Fitopatologia;

As amigas Luzia e Edneia pela formação e amizade durante minha graduação;

A todos que indireta ou diretamente contribuíram para realização deste trabalho.

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito."

Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO.....	12
Referências	14
2 DESENVOLVIMENTO.....	16
2.1 Revisão Bibliográfica	16
2.1.1 A cultura da goiabeira.....	16
2.1.2 Pinta Preta.....	18
2.1.3 Fatores ambientais	20
2.1.4 Apressório.....	22
2.1.5 Quiescência.....	24
Referências	26
3 PRÉ-PENETRAÇÃO DE <i>Guignardia psidii</i> EM GOIABA: EFEITO DA TEMPERATURA, DURAÇÃO DO MOLHAMENTO E IDADE DO FRUTO	32
Resumo	32
Abstract.....	33
3.1 Introdução.....	34
3.2 Material e métodos	36
3.2.1 Condução dos experimentos.....	36
3.2.2 Obtenção e manutenção do isolado de <i>G. psidii</i>	36
3.2.3 Avaliação do efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de <i>G. psidii in vitro</i>	36
3.2.4 Obtenção dos frutos de goiabeira	37
3.2.5 Avaliação do efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de <i>G. psidii</i> em goiaba	38
3.2.6 Avaliação da pré-penetração de conídios de <i>G. psidii</i> em diferentes idades de frutos de goiabeira	39
3.3 Resultados.....	40

3.3.1 Avaliação do efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de <i>G. psidii</i> <i>in vitro</i>	40
3.3.2 Avaliação do efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de <i>G. psidii</i> em goiaba	44
3.3.3 Avaliação da pré-penetração de conídios de <i>G. psidii</i> em diferentes idades de frutos de goiabeira	49
3.4 Discussão	52
3.5 Conclusão	59
Referências	59
4 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIÓXIDO DE CARBONO E ETILENO NA PRÉ-PENETRAÇÃO DE <i>Guignardia psidii</i> EM GOIABA	65
Resumo	65
Abstract	66
4.1 Introdução	67
4.2 Material e métodos	69
4.2.1 Condução dos experimentos	69
4.2.2 Obtenção e manutenção do isolado de <i>G. psidii</i>	69
4.2.3 Efeito <i>in vitro</i> de dióxido de carbono e etileno na pré-penetração de conídios de <i>G. psidii</i>	69
4.2.4 Efeito de dióxido de carbono e etileno na pré-penetração de conídios de <i>G. psidii</i> em frutos de goiabeira	70
4.3 Resultados	72
4.3.1 Efeito <i>in vitro</i> de dióxido de carbono e etileno na pré-penetração de conídios de <i>G. psidii</i>	72
4.3.2 Efeito de dióxido de carbono e etileno na pré-penetração de conídios de <i>G. psidii</i> em frutos de goiabeira	74
4.4 Discussão	77
4.5 Conclusões	79
Referências	79
ANEXOS	82

RESUMO

Pré-Penetração de *Guignardia psidii* em goiaba: influência da temperatura, duração do molhamento, idade dos frutos e concentração de etileno e dióxido de carbono

A pinta preta provocada pelo fungo *Guignardia psidii* Ullasa e Rawal (*Phyllosticta psidiicola* (Petrak) van der Aa) vem gerando perdas pós-colheita na produção de goiaba para consumo *in natura*. Este trabalho buscou maiores informações sobre esta doença por meio do estudo do efeito da temperatura, da duração do período de molhamento, do efeito dos gases dióxido de carbono e etileno, e da idade dos frutos de goiabeira na pré-penetração de conídios de *G. psidii*. Os estudos *in vitro* foram avaliados por meio de microscópio de luz e os *in vivo* por meio de microscópio eletrônico de varredura, registrando-se a porcentagem de conídios germinados, apressórios formados e apressórios melanizados (*in vitro*). O efeito da temperatura (10 a 40°C) e da duração do período de molhamento (6 a 48 *in vitro* e 6 a 24 horas *in vivo*) na germinação, formação de apressórios e apressórios melanizados (*in vitro*) foram avaliados em superfície de poliestireno e de frutos de goiabeira. Em ambas as superfícies, à medida que a temperatura aumentou, observou-se o aumento gradual da germinação, formação de apressório e apressório melanizado atingindo o máximo a 25°C e duração de período de molhamento de 24 horas *in vivo* e 48 horas *in vitro*. Nessas condições, os valores obtidos foram 38% de conídios germinados, 37,7% de apressórios formados e 32,7% de apressórios melanizados *in vitro* e 45,6% de conídios germinados e 11,2% de apressórios formados *in vivo*. As taxas de germinação e formação de apressório foram maiores no experimento *in vivo*. A germinação e formação de apressório de conídios de *G. psidii* foram avaliadas em cinco diferentes idades de frutos: 10 dias, 35 dias, 60 dias, 85 dias e 110 dias. Observou-se o aumento gradual das variáveis avaliadas com o aumento da idade do fruto, apresentando, em frutos com 10 dias, 8,4% de conídios germinados e 3,2% de apressórios formados, enquanto os frutos com 110 dias apresentaram 43,2% de conídios germinados e 26,4% de apressórios formados. O efeito das concentrações 0, 3, 6 e 12% de dióxido de carbono e 0, 1, 3 e 6 ppm de etileno na pré-penetração de conídios de *G. psidii* foram avaliadas *in vitro* e *in vivo*. No experimento *in vitro*, o aumento das concentrações de dióxido de carbono provocou queda na germinação dos conídios de *G. psidii* quando comparado ao controle. No entanto, entre as concentrações deste gás a taxa de germinação manteve-se estável. Portanto, no controle esta variável apresentou valor médio de 45,1% enquanto que nas concentrações 3, 6 e 12% do gás passou para, respectivamente, 24,6%, 22,6% e 25,8%. Entretanto, o aumento das concentrações deste gás provocou decréscimo progressivo da taxa de formação de apressórios e apressórios melanizados. Na concentração de 3% de dióxido de carbono houve 10,3% de apressórios formados e 5,4% de apressórios melanizados e na concentração de 12%, esses valores foram reduzidos para 4,1% e 0,5%, respectivamente. No entanto, no experimento *in vivo*, as taxas de germinação e formação de apressórios apresentaram redução gradativa entre as concentrações 3 e 6% de dióxido de carbono, elevando-se novamente a 12%, passando de 28,2% de conídios germinados e 20,5% de apressórios formados na concentração de 6% de dióxido de carbono para, respectivamente, 49,3% e 38,2% a 12% de concentração desse gás. Esse comportamento pode ser explicado devido à remoção dos conídios não germinados durante o preparo das amostras para visualização em microscópio eletrônico. O etileno, tanto nos experimento *in vitro* quanto *in vivo* não apresentou efeito sobre a germinação e formação de apressórios de *G. psidii*. Apresentando no controle *in vitro* 34,6% de conídios

germinados, 34,2% de apressórios formados e 29,9% de apressórios melanizados e na maior concentração de etileno estudada (6 ppm) 26,7% de conídios germinados, 26,3% de apressórios formados e 20,2% de apressórios melanizados. Nos ensaios *in vivo*, o controle apresentou 40% de conídios germinados e 32,7% de apressórios formados e na maior concentração de etileno estudada 49,3% de conídios germinados e 38,2% de apressórios formados.

Palavras-chave: Goiaba; *Guignardia psidii*; Pré-penetração; Temperatura; Período de molhamento; Idade do fruto; Etileno; Dióxido de carbono

ABSTRACT

Pre-penetration of *Guignardia psidii* in guava: effect of temperature, wetness duration, fruit age and concentrations of ethylene and carbon dioxide

The black spot caused by the fungus *Guignardia psidii* Ullasa and Rawal (*Phyllosticta psidiicola* (Petrak) van der Aa) has been causing post-harvest losses of guava fruit for consumption *in natura*. This work was designed to investigate the effects of temperature, wetness duration, carbon dioxide and ethylene concentration, and guava fruit age on the pre-penetration of *G. psidii*. The percentages of germinated conidia, formed appressoria and melanized appressoria were evaluated in both *in vitro* and *in vivo* experiments, using a light microscope in the former and a scanning electron microscope in the later. The effects of temperature (10 to 40°C) and wetness duration (6 to 48 hours *in vitro* and 6 to 24 hours *in vivo*) on the germination, appressoria formation and melanized appressoria (*in vitro*) were evaluated on a polystyrene surface and on the fruit's surface. In both surfaces, as the temperature increased a gradual increase in conidia germination, appressoria formation and melanized appressoria was observed, reaching maximum at 25°C with wetness duration being 24 hours *in vivo* and 48 hours *in vitro*. In these conditions, the values obtained were 38.0% germinated conidia, 37.7% formed appressoria and 32.7% melanized appressoria *in vitro* and 45.6% germinated conidia and 11.2% formed appressoria *in vivo*. Conidia germination and appressoria formation rates were higher in the *in vivo* experiment. *G. psidii* conidia germination and appressoria formation were evaluated at five different fruit ages: 10 days, 35 days, 60 days, 85 days and 110 days. A gradual increase of the evaluated variables was observed as the fruit's age increased, presenting in fruits with 10 days, 8.4% germinated conidia and 3.2% formed appressoria, while the fruits with 110 days presented 43.2% germinated conidia and 26.4% formed appressoria. The effects of carbon dioxide concentration at 0, 3, 6 and 12% and ethylene at 0, 1, 3 and 6 ppm on the pre-penetration of *G. psidii* were evaluated *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* experiment an increase in the carbon dioxide concentration provoked a decrease in *G. psidii* conidia germination when compared to the control. However, between the gas concentrations tested, the germination rate was stable. Therefore, in the control this variable presented a mean value of 45.1% while in the gas concentration of 3, 6 and 12%, the mean values were, respectively, 24.6%, 22.6% and 25.8%. However, increasing carbon dioxide concentration caused a progressive decrease in appressoria formation and melanized appressoria rates. At a concentration of 3% carbon dioxide, there was 10.3% formed appressoria and 5.4% melanized appressoria and at 12% concentration these values were reduced to 4.1% and 0.5%, respectively. Nonetheless, in the *in vivo* experiment, the rates of germination and appressorium formation presented a gradual reduction between the 3 and 6% dioxide carbon concentrations, increasing again at 12%, increasing from 28.2% germinated conidia and 20.5% formed appressoria at 6% carbon dioxide concentration to, respectively, 49.3% and 38.2% at 12% concentration of this gas. This behavior could be due to the removal of the conidia that did not germinate, during the preparation of the sample for electron microscope observation. Ethylene, in both the *in vitro* and in the *in vivo* experiments, showed no effect on *G. psidii* germination and appressoria formation, presenting in the *in vitro* control, 34.6% germinated conidia, 34.2% formed appressoria and 29.9% melanized appressoria and in the highest ethylene concentration studied (6 ppm) 26.7% germinated conidia, 26.3% formed appressoria and 20.2% melanized appressoria. In the *in vivo* assays, the control presented 40.0%

germinated conidia and 32.7% formed appressoria and in the highest ethylene concentration studied 49.3% germinated conidia and 38.2% formed appressoria.

Keywords: Guava; *Guignardia psidii*; Pre-penetration; Temperature; Wetness period; Fruit Age; Ethylene; Carbon dioxide

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, terceiro maior produtor de frutas do mundo, atrás apenas da China e Índia, tem aumentado gradativamente a participação no comércio mundial de frutas frescas e de derivados. A produção de frutas no país em 2006 foi de aproximadamente 40,6 milhões de toneladas, porém apenas 2% da produção foi exportada. No primeiro trimestre de 2007, as vendas nacionais registraram alta de 15% em valores. A média mundial nesse mesmo período é inferior aos dados registrados pelo Brasil. Em 2006 as exportações brasileiras de frutas frescas geraram divisas superiores à US\$ 480 milhões para o volume aproximado de 830 mil toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2007; INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF, 2007).

As principais frutas vendidas ao exterior são a uva, melão, manga, banana, limões e limas, maçã, laranja, melancia, abacaxi, tangerina, mamão, abacate, framboesa e goiaba. Tendo como destino principal à União Européia, que hoje concentra 70% do volume das exportações brasileiras. Devido ao grande potencial do Brasil como exportador e a necessidade de diversificar o destino das exportações, o IBRAF fez um levantamento das oportunidades dos principais mercados emergentes e vem realizando várias ações para alavancar as exportações de frutas frescas e processadas (IBRAF, 2007). Entre estas, a goiaba (*Psidium guajava* L.) se destaca por apresentar excelente qualidade nutricional e agradáveis características organolépticas (sabor e aroma), apresentando teores consideráveis de vitamina C e outras vitaminas, açúcares, ferro, cálcio e fósforo na polpa. Além disso, contém fibras e elevada digestibilidade, fatores que são favoráveis à saúde humana (CARVALHO, 1994). Sendo as variedades de polpa branca destinadas ao mercado *in natura* e as de polpa vermelha com dupla aptidão, mercado *in natura* e indústria (GORGATTI NETTO et al., 1996).

A conscientização da população sobre a importância do consumo de alimentos saudáveis na prevenção de doenças e na melhoria de qualidade de vida vem aumentando consideravelmente. Isto tem resultado no aumento mundial de consumo de frutas, que correspondem a alimento de ótima qualidade (AZZOLINI, 2002). Para os exportadores de frutas brasileiras garantirem a competitividade no mercado internacional foi criada a Produção Integrada de Frutas (PIF) em 1998/99, pelo PROFRUTA - Programa de Desenvolvimento da Fruticultura, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Toda a produção

de frutas recentemente exportada para o mercado europeu exige esta certificação com objetivo de garantir a segurança do alimento e de promover o desenvolvimento sustentável. No estágio atual, o Sistema PIF já atingiu a consolidação de 17 espécies frutíferas (maçã, uva, manga, mamão, citros, caju, coco, banana, melão, pêssego, goiaba, caqui, maracujá, fíco, abacaxi, mangaba e morango), sendo a goiaba validada no início de 2005 (ANDRIGUETO; NASSER; TEIXEIRA, 2006).

A grande perda de frutas e hortaliças após a colheita é realidade, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Dentre os principais motivos, encontra-se a ação de fitopatógenos os quais conquistam a planta viva como fonte de nutrientes e podem provocar perdas pós-colheita. As fases iniciais do ciclo de vida de fungos fitopatogênicos de frutas e vegetais envolvem a deposição do esporo na superfície do hospedeiro, germinação e produção de estruturas de penetração ou penetração direta através de ferimentos ou aberturas naturais (PRUSKY, 1996). A fase de pré-penetração abrange os eventos que ocorrem entre a germinação e a penetração e merece extensiva atenção, visto que sua compreensão pode esclarecer como as plantas são infectadas (BRUNELLI et al., 2005). No entanto, os sintomas de uma doença podem se manifestar muito tempo depois dos estágios iniciais de infecção. Esta fase é conhecida como período de quiescência, onde o patógeno tem o processo de ataque ao hospedeiro interrompido e, sob circunstâncias específicas, pode se tornar ativo encerrando tal fase (JARVIS, 1994). Entre os fatores que mostram influência na infecção de patógenos de plantas, encontram-se a temperatura, o período de molhamento, idade do hospedeiro e diferentes concentrações de gases como o dióxido de carbono e o etileno. O conhecimento da interação entre esses fatores e as diferentes fases do ciclo da doença pode gerar medidas de controle mais eficazes e apropriadas.

Recentemente, a qualidade do fruto da goiabeira em pós-colheita vem sendo afetada pela pinta ou mancha preta. Esta podridão é causada pelo fungo *Guignardia psidii* Ullasa e Rawal e o anamorfo *Phyllosticta psidiicola* (Petrak) van der Aa. Os sintomas da doença constituem-se, inicialmente, de pontos deprimidos os quais evoluem rapidamente na superfície dos frutos de forma concêntrica e tornam-se lesões de coloração preto-esverdeadas a marrom-escuras, que podem apresentar na superfície frutificações do fungo, geralmente conidiomas picnidiais. Estas lesões, geralmente com 1 a 2,5 cm de diâmetro, ocorrem em qualquer área do fruto, podendo posteriormente coalescer (JUNQUEIRA et al., 2001; TOZETTO, 1995; TOZETTO; RIBEIRO, 1998).

Devido à importância da qualidade da goiaba para o consumo *in natura* e face à recente constatação da importância da mancha preta, estudos sobre o agente causal se fazem necessários. Este trabalho objetiva ampliar o conhecimento sobre o processo infeccioso da mancha preta, especialmente no que se refere à importância de alguns fatores ambientais e da idade dos frutos de goiabeira.

Referências

- ANDRIGUETO, J.R.; NASSER, L.C.B.; TEIXEIRA, J.M.A. **Produção integrada de frutas:** conceito, histórico e a evolução para o Sistema Agropecuário de Produção Integrada – SAPI. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/SERVICOS/PROTECAO_INTEGRADA_DE_FRUTAS1/PROD_INTEGRADA_TEXTOS/PRODU%C7%C3O%20INTEGRADA%20-%20SAPI.DOC>. Acesso em: 27 jul. 2006.
- AZZOLINI, M. **Fisiologia pós-colheita de goiabas “Pedro Sato”:** estádios de maturação e padrão respiratório. 2002. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- BRUNELLI, K.R.; SOBRINHO, C.A.; CAVALCANTI, L.S.; FERREIRA, P.T.O.; CAMARGO, L.E.A. Germinação e Penetração de *Stenocarpella macrospora* em Folhas de Milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p.187-190, 2005.
- CARVALHO, V.D. Qualidade e conservação pós-colheita de goiabas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 179, p. 48-54, 1994.
- GORGATTI NETTO, A.; GARCIA, A.E.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.C.; BLEINROTH, E.W.; MATALLO, M.; CHITARRA, M.I.F.; BORDIN, M.R. **Goiaba para exportação:** procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: Embrapa, SPI, Frupe, 1996. 35 p. (Frupe. Publicações Técnicas, 20).
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em:
<http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp> Acesso em: 10 ago. 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2006/default.shtm>> Acesso em: 13 ago. 2007.
- JARVIS, W.R. Latent infection in pre- and postharvest environment. **HortScience**, St. Joseph, v. 29, p. 749-751, 1994.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.; PEREIRA, M.; LIMA, M.M.; CHAVES, R.C. **Doenças da goiabeira no cerrado**. Planaltina: EMBRAPA, 2001. 32 p. Disponível em:
<http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2001/cirtec/cirtec_15.pdf> Acesso em: 16 jul. 2007.

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

TOZETTO, L.J. **Caracterização, biologia e controle em pós-colheita de *Guignardia psidii* Ullasa & Rawal [*Phyllosticta psidiicola* (Petr) van der Aa], agente causal de podridão em frutos de goiabeira.** 1995. 115 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 1995.

TOZETTO, L.J.; RIBEIRO, W.R.C. Tratamento pós-colheita de goiaba (*Psidium guajava*, L.) contra podridão de *Guignardia psidii*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 20, p. 229-234, 1998.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura da goiabeira

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) pertence à família Myrtaceae, a qual contém cerca de 102 gêneros e 3.024 espécies conhecidas, distribuídas e cultivadas, principalmente em países de clima tropical e subtropical, onde apresentam plantas de porte variável, desde grandes árvores até arbustos e trepadeiras (MANICA et al., 2001). A espécie tem origem na América tropical, mas é muito conhecida pela grande adaptação de crescimento e produção em diferentes locais do mundo, sendo no Brasil amplamente difundida da região Sul ao Nordeste. Os frutos são bagos com tamanho, forma e coloração da polpa variáveis, dependendo da cultivar (GONZAGA NETO; SOARES, 1995; MANICA et al., 2001).

Comparada às outras frutas tropicais, a goiaba destaca-se por excelentes qualidades nutricionais, sendo considerada uma das frutas mais completas e equilibradas. Esta fruta é rica em zinco, fibras, niacina, vitamina E e licopeno. Contém quatro vezes mais vitamina C que a laranja, perdendo somente para a acerola, camu-camu e o caju, além de concentrar altas quantidades de selênio, cobre, fósforo, magnésio, cálcio, ferro, ácido fólico e de vitaminas A e complexo B. As excelentes propriedades organolépticas a tornam aproveitável tanto para o consumo *in natura* quanto para a industrialização (MANICA et al., 2001).

O mercado da fruta *in natura* exige frutos uniformes quanto ao tamanho, forma e coloração e preferem variedades de goiaba de polpa branca. Este mercado é ainda reduzido devido principalmente à falta de qualidade do produto comercializado, o qual é reflexo da pós-colheita inadequada, de precárias estruturas de comercialização e qualidade inferior da goiaba brasileira, pois grande parte da produção destina-se a indústria, a qual é menos exigente nos padrões de qualidade. As goiabas de polpa branca têm importância no Brasil, para a exportação de frutos *in natura*. As cultivares de polpa vermelha são as preferidas pelo mercado interno para o consumo como fruta fresca e para a indústria, as quais correspondem por quase a totalidade dos plantios comerciais do Brasil. A polpa, de alto rendimento, pode ser transformada e comercializada em forma de doces em pasta, sorvetes, compotas, geléias e sucos (CHOUDHURY, 2001; MANICA et al., 2001).

O Brasil produziu 345.553 toneladas de goiaba em 2005, apresentando maior destaque de produção os estados de São Paulo e Pernambuco. O estado de São Paulo produziu em 2005, 117.878 toneladas do fruto, ou seja, cerca de 34% da produção nacional (IBGE, 2007). A Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP, registrou no mesmo ano o volume comercializado de 12.299 toneladas de goiaba, dos quais 3.095 toneladas eram goiabas do tipo branca e 9.204 toneladas eram goiabas do tipo vermelha (FNP, 2007). A exportação brasileira de goiaba em 2005 atingiu o patamar de US\$ 128 mil e em 2006 de US\$ 190 mil (IBRAF, 2007). As variedades de polpa branca são preferidas para exportação como descrito anteriormente, por apresentarem maior capacidade de conservação após a colheita (GORGATTI NETTO et al., 1996).

Dentre as variedades de polpa branca destaca-se a Kumagai, a qual foi originada do cruzamento da goiabeira Australiana com a IAC-4. Esta variedade caracteriza-se por apresentar porte e vigor médio, com ramos longos, esparramados e de grande produtividade. Os frutos são grandes, com 280 a 480 gramas, arredondados a oblongos, com a casca lisa, de consistência firme e resistente, de coloração verde-amarelada quando maduros, apresentando polpa firme, consistente, saborosa, levemente ácida, com a cavidade cheia e com poucas sementes (MANICA et al., 2001). Esta variedade sempre atendeu ao mercado mais exigente, sendo produzida de forma tecnicamente correta, ou seja, com poda drástica e ensacamento dos frutos. Atualmente é a base da pequena exportação da goiaba brasileira (CEAGESP, 2007).

Os conhecimentos recentemente adquiridos sobre as vantagens proporcionadas à saúde pela utilização de frutas frescas contribuíram para o incremento significativo no consumo desse grupo de alimentos (CHOUDHURY, 2001). Deste modo, consumidores e clientes do atual mercado global exigem cada vez mais qualidade mercadológica competitiva das frutas, pois se preocupam com a segurança dos alimentos e a preservação do meio ambiente. Para os exportadores de frutas brasileiras garantirem a competitividade no mercado internacional foi criada a Produção Integrada de Frutas (PIF) em 1998/99, pelo Programa de Desenvolvimento da Fruticultura (PROFRUTA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Atualmente, toda a produção de frutas exportada para o mercado europeu exige certificação. A goiaba foi validada no início de 2005 e conta com 27 produtores, totalizando uma área de 75 ha e 300 toneladas produzidas (ANDRIGUETO; NASSER; TEIXEIRA, 2006).

2.1.2 Pinta Preta

A infecção da goiaba por microrganismos fitopatogênicos pode acontecer nos períodos de produção, colheita e pós-colheita. As doenças pós-colheita em goiaba estão entre as principais causas da antecipação da colheita desses frutos, tanto em pomares que praticam o ensacamento de frutos, como naqueles que não o fazem. Como a maior parte das doenças pós-colheita só apresenta sintomas em frutos maduros, a colheita de frutos verdes tornou-se estratégica para a comercialização, pois, nesse estado, todos os frutos estão aparentemente sadios. Entretanto, à medida que o amadurecimento ocorre, os sintomas expressam-se, em graus diversos de severidade, a ponto de impedir o consumo dos frutos (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2007).

A qualidade do fruto da goiabeira em pós-colheita vem sendo afetada de maneira significativa pela pinta ou mancha preta. Esta podridão é provocada pelo fungo *Guignardia psidii* Ullasa e Rawal e o anamorfo *Phyllosticta psidiicola* (Petrak) van der AA. O gênero *Guignardia* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaeriales e família Botryosphaeriaceae (INDEXFUNGORUM, 2007). Espécies de *Guignardia*, incluindo o estado anamórfico *Phyllosticta*, constituem importante grupo econômico de fungos fitopatogênicos os quais são compostos aproximadamente de 40 espécies (HAWKSWORTH; DAVID, 1989). As espécies de *Phyllosticta*, em geral, causam manchas foliares, mas também atacam frutos ou hastes jovens (VAN DER AA, 1973).

Em 1953 a fase anamórfica do fungo foi relatada pela primeira vez, tendo sido encontrada por Petrak em frutos de goiabeira procedentes do Havaí e denominada *Phyllostictina psidiicola*. Van der AA em 1973 propôs a nova terminologia de *Phyllosticta psidiicola*. As formas anamórficas e teleomórficas foram encontradas em Bangalore, Índia (ULLASA; RAWAL, 1984) e recentemente na Venezuela (GONZÁLES; RONDÓN, 2005). Em Taiwan, a podridão provocada pelo fungo *Pestalotiopsis* tornou-se menos severa e as causadas por *Colletotrichum* e *Phytophthora* tornaram-se de menor importância comparadas à podridão em goiabas provocada por *P. psidiicola*. A incidência deste fungo foi detectada na faixa de 80,2% a 94,5% nas variedades de goiaba cultivadas no país, gerando grandes perdas na produção. Além disso, a podridão por *P. psidiicola* em Taiwan apresentou maior incidência 5 dias após a colheita, levando a constatação que o fungo apresentava período latente de infecção (LIN; LAI; TSAI, 2003). No Brasil, *G. psidii* e o anamorfo *P. psidiicola* foram inicialmente relatados no Brasil por Tozetto e

Ribeiro (1993) causando podridão de frutos de goiabeira em pós-colheita no Distrito Federal. Recentemente no Brasil, a pinta preta em goiaba foi relatada em elevada porcentagem na região produtora de Campinas, no estado de São Paulo. No período de janeiro a novembro de 2005, a incidência média do fungo *G. psidii* em frutos da variedade Kumagai foi de 18,6% e pico de incidência de 58%, o qual ocorreu em abril (AMARAL et al., 2006).

Os sintomas da doença constituem-se inicialmente de pontos amarelados os quais evoluem na superfície dos frutos formando lesões deprimidas, preto-esverdeadas a marrom-escuras, as quais podem apresentar na superfície frutificações do fungo, geralmente conidiomas picnidiais. Nas áreas próximas ou sob as lesões, a polpa apresenta podridão mole. As lesões são circulares, geralmente com 1 a 2,5 cm de diâmetro e ocorrem em qualquer área do fruto, podendo posteriormente coalescer. A infecção por *G. psidii* ocorre ainda nos frutos jovens permanecendo em estado quiescente, até a maturidade (MANICA et al., 2001; TOZETTO; RIBEIRO, 1993, 1998).

Baseado na descrição de Ullasa e Rawal, (1984) e Gonzáles e Rondón (2005) este fungo apresenta micélio denso, de coloração verde acinzentado a marrom-escuro ou preto, com abundante micélio aéreo e também submerso em meio de cultura. Os ascocarpos são numerosos, granulosos, solitários ou agregados, de formato peritecial com rostros longos e proeminentes. A parede dos ascocarpos é estromática, composta de várias camadas de células pseudoparenquimáticas, que são espessas e intensamente pigmentadas no exterior. Os ascos são subclavados a cilíndricos, pedicelados, estipitados, bitunicados e com 8 esporos. Os ascósporos são hialinos, unicelulares, granulados, de formato elipsóide, largos na região meridiana, com apêndices mucilaginosos em uma ou ambas as extremidades. Na forma anamórfica o picnídio apresenta forma variável, de coloração marrom a preto, encontrando-se solitários ou em grupos, com paredes espessas compostas de diversas camadas de células marrom-escuras. Os conídios são hialinos, unicelulares, com diversos pequenos grânulos esverdeados, formato elipsoidal e provido de bainha gelatinosa e presença de apêndice apical.

2.1.3 Fatores ambientais

Fatores como a temperatura, duração do molhamento e presença de gases como o etileno e o dióxido de carbono podem atuar no processo fisiológico de plantas e frutos assim como no progresso de doenças. Deste modo, medidas de controle mais efetivas e adequadas podem ser estabelecidas por meio do conhecimento da interação entre tais fatores e as diferentes fases do ciclo da doença.

Dentre estes fatores, a temperatura é o mais estudado, tendo sido detectada sua influência em todas as fases do ciclo de infecção, desde a germinação até a reprodução. Para cada patossistema existe um ótimo de temperatura para o crescimento de fitopatógenos e uma temperatura máxima e mínima, além da qual os fitopatógenos sobrevivem mas não são capazes de se desenvolver (VALE; ZAMBOLIM, 1996).

Assim, algumas doenças são mais severas a baixas temperaturas, outras a altas temperaturas, apesar do agente causal se desenvolver sobre ampla faixa de temperatura na cultura. Por isso, os efeitos da temperatura sobre a doença, assim como outros fatores ambientais, podem ser atribuídos por agirem sobre o patógeno, ou sobre o hospedeiro, ou sobre a interação entre patógeno e hospedeiro (COLHOUN, 1973). O agente causal da mancha preta em frutos de citros *Guignardia citricarpa* apresentou, em experimentos *in vitro*, aumento do percentual de germinação dos ascósporos à medida que se estendeu a temperatura, na faixa entre 15 a 24°C (TIMOSSI et al., 2003). Em *Colletotrichum acutatum*, agente causal da antracnose em morango, a germinação e formação de apressório em folhas foram influenciados pela temperatura a qual foi ótima entre 23 a 27,7°C para germinação e 17,6 a 26,5°C para o desenvolvimento do apressório (LEANDRO et al., 2003).

Tanto a umidade relativa quanto o molhamento foliar desempenham importante papel no desenvolvimento de doenças de plantas. A ocorrência de doenças em determinada região é dependente da quantidade e da frequência de água das chuvas bem como de outras fontes de umidade como orvalho, neblina, umidade relativa do ar elevada e irrigação. Com algumas exceções, praticamente todas as infecções de partes da planta sobre o solo são afetadas pela umidade (VALE; ZAMBOLIM, 1996).

A maioria dos fungos depende da disponibilidade de filme de água no estado líquido para germinar e causar infecção. Quando existe a necessidade de molhamento foliar, a duração pode

ser vital (COLHOUN, 1973; VALE; ZAMBOLIM, 1996). Em folhas de pêra, a média do número de lesões de sarna provocadas por *Venturia nashicola* aumentou com o incremento da duração do período de molhamento (LI et al., 2005). O aumento da duração do período de molhamento elevou a porcentagem de ameixas com infecções latentes provocados pelo fungo *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda. Enquanto o aumento da temperatura diminuiu a porcentagens de frutos com infecções latentes (LUO; MA; MICHILIDES, 2001). O mesmo procedeu em pêssegos e cerejas, ambos tiveram maior incidência de infecção por *M. fructicola* à medida que se aumentou a duração do período de molhamento, que corresponderam as máximas, respectivamente, de 15 e 18 horas (BIGGS; NORTHOVER, 1988).

Embora o efeito da temperatura seja extremamente importante para o desenvolvimento de epidemias, a umidade é mais limitante, devido o fato da temperatura favorável ao desenvolvimento das doenças ocorrer em faixa maior que a faixa da umidade, e os limites de temperatura máximo e mínimo favoráveis ao desenvolvimento da doença não erradicarem o patógeno, mas apenas inibirem o desenvolvimento das epidemias, a menos que esses valores persistam por tempos prolongados (ROTEM, 1978). Em plantas de girassol o aumento da temperatura provocou incremento na severidade da mancha de alternaria provocada por *Alternaria helianthi* até 30°C, a partir da qual decresceu de forma acentuada. No entanto, a não ocorrência de infecção foi observada na ausência de molhamento foliar, dessa forma confirmou-se a necessidade de água livre na superfície foliar para o estabelecimento da doença no hospedeiro. Sendo necessárias o mínimo de 12 horas de molhamento foliar para a ocorrência da infecção (LEITE; AMORIM, 2002). Em frutos de tomateiro ocorreu maior incidência de lesões de podridões pós-colheita causadas por *Fusarium verticillioides*, *Geotrichum candidum* e *Rhizopus stolonifer* em frutos incubados a 25°C. Entretanto, a presença de água livre na superfície dos frutos de tomateiro foi desnecessária para a incidência de podridões causadas pelos três fungos, embora os níveis de incidência tenham aumentado com o incremento do período de molhamento, com exceção para *R. stolonifer*, o qual causou a incidência máxima de doença, na ausência de molhamento (SILVEIRA et al., 2001).

O dióxido de carbono em determinadas concentrações pode influenciar no processo de infecção de diversos fitopatógenos favorecendo ou evitando danos em frutos e vegetais perecíveis. Sob elevados níveis de dióxido de carbono, a maioria dos patógenos são inibidos pela redução na taxa de diversas funções metabólicas, resultando na diminuição da respiração

(ADAIR, 1971 apud SOMMER, 1985). O efeito inibitório de elevadas concentrações de dióxido de carbono na atmosfera associada a baixas temperaturas foi observado no crescimento micelial e germinação dos conídios de *Botrytis cinerea*, *Rhizopus nigricans* e outros fungos fitopatogênicos (BROWN, 1922; BROOKS; BRATLEY; MCCULLOCH, 1936). O acréscimo de 5% dióxido de carbono diminui o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* a 12,5°C e *Whetzelinia sclerotiorum* a 5,5°C, entretanto estimulou o fungo *Monilinia fructicola* em ambas temperaturas (EL-GOORANI; SOMMER, 1979). No entanto, foi observado o aumento do crescimento micelial em *Penicillium expansum* mediante a elevação dos níveis de dióxido de carbono de 2,5 a 20%, apesar de inibir parcialmente a esporulação do fungo em elevada concentração (BRACKMANN et al., 1996).

O etileno apesar de não ser o único fito hormônio a atuar no processo de amadurecimento de frutos, é considerado o principal desta fase. Sendo biologicamente ativo em quantidades traço e seus efeitos comercialmente importantes na agricultura (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992 apud AZZOLINI, 2002). O etileno, produzido pelo fruto ou inserido artificialmente, além de estar ligado ao amadurecimento dos frutos, atua no processo de patogênese, acelerando ou retardando doenças em frutos. Concentrações elevadas inibiram o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* (LOCKHART, 1970 apud ABELES, 1973). O atraso do desenvolvimento de *Ceratocystis fimbriata* em batata doce e em *Gloeosporium album* em maçãs também foram relatados (STAHMANN; CLARE; WOODBURY, 1966; LOCKHART; FORSYTH; EAVES, 1968). Já a presença de 20 ppm de etileno resultou em maior podridão em morangos por *Botrytis cinerea* (EL-KAZZAZ; SOMMER; FORTLAGE, 1983) e em experimento em *in vitro* e em abacates, a exposição de conídios do agente causal da antracnose *Colletotrichum gloeosporioides* a concentrações de etileno entre 5 e 45 ppm, estimulou a germinação dos conídios e formação de apressório (PRUSKY; WATTAD; KOBILER, 1996).

2.1.4 Apressório

A iniciação, formação e ação do apressório são partes integrais do processo de infecção de muitos fungos parasitas. Em algumas espécies, a formação do apressório pode ser obrigatória para infecção, enquanto para outros pode ser opcional ou desnecessária. O desenvolvimento do apressório passa pelas fases de iniciação, maturação e produção do *peg* de infecção ou germinação. O papel do apressório é aderir firmemente ao substrato e penetrá-lo ou servir como

estrutura de sobrevivência, permanecendo dormente até que condições favoráveis permitam a germinação e a infecção (EMMETT; PARBERY, 1975).

A formação do apressório inicia-se com o fim do alongamento do tubo germinativo ou da hifa e o inchamento do ápice dos mesmos, além disso, pode ser sésil ao surgir diretamente do conídio. O processo de inchamento se encerra com a formação do septo entre o conídio, a hifa ou o tubo germinativo e a porção inchada (BAILEY et al., 1992; EMMETT; PARBERY, 1975). A deposição de uma camada final de células na parede logo externamente a membrana plasmática representa o estágio final da formação do apressório, nesta fase, em algumas espécies, o conídio que o originou entra em colapso. Esta camada da parede, composta de melanina, envolve todo o apressório, com exceção da região em contato com o substrato. Esta área com ausência de melanina é chamada de poro do apressório. A camada de melanina é responsável pela coloração escura do apressório quando observado em microscópio de luz (HOWARD, 1994) e tem função de proteger seu conteúdo da irradiação danosa, além do papel crucial no processo de penetração (BAILEY et al., 1992). Variações morfológicas durante a formação do apressório podem surgir devido a uma série de fatores físicos, químicos e genéticos. O tempo também é fator importante na formação do apressório, sendo que na maioria das espécies, leva de 6 a 12 horas sob condições favoráveis (EMMETT; PARBERY, 1975).

A penetração por meio do apressório, em muitas plantas, ocorre logo após a formação das estruturas de infecção. Pois, quanto mais tempo o fungo permanecer na superfície do hospedeiro, mais vulnerável ele ficará a dessecação, a competição com habitantes do filoplano, aos mecanismos de defesa do hospedeiro, a redução dos seus nutrientes de reserva e assim falhar no processo de infecção. Fatores ambientais como temperatura do ar e do solo, macro e micro umidades relativas, horas de molhamento foliar contínuo, grau de intensidade da luz e duração dos períodos de luz e escuro são importantes durante esta fase (HOWARD, 1994).

Há três mecanismos propostos de penetração da cutícula através do apressório. Estes são baseados na força mecânica, a secreção de enzimas com capacidade de degradação da cutícula e a combinação de ambos os processos (BAILEY et al., 1992).

A elevada pressão de turgor dentro do apressório é o componente mecânico essencial para a ocorrência da penetração do fungo no hospedeiro durante o processo de patogênese. Por meio da redução da pressão de turgor por stress osmótico do apressório de *Magnaporthe grisea*, agente causal da brusone do arroz, foi possível a inibição da penetração dos mesmos em membranas

sintéticas. Assim a penetração em membranas mais rígidas por apressório de *M. grisea* foi inibida por pequenas diminuições no turgor no apressório, enquanto a penetração em membranas mais macias foi sensível apenas a elevada diminuição do turgor (HOWARD et al., 1991).

Dois requisitos são necessários para gerar a pressão de turgor dentro do apressório. Primeiro, é necessário a formação de uma camada de melanina na parede da célula do apressório e segundo, o apressório deve aderir firmemente, ao substrato, selando com eficácia o poro do apressório. O que sugere que a melanina age como barreira permeável, permitindo o aumento da concentração de alguns solutos citoplasmáticos (HOWARD, 1994; HOWARD; FERRARI, 1989). A pressão de turgor em apressórios melanizados de *Colletotrichum kahawae*, agente causal antracnose em café, demonstrou papel importante na penetração da cutícula de folhas e grãos verdes, os quais apresentam pressão de turgor cerca de um terço da pressão do fungo. A inibição da melanização dos apressórios reduziu a pressão de turgor gerando efeito negativo no processo de infecção. No entanto, a inibição da atividade da cutinase não afetou a infecção, demonstrando que a cutícula foi penetrada mecanicamente (CHEN et al., 2004).

A atividade enzimática também é importante para o sucesso do processo de infecção de alguns fungos. A penetração do apressório pode requerer enzimas para dissolver ou amolecer a cutícula do hospedeiro. No gênero *Colletotrichum*, por exemplo, evidências indicam que algumas espécies necessitam da produção de cutinase, enzima capaz de dissolver a cutícula do hospedeiro, para penetração enquanto para outras a penetração é alcançada predominantemente por meios mecânicos (BAILEY et al., 1992). A enzima cutinase foi purificada em linhagens de *C. gloeosporioides* e *C. capsici* crescidos em cultura líquida (DICKMAN; PATIL; KOLATTUKUDY, 1982).

2.1.5 Quiescência

O processo de reação compatível entre um fungo patogênico e seu hospedeiro inicia-se com a deposição do esporo sobre o tecido suscetível, sua germinação, formação e crescimento do tubo germinativo e o surgimento de estruturas que participam da penetração (WYNN, 1981).

O conjunto de eventos que ocorre a partir do início da germinação do esporo até a penetração da hifa infectiva no hospedeiro é denominado pré-penetração (AMORIM, 1995). O entendimento desta fase permite esclarecer como as plantas são infectadas, colaborando, desta

maneira, na definição de estratégias que impeçam ou dificultem a penetração do patógeno (BRUNELLI et al., 2005).

Os sintomas de uma doença podem se manifestar muito tempo depois dos estágios iniciais de infecção. Verhoeff (1974) definiu como relação parasítica latente, dormiente ou quiescente a condição na qual o patógeno passa longos períodos durante a vida do hospedeiro em estágio quiescente, até que, sob específicas circunstâncias, se torna ativo.

A quiescência pode ser imposta durante os vários processos de ataque do fungo, o que sugere que deve ou pode ocorrer durante qualquer momento do processo, do conídio não germinado, germinado à colonização. A ocorrência e manutenção do patógeno quiescente sobre ou dentro do hospedeiro indica o equilíbrio dinâmico entre hospedeiro, patógeno e ambiente, sem sintomas visíveis (PRUSKY, 1996).

Fatores intrínsecos aos fungos fitopatogênicos podem estar envolvidos no processo de quiescência. Conídios de muitos fungos são produzidos juntamente com a matriz mucilaginosa a qual facilita a liberação. Essa mucilagem é denominada matriz conidial e tem sido considerada importante para a manutenção da capacidade de germinação dos conídios durante períodos de stress ambiental. A matriz pode proteger os conídios de danos potenciais, efeitos extremos de temperatura, dessecação, radiação por ondas curtas além de inibir a germinação prematura (LOUIS; COOKE, 1985). Em superfície de poliestireno, a formação de apressório por conídios de *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda em nectarinas, passou de 10 para 95% ao serem “lavados” para remoção de auto-inibidores e nutrientes residuais do meio de cultura. Entretanto, em experimentos *in vivo*, a frequência de apressório variou durante o desenvolvimento do fruto, devido a fatores como hidrofobicidade e compostos químicos como nutrientes e compostos voláteis do fruto (LEE; BOSTOK, 2006).

Infecções quiescentes são comuns em ampla variedade de cultura de frutos, vegetais e flores. Na maioria dos frutos verdes, caules e vegetais jovens, os mecanismos que limitam a agressão do patógeno são associados tanto com substâncias antimicrobianas pré-formadas ou com fitoalexinas, enzimas, ou estruturas físicas de resistência. Assim, a agressão só inicia com a ocorrência de determinadas mudanças fisiológicas e físicas, por exemplo, a liberação de compostos voláteis como o etileno, mudanças anatômicas na estrutura do fruto, aumento de nutrientes (açúcares e ácidos orgânicos), declínio na concentração de compostos anti-fúngicos e formação de ferimentos (PRUSKY, 1996). Em damasco o fungo *Monilinia fructicola*, agente

causal da podridão parda, se tornou ativo na presença dos compostos voláteis acetaldeído e etanol produzidos pelo fruto durante o amadurecimento (CRUICKSHANK; WADE, 1992). Os autores também demonstraram a ativação de infecções latentes em frutos imaturos e o crescimento do tubo germinativo dos conídios do fungo *in vitro*, quando estes foram expostos às mesmas concentrações de compostos voláteis detectados nos frutos maduros.

Evidências histológicas e avaliações de dureza em cascas sugerem que as células mais externas da epiderme juntamente com a cutícula agem como barreira defensiva (MARTIN, 1964). Cultivares de pêssago significativamente mais resistentes apresentaram densa e grossa epiderme comparada aos cultivares suscetíveis, e a resistência dos cultivares resistentes e suscetíveis foi correlacionada com o atraso da penetração e períodos mais longos de incubação para ocorrer infecção (ADASKAVEG; FELICIANO; OGAWA, 1991).

Simmonds (1963) discutiu quatro explicações possíveis para a latência em frutos: uma toxina presente em frutos verdes, porém não em frutos maduros; as necessidades nutricionais do patógenos não estarem de acordo com a composição do fruto imaturo; as energias necessárias pelo fungo estarem somente de acordo quando o metabolismo do hospedeiro passar de imaturo para a fase de maturação; e o potencial de enzima do fungo não ser o suficiente para permitir a invasão de frutos imaturos, mas é suficiente para permitir a invasão de frutos maduros. Conídios do fungo *Colletotrichum musae*, inoculados na superfície de frutos de banana verdes causaram necroses nas células da epiderme dos mesmos e constatou-se que continham compostos antifúngicos. Estas lesões necróticas não avançaram até a chegada do início do amadurecimento do fruto, quando as concentrações destes compostos antifúngicos diminuíram de forma constante (BROWN; SWINBURNE, 1980).

Referências

ABELES, F. **Ethylene in plant biology**. New York: Academic Press, 1973. 302 p.

ADASKAVEG, J.E.; FELICIANO, A.J.; OGAWA, J.M. Evaluation of the cuticle as a barrier to penetration by *Monilinia fructicola* in peach fruits. **Phytopathology**, Lancaster, v. 81, p. 1150, 1991. Abstract.

AMARAL, C.S.; SALVAIA, A.; ANGELI, S.S.; MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Incidência de patógenos pós-colheita em goiabas Kumagai. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 32, p. 57-58, 2006. Suplemento.

AMORIM, L. Infecção. In: In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 295-308.

ANDRIGUETO, J.R.; NASSER, L.C.B.; TEIXEIRA, J.M.A. **Produção integrada de frutas:** conceito, histórico e a evolução para o Sistema Agropecuário de Produção Integrada – SAPI. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/SERVICOS/PROTECAO_INTEGRADA_DE_FRUTAS1/PROD_INTEGRADA_TEXTOS/PRODU%C7%C3O%20INTEGRADA%20-%20SAPI.DOC>. Acesso em: 27 jul. 2006.

AZZOLINI, M. **Fisiologia pós-colheita de goiabas “Pedro Sato”:** estádios de maturação e padrão respiratório. 2002. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, A.J.; JEGER, J.M. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. p. 88-120.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PÓS-COLHEITA DE FRUTAS, HORTALIÇAS E FLORES, 2., 2007, Viçosa. **Palestras e resumos ...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. p. 203.

BIGGS, A.R.; NORTHOVER, J. Influence of temperature and wetness duration on infection of peach and sweet cherry fruits by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 78, p. 1352-1356, 1988.

BRACKMANN, A.; SAQUET, A.A.; VEIGA, V.V.; BORTOLUZ, L. Efeito das concentrações de CO₂ e O₂ no crescimento e esporulação de *Penicillium expansum* (Link.) Thom, *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 2, p. 147-150, 1996.

BROOKS, C.; BRATLEY, C.O.; MCCULLOCH, L.P. **Transit and storage diseases of fruits and vegetables as affected by initial carbon treatments**. Washington, USDA, 1936. (Technical Bulletin, 519). Disponível em: <<http://quod.lib.umich.edu/cgi/t/text/text-index?c=nal;cc=nal;rgn=main;view=text;idno=17038117.0519.001>> Acesso em: 15 ago. 2007.

BROWN, A.E.; SWINBURNE, T.R. The resistance of immature banana fruits to anthracnose [*Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx]. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 90, p. 70-80, 1980.

BROWN, W. On the germination and growth of fungi at various temperatures and in various concentrations of oxygen and carbon dioxide. **Annals of Botany**, Oxford, v. 36, p. 257-283, 1922.

BRUNELLI, K.R.; SOBRINHO, C.A.; CAVALCANTI, L.S.; FERREIRA, P.T.O.; CAMARGO, L.E.A. Germinação e Penetração de *Stenocarpella macrospora* em Folhas de Milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p.187-190, 2005.

CHOUDHURY, M.M. **Goiaba: pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 45 p. (Embrapa Informação Tecnológica. Frutas do Brasil, 19).

COLHOUN, J. Effects of environmental factors on plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 11, p. 343-364, 1973.

COMPANHIA DE ENTREPOSTOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO. **Goiaba em números**. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br/produtor/tecnicas/estudos/>> Acesso em: 03 jul. 2007.

CRUICKSHANK, R.H.; WADE, G.C. The activation of latent infections of *Monilinia fruticola* on apricots by volatiles from the ripening fruit. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, p. 107-112, 1992.

DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S.; KOLATTUKUDY, P.E. Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. **Physiological Plant Pathology**, Berlin, v. 20, p. 333-347, 1982.

EL-GOORANI; M.A.; SOMMER, N.F. Suppression of postharvest plant pathogenic fungi by carbon monoxide. **Phytopathology**, Lancaster, v. 69, p. 834-838, 1979.

EMMETT, R.W.; PARBERY, D.G. Appressoria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 147-167, 1975.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Goiaba. In: _____. **Agrianual 2007: anuário de agricultura brasileira**. São Paulo, 2007. p. 234-323.

GONZÁLEZ, M.S.; RONDÓN, A. First report of *Guignardia psidii*, an ascigerous state of *Phyllosticta psidiicola*, causing fruit rot on guava in Venezuela. **Plant Disease**, St Paul, v. 89, p. 773, 2005. Abstract.

GONZAGA NETO, L.; SOARES, J.M. **A cultura da goiaba**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1995. 75 p.

GORGATTI NETTO, A.; GARCIA, A.E.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.C.; BLEINROTH, E.W.; MATALLO, M.; CHITARRA, M.I.F.; BORDIN, M.R. **Goiaba para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: Embrapa, SPI, Frupep, 1996. 35 p. (Frupep. Publicações Técnicas, 20).

HAWKSWORTH; D.L.; DAVID, J.C. Proposals in fungi *Guignardia* Viala & Ravaz with *G. bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz as conserved type (fungi). **Taxon**, Utrecht, v. 38, p. 494-495, 1989.

HOWARD, R.J. Cell biology of pathogenesis. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Ed.). **Rice blast disease**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 3-22.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in appressorium function. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 13, p. 403-418, 1989.

HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A.; ROACH, D.H.; MONEY, N.P. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 11281-11284, 1991.

INDEXFUNGORUM. Disponível em:

<<http://www.indexfungorum.org/Names/genusrecord.asp?RecordId=2147>> Acesso em: 14 ago. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em:

<http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp> Acesso em: 10 ago. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2006/default.shtm>> Acesso em: 13 ago. 2007.

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

LEE, M.H.; BOSTOCK, R.M. Induction, regulation, and role in pathogenesis of appressoria in *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, p. 1072-1080, 2006.

LEITE, R.M.V.B.C.; AMORIM, L. Influência da temperatura e do molhamento foliar no monociclo da mancha de alternaria em girassol. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 193-200, 2002.

LI, B.H.; XU, X.M.; LI, J.T.; LI, B.D. Effects of temperature and continuous and interrupted wetness on the infection of pear leaves by conidia of *Venturia nashicola*. **Plant Pathology**, London, v. 54, p. 357-363, 2005.

LIN, C.C.; LAI, C.S.; TSAI, S.F. Ecological survey of guava new fruit rot - *Phyllosticta* rot (black spot) and other fruit rots. **Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 45, p. 263-270, 2003.

LOCKHART, C.L.; FORSYTH, F.R.; EAVES, C.A. Effect of ethylene on development of *Gloeosporium album* in apple and on growth of the fungus in culture. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.48, p. 557-559, 1968.

LOUIS, I.; COOKE R.C. Conidial matrix and spore germination in some plant pathogens. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 84, p. 661-667, 1985.

LUO, Y.; MA, Z.; MICHAILIDES, T.J. Analysis of factors affecting latent infection and sporulation of *Monilinia fructicola* on prune fruit. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, p. 999-1003, 2001.

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. **Goiaba do plantio ao consumidor: tecnologia de produção, pós-colheita, comercialização**. Porto Alegre: Cinco Continentes. 2001. 124 p.

MARTIN, J.T. Role of cuticle in the defense against plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 2, p. 81-100, 1964.

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

PRUSKY, D.; WATTAD, C.; KOBILER, L. Effect of ethylene on activation of lesion development from quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 9, p. 864-868, 1996.

ROTEM, J. Climate and weather influence on epidemics. In: HORSFALL, J.G.; DIMOND, A.E. **Plant disease: how disease develops in populations**. New York: Academic, 1978. p. 317-436.

SILVEIRA, N.S.S.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R.; TAVARES, L.A.; MAIA, L.C. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 33-38, 2001.

SIMMONDS, J.H. Studies in the latent phase of *Colletotrichum* species causing ripe rots of tropical fruits. **Queensland Journal of Agricultural Science**, Brisbane, v. 20, p. 373-424, 1963.

SOMMER, N.F. Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 7, p. 331-339, 1985.

STAHMANN, M.A.; CLARE, B.G.; WOODBURY, W. Increased disease resistance and enzyme activity induced by ethylene and ethylene production by black rot infected sweet potato tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 41, p. 1505-1512, 1966.

TIMOSSI, A.J.; GOES, A.; KUPPER, K.C.; BALDASSARI, R.B.; REIS, R.F. Influência da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 489-494, 2003.

TOZETTO, L.J.; RIBEIRO, W.R.C. Ocorrência de podridão em frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), causada por *Phyllosticta* sp., em Brasília DF. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 160, 1993. Abstract.

_____. Tratamento pós-colheita de goiaba (*Psidium guajava*, L.) contra podridão de *Guignardia psidii*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 20, p. 229-234, 1998.

ULLASA, B.A.; RAWAL, R.D. *Guignardia* fruti rot of guava: a new disease from Bangalore. **Current Science**, Bangalore, v. 53, p. 435-436, 1984.

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

VAN DER AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 5, p. 1-105, 1973.

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

WYNN, W.K. Tropic and taxic responses of pathogens to plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 19, p. 237-255, 1981.

3 PRÉ-PENETRAÇÃO DE *Guignardia psidii* EM GOIABA: EFEITO DA TEMPERATURA, DURAÇÃO DO MOLHAMENTO E IDADE DO FRUTO

Resumo

A produção de goiaba para consumo *in natura* vem sendo afetada pela pinta preta provocada pelo fungo *Guignardia psidii* Ullasa e Rawal (*Phyllosticta psidiicola* (Petrak) van der Aa), gerando perdas pós-colheita. Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito da temperatura, da duração do período de molhamento e de diferentes idades dos frutos de goiabeira sobre a pré-penetração de conídios de *G. psidii*. Os estudos *in vitro* foram avaliados por meio de microscópio de luz e os *in vivo* por meio de microscópio eletrônico de varredura. O efeito da temperatura (10 a 40°C) e da duração do período de molhamento (6 a 48 horas *in vitro* e 6 a 24 horas *in vivo*) na germinação, formação de apressório e apressório melanizado (*in vitro*) foram avaliados. Nos experimentos *in vitro*, alíquotas de 40 µL de suspensão de 10⁵ conídios/mL foram depositadas em superfícies de poliestireno, as quais foram colocadas em caixas gerbox e mantidas sob as diferentes temperaturas e períodos de molhamento. Nos experimentos *in vivo*, alíquotas de 30 µL de suspensão com 10⁵ conídios/mL foram depositadas na superfície de frutos de goiabeira, os quais foram acondicionados em caixas plásticas e mantidos sob as diferentes temperaturas e períodos de molhamento. Em seguida, a germinação e formação de apressórios foram avaliadas em cinco diferentes idades de frutos: 10 dias, 35 dias, 60 dias, 85 dias e 110 dias. A metodologia para inoculação dos frutos foi a mesma anteriormente descrita. Os frutos foram mantidos a 25°C e duração de período de molhamento de 24 horas. Observou-se, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o aumento gradual da germinação, formação de apressórios e apressórios melanizados (*in vitro*) à medida que se aumentou a temperatura. Todas as variáveis atingiram o máximo a 25°C e duração de período de molhamento de 24 horas *in vivo* e 48 horas *in vitro*, correspondendo aos valores de 38% de conídios germinados, 37,7% de apressórios formados e 32,7% de apressórios melanizados *in vitro* e 45,6% de conídios germinados e 11,2% de apressórios formados *in vivo*. A partir de 25°C, houve decréscimo em todas as variáveis analisadas. A taxa de germinação foi maior no experimento *in vivo*, no entanto a formação de apressórios foi menor. Observou-se o aumento gradual das variáveis avaliadas com o aumento da idade do fruto, apresentando, em frutos com 10 dias 8,4% de conídios germinados e 3,2% de apressórios formados, enquanto os frutos com 110 dias apresentaram 43,2% de conídios germinados e 26,4% de apressórios formados. Assim, a temperatura, duração do período de molhamento e a idade do fruto revelaram-se como importantes fatores que influenciam a fase de pré-penetração de *G. psidii* em goiaba.

Palavras-chave: Goiaba; *Guignardia psidii*; Pré-penetração; Temperatura; Molhamento; Idade dos frutos

PRE-PENETRATION OF *Guignardia psidii* IN GUAVA: EFFECT OF TEMPERATURE, WETNESS DURATION AND FRUIT AGE

Abstract

Production of guava fruit for *in natura* consumption has been affected by the black spot caused by the fungus *Guignardia psidii* Ullasa and Rawal (*Phyllosticta psidiicola* (Petrak) van der Aa), generating postharvest losses. This work had the objective to determine the effect of temperature, duration of wetness and guava fruit age over the pre-penetration of *G. psidii*. The *in vitro* studies were evaluated by light microscope and the *in vivo* studies by scanning electron microscope. The effect of temperature (10 a 40°C) and duration of wetness (6 to 48 hours *in vitro* and 6 to 24 hours *in vivo*) in germination, appressoria formation and melanized appressoria (*in vitro*) were evaluated. In the *in vitro* experiments, aliquots of 40 µL conidial suspension with 10⁵ conidia/mL were deposited on the surface of polystyrene Petri dishes, which where placed in plastic boxes and maintained under the different temperatures and wetness periods. In the *in vivo* experiments, aliquots of 30 µL conidial suspension with 10⁵ conidia/mL were deposited on the fruits surfaces, which were placed in plastic boxes and maintained under the different temperatures and wetness periods. Afterwards, germination and appressoria formation were evaluated in five different ages of the fruits: 10 days, 35 days, 60 days, 85 days and 110 days. The methodology for the fruits inoculation was the same of the previously described. The fruits were maintained at 25°C and duration of wetness of 24 hours. It was observed, both *in vitro* and *in vivo*, a gradual increase in germination, appressoria formation and melanized appressoria (*in vitro*) as the temperature increased. All the variables reached the maximum at 25°C and duration of wetness of 24 hours *in vivo* and 48 hours *in vitro*, corresponding to the values of 38% germinated conidia, 37.7% formed appressoria and 32.7% melanized appressoria *in vitro* and 45.6% germinated conidia and 11.2% formed appressoria *in vivo*. Temperatures above 25°C decreased the variables analyzed. The germination rate was higher in the *in vivo* experiment, however the appressoria formation was lower. It was observed a gradual increase in the analyzed variables with the increase of the age of the fruit, presenting, in fruits with 10 days, 8.4% germinated conidia and 3.2% formed appressoria, while fruits with 110 days presented 43.2% germinated conidia and 26.4% formed appressoria. Therefore, temperature, duration of wetness and age of the fruit showed to be important factors that influence the pre-penetration phase of *G. psidii* in guava fruit.

Keywords: Guava; *Guignardia psidii*; Pre-penetration; Temperature; Wetness period; Fruit Age

3.1 Introdução

A goiaba destaca-se por apresentar excelente qualidade nutricional, o que tem contribuído para o consumo *in natura* deste fruto. No estado de São Paulo, as principais variedades produzidas para obtenção de frutos de mesa são Kumagai, Pedro Sato e Sassaoka (GUITERREZ; WATANABE; SCHMIDT, 2002). A pinta preta, provocada pelo fungo *Guignardia psidii* e o anamorfo *Phyllosticta psidiicola* foi relatada, recentemente, em elevada porcentagem em goiabas provenientes da região produtora de Campinas, no estado de São Paulo. A incidência média do fungo *G. psidii* em frutos da variedade Kumagai foi de 18,6% de janeiro a novembro de 2005, atingindo pico de incidência de 58% em abril (AMARAL et al., 2006).

Os sintomas da doença constituem-se em lesões deprimidas, as quais se desenvolvem de forma concêntrica, apresentando cor variando de preto-esverdeado a marrom-escuro, e que podem apresentar frutificações do fungo, geralmente conidiomas picnidiais. As lesões ocorrem em qualquer área do fruto, podendo posteriormente coalescer. A infecção por *G. psidii* ocorre ainda nos frutos jovens permanecendo em estado quiescente, até a maturidade (TOZETTO; RIBEIRO, 1993, 1998).

Diversos fatores podem influenciar na fase de infecção de fitopatógenos em hospedeiros, entre estes se destacam a temperatura, o molhamento e a idade da planta ou órgão da mesma. O estudo da interação entre esses fatores e a fase de infecção pode colaborar gerando medidas de controle mais eficazes e apropriadas. A temperatura tem mostrado em diferentes patossistemas, grande influência nos períodos de incubação e de latência, na frequência de infecção, tamanho da lesão e na severidade. Já a umidade mostra o maior efeito na frequência de infecção, esporulação e período infeccioso (ROTEM; COHEN; BASHI, 1978; ROTEM, 1978). Em experimentos *in vitro* a melhor faixa de temperatura para germinação de *Monilinia laxa*, agente causal da podridão parda em cerejas, foi entre 15 e 25°C. A germinação foi evidente depois de 2 a 4 horas e foi melhor na presença de água, apesar da germinação ter ocorrido na ausência de umidade. No entanto, a ausência de umidade reduziu a germinação e o processo foi fortemente atrasado (TAMM; FLUCKIGER, 1993). Já o fungo *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda também em frutos de cerejeira e em frutos de pessegueiro, apresentou faixa de temperatura ótima para infecção dos frutos, respectivamente, entre 20 a 22,5°C e 22,5 a 25°C. Além disso, ambos os

frutos tiveram maior incidência de infecção por *M. fructicola* à medida que se aumentou a duração do período de molhamento (BIGGS; NORTHOVER, 1988).

Infecções quiescentes parecem ocorrer devido a condições fisiológicas adversas impostas pelo hospedeiro. Entre alguns mecanismos utilizados para explicar a resistência de frutos imaturos ao ataque do fungo incluem a falta de nutrientes disponíveis, a presença de compostos antifúngicos pré-formados, presença de compostos antifúngicos que podem ser induzidos e falta de fatores os quais estimulem a patogenicidade do fungo (BENO-MOUALEM; PRUSKY, 2000). Swinburne e Brown (1983) demonstraram que o patógeno *Colletotrichum musae*, causador da antracnose em banana, evitou a exposição a compostos antifúngicos ao assegurar que parte dos apressórios permanecesse quiescentes. Além disso, diversos fatores físicos podem estar relacionados com a quiescência. Biggs e Northover (1989) relataram que a resistência de cerejas a infecção por *Monilinia fructicola* estava correlacionada com a grossura da cutícula e das células da parede.

A idade do hospedeiro no momento da infecção pode influenciar os processos de pré-infecção e infecção de diversos fungos fitopatogênicos. Infecções geralmente se tornam ativas quando o fruto amadurece. A infecção pode ocorrer vários dias ou semana antes dos sintomas aparecerem (JARVIS, 1994). Mari et al. (2003) relatam três estágios em pêssgo e damasco com diferentes suscetibilidades ao fungo *Monilinia laxa*, agente causal da podridão parda. No primeiro estágio a suscetibilidade dos frutos ao fungo foi alta, mas diminuiu no segundo estágio durante o qual ocorre o endurecimento do caroço e no terceiro estágio, que correspondeu de 4 a 5 semanas antes do amadurecimento dos frutos, a suscetibilidade ao fungo aumentou. Frutos de macieira nos estádios iniciais de desenvolvimento se mostraram altamente suscetíveis a sarna da macieira, provocada pelo fungo *Venturia inaequalis* e tornaram-se gradativamente mais resistentes com o amadurecimento (XU; ROBINSON, 2005).

Deste modo, este trabalho buscou estender os conhecimentos com relação ao processo infeccioso da pinta preta, por meio do estudo da influência da temperatura, duração do molhamento e idade dos frutos de goiabeira sobre a fase de pré-penetração de conídios de *G. psidii*.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia e no Laboratório do Núcleo de Apoio à Pesquisa / Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Universidade de São Paulo, campus “Luiz de Queiroz” na cidade de Piracicaba, no estado de São Paulo.

3.2.2 Obtenção e manutenção do isolado de *G. psidii*

Os experimentos foram realizados com a forma anamórfica do fungo *Guignardia psidii*, denominada *Phyllosticta psidiicola*. O isolado foi obtido de frutos doentes em campo comercial no município de Campinas, no estado de São Paulo e identificado com base na literatura e por meio do postulado de Koch. O isolado de *G. psidii* foi cultivado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e mantido em câmara de crescimento modelo E7 (Conviron, Canadá), a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sob alternância de luz (12 horas claro/12 horas escuro).

3.2.3 Avaliação do efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de *G. psidii* *in vitro*

Conídios de *G. psidii* foram obtidos de colônias de 10 dias, cultivadas em meio BDA, a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sob alternância de luz (12 horas claro/12 horas escuro). Com auxílio de pincel e água destilada autoclavada, conídios de *G. psidii* foram removidos da superfície das colônias. Em seguida, a suspensão obtida foi filtrada em gaze esterilizada para retirar fragmentos de micélio e centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se novamente água destilada estéril para ressuspender os conídios precipitados. A suspensão foi calibrada para 10^5 conídios/mL com auxílio da câmara de Neubauer.

A centrifugação objetivou remover parte da matriz mucilaginosa que envolve os conídios. Experimentos realizados previamente demonstraram que este processo permitiu aumento na porcentagem de conídios germinados de *G. psidii*, facilitando assim os estudos realizados.

Alíquotas de 40 µL de suspensão de conídios foram depositadas na superfície de placas de Petri de poliestireno. As placas foram mantidas em caixas gerbox forradas com 3 folhas de papel filtro umedecidas com 15 mL de água destilada, para a obtenção de ambiente saturado de umidade.

As caixas gerbox permaneceram em câmara de crescimento, nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C e períodos contínuos de molhamento de 6, 12, 24, 36 e 48 horas, em escuro contínuo. Transcorrido cada tempo, a germinação dos conídios foi interrompida adicionando-se 15 µL de lactoglicerol em cada gota.

Em microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Alemanha) foram registradas imagens dos conídios para estudo e contados 100 conídios por gota, em aumento de 400 vezes, avaliando-se as porcentagens de conídios germinados, apressórios formados e apressórios melanizados. O conídio foi considerado germinado quando o tubo germinativo excedeu a metade do diâmetro do esporo.

Os dados obtidos foram analisados por meio de regressões não-lineares, utilizando-se o programa STATISTICA versão 6.0 (Stat Soft, EUA). Os dados foram ajustados ao modelo beta-monomolecular $Y = (B1 * ((T - B2)^{B3}) * ((B4 - T)^{B5})) * (B6 * (1 - B7 * \exp(-B8 * M)))$, onde Y representa a variável analisada, T representa a temperatura, M representa a duração do período de molhamento, B2 e B4 correspondem, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima, B1, B3, B5, B6, B7 e B8 são parâmetros da equação, sem significado biológico.

O experimento foi realizado duas vezes, com seis repetições para cada tratamento. Os valores apresentados correspondem ao primeiro experimento realizado.

3.2.4 Obtenção dos frutos de goiabeira

As goiabas utilizadas nos tratamentos pertencem à variedade 'Kumagai' e foram obtidas junto a produtor da região de Campinas, no estado de São Paulo. Os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos, lavados em água corrente e deixados para secar

em temperatura ambiente, para posteriormente realizar os procedimentos de inoculação na superfície dos frutos.

3.2.5 Avaliação do efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de *G. psidii* em goiaba

Conídios de *G. psidii* foram obtidos e a suspensão calibrada como descrito no item 3.2.3. A inoculação foi feita por meio de deposição de alíquotas de 30 µL da suspensão na superfície dos frutos de goiabeira em maturidade fisiológica, que consiste o estágio de desenvolvimento em que o fruto continuará a ontogenia, mesmo que destacado da planta (WATADA et al., 1984). A suspensão foi depositada em círculos de 0,5 cm de diâmetro, previamente demarcados, com o auxílio de adesivos plásticos.

Para cada tratamento utilizaram-se 5 frutos, acomodados em bandeja plástica previamente desinfestada com álcool 70%. Próximo aos frutos foi deixado um chumaço de algodão umedecido para obtenção de ambiente saturado em água. As bandejas foram fechadas com filme plástico transparente e permaneceram em BOD nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C e períodos contínuos de molhamento de 6, 12 e 24 horas, em escuro contínuo.

Após estes períodos, amostras de tecidos inoculados foram retiradas com auxílio de bisturi, e processadas para análise sob microscópio eletrônico de varredura (MEV), seguindo a metodologia descrita por Kitajima e Leite (1999).

Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras circulares, com cerca de 0,5 cm de diâmetro e 2-3 mm de espessura foram fixadas em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2%; CaCl₂ 0,001 M e tampão cacodilato 0,05 M) por, no mínimo, 2 horas. Após este procedimento, as amostras foram lavadas três vezes de 10 minutos cada em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7 e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram imersas três vezes de 10 minutos cada em água destilada, seguidas de desidratação em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 10 minutos em cada concentração. Na concentração de 100% o procedimento foi realizado três vezes. Em seguida, as amostras foram secas ao ponto crítico por meio de imersão dos fragmentos em gás carbônico líquido, em aparelho de ponto crítico modelo CPD 030 (Balzers, Lichtenstein) e posterior fixação em suportes de alumínio (*stubs*) com fita dupla face de

carbono. Após este processo, os *stubs* com as amostras foram metalizados com vapor de ouro em aparelho metalizador modelo MED 010 (Balzers Union, Lichtenstein), a 50 mA, por 180 segundos. As observações foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 435 VP (Zeiss, Inglaterra). Foram registradas imagens dos conídios para estudo e a avaliação correspondeu a contagem de 100 conídios por amostra, avaliando-se as porcentagens de conídios germinados e apressórios formados. O conídio foi considerado como germinado quando o tubo germinativo excedeu a metade do diâmetro do mesmo.

Os dados obtidos foram analisados por meio de regressões não-lineares, utilizando-se o programa STATISTICA versão 6.0 (Stat Soft, EUA) e foram ajustados ao modelo beta-monomolecular descrito no item 3.2.3.

O experimento foi realizado duas vezes, com 5 repetições para cada tratamento. Os valores apresentados correspondem ao primeiro experimento realizado.

3.2.6 Avaliação da pré-penetração de conídios de *G. psidii* em diferentes idades de frutos de goiabeira

Frutos de goiabeira com cinco diferentes idades foram coletados. As idades dos frutos corresponderam a aproximadamente 10 dias, 35 dias, 60 dias, 85 dias e 110 dias (diâmetros aproximados de 1, 2, 3, 5 e 7 cm, respectivamente) após a queda das pétalas (Figura 1).

Figura 1 – Frutos de goiabeira de 5 diferentes faixas de idades. Da esquerda para direita: frutos com 10 dias, com 35 dias, com 60 dias, com 85 dias, com 110 dias

Alíquotas de 30 μ L de suspensão de conídios de *G. psidii* obtidas e calibradas como descrito no item 3.2.3 foram depositadas na superfície dos frutos, como descrito no item 2.2.5. Cada tratamento foi acomodado em bandeja plástica como descrito no item 2.2.5 e permaneceram

em incubadora na temperatura de 25°C e duração de período de molhamento de 24 horas, condições estas pré-estabelecidas por meio do experimento anterior.

Transcorrido este período, as amostras foram retiradas com auxílio de bisturi e preparadas para visualização em MEV, seguindo a metodologia descrita por Kitajima e Leite (1999) citada no item 2.2.5. Foram registradas imagens dos conídios para estudo e a avaliação correspondeu a contagem de 100 conídios por amostra, avaliando-se as porcentagens de conídios germinados e apressórios formados.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa PlotIT versão 3.2 (Scientific Programming Enterprises, EUA).

O experimento foi realizado duas vezes, com 5 repetições por tratamento. Os valores apresentados correspondem ao primeiro experimento realizado.

3.3 Resultados

3.3.1 Avaliação do efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de *G. psidii* *in vitro*

A equação se ajustou ao comportamento da germinação, formação de apressórios e apressórios melanizados de conídios de *G. psidii* em relação ao período de molhamento e temperatura testados (Tabela 1). A superfície de resposta para estimar a germinação dos conídios foi descrita pela função $Y = ((6,165) * ((T - (6,718))^{(2,276)}) * (((41,463) - T)^{(1,423)})) * ((0,005) * (1 - (0,993) * \exp(-(0,431e-3) * M)))$. A superfície de resposta para a formação de apressórios foi descrita pela função $Y = ((0,323e-5) * ((T - (10))^{(3,554)}) * (((43,414) - T)^{(3,26)})) * ((0,202) * (1 - (0,981) * \exp(-(0,006) * M)))$. O comportamento da melanização dos apressórios obedeceu a função $Y = ((0,323e-5) * ((T - (10))^{(3,554)}) * (((43,414) - T)^{(3,26)})) * ((0,202) * (1 - (0,981) * \exp(-(0,006) * M)))$. Para todas as funções acima descritas, Y é a variável analisada, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas.

O parâmetro B_5 desta equação está relacionado à forma da curva e pode ser utilizado para determinar a amplitude do intervalo de temperatura ótima para cada variável analisada (BASSANEZI et al. 1998). Valores pequenos (próximo a zero) indicam que o componente em estudo apresenta valor máximo em uma ampla faixa de temperatura ao redor da ótima. Observou-

se que, entre as 3 variáveis analisadas, o menor valor obtido para B5 foi para a germinação de conídios, demonstrando que o intervalo de temperatura ótimo para germinação foi mais amplo quando comparado ao das variáveis formação de apressórios e apressórios melanizados (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores dos parâmetros e dos coeficientes de determinação do modelo beta-monomolecular $Y=(B1*((T-B2)^{B3})*((B4-T)^{B5})*(B6*(1-B7*\exp(-B8*M))))$, onde Y representa as fases da pré-penetração analisadas, T representa a temperatura, M representa a duração do período de molhamento, B2 e B4 correspondem, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima, B1, B3, B5, B6, B7 e B8 são parâmetros da equação, sem significado biológico

Fases da pré-penetração (Y)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	R ²
Germinação	6,165	6,718	2,276	41,463	1,423	5.10^{-3}	0,993	4.10^{-4}	0,934
Apressórios	3.10^{-6}	10	3,554	43,414	3,26	0,202	0,981	6.10^{-3}	0,965
Apressórios melanizados	0,179	10	4,282	41,898	3,702	6.10^{-7}	1,004	0,002	0,968

À medida que se aumentou a temperatura e o período de molhamento, observou-se aumento gradual na porcentagem de germinação (Figura 2), formação de apressórios (Figura 3) e apressórios melanizados (Figura 4). Estas variáveis atingiram o máximo a 25°C e duração de período de molhamento de 48 horas, que corresponderam a 38% de conídios germinados, 37,7% de apressórios formados e 37,2% de apressórios melanizados. A partir de 25°C, houve decréscimo nas variáveis avaliadas. A germinação, formação de apressório e apressório melanizado elevaram-se à medida que se aumentou a duração período de molhamento. A faixa de temperatura favorável à germinação, formação de apressórios e apressórios melanizados foi entre 25 e 30°C, pois apenas nestas temperaturas as variáveis apresentaram médias superiores a 30% com 48 horas de molhamento (Anexo C). A 10, 15 e 40°C houve baixa porcentagem de germinação, atingindo médias, respectivamente, de 7,9%, 9,3% e 3,3% com 48 horas de duração do molhamento. As formações de apressórios e de apressórios melanizados apresentaram níveis muito baixos a 10 e 15°C, atingindo médias, respectivamente, de 1,3% e 5,3% de apressórios formados e 0,3% e 3,7% de apressórios melanizados com 48 horas de duração de molhamento. A 40°C não foi observada a formação de apressórios.

Figura 2 – Superfície de resposta da germinação de conídios de *Guignardia psidii*, em função da temperatura e do período de molhamento *in vitro*, descrita pela função $Y = ((6,165) * ((T - (6,718))^{2,276}) * (((41,463) - T)^{1,423})) * ((0,005) * (1 - (0,993) * \exp(-(0,431e-3) * M)))$, em que Y é a porcentagem de germinação dos conídios, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas

Figura 3 – Superfície de resposta da formação de apressórios por conídios de *Guignardia psidii*, em função da temperatura e do período de molhamento *in vitro*, descrita pela função $Y = ((0,323e-5) * ((T - (10))^{3,554}) * (((43,414) - T)^{3,26})) * ((0,202) * (1 - (0,981) * \exp(-(0,006) * M)))$, em que Y é a média de apressórios, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas

Figura 4 – Superfície de resposta da formação de apressórios melanizados por conídios de *Guignardia psidii*, em função da temperatura e do período de molhamento *in vitro*, descrita pela função $Y = ((0,179) * ((T - (10))^{(4,282)}) * (((41,898) - T)^{(3,703)})) * ((0,603e-6) * (1 - (1,004) * \exp(-(0,002) * M)))$, em que Y é a porcentagem de apressórios melanizados, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas

Verificou-se que os conídios de *G. psidii* apresentam formato ovalado, hialinos, unicelulares, granulados com dimensões variando de 7 a 10 µm por 5 a 7 µm. Cada conídio gerou apenas um apressório ou tubo germinativo, o qual geralmente terminou em um apressório, na maioria dos casos melanizado e de formato globoso a oval (Figura 5). Além disso, visualizou-se a 35°C a presença de conídios com apressórios apresentando alterações morfológicas quando comparado aos apressórios formados nas demais temperaturas (Figura 5 N e U).

Figura 5 – Aspecto dos conídios de *Guignardia psidii* submetidos a diferentes períodos de molhamento e temperaturas. Com 12 horas de período de molhamento, as temperaturas 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C (A a G respectivamente). Com 24 horas de período de molhamento, as temperaturas 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C (H a O respectivamente). Com 48 horas de período de molhamento, as temperaturas 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C (P a V respectivamente). Observados em microscópio de luz, aumento de 400x, barra = 20 μ m

3.3.2 Avaliação do efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de *G. psidii* em goiaba

O modelo beta-monomolecular se ajustou ao comportamento da germinação e formação de apressórios de conídios de *G. psidii* em relação ao período de molhamento e temperatura testados (Tabela 2). A superfície de resposta para estimar a germinação dos conídios pôde ser descrita pela função $Y = ((1,03) * ((T - (2,076))^{(2,429)}) * (((46,534) - T)^{(2,124)})) * ((0,279e-4) * (1 - (16,405) * \exp(-(0,651) * M)))$. A superfície de resposta para explicar a formação de apressórios foi descrita pela função $Y = ((0,351e-4) * ((T - (10))^{(4,276)}) * (((40,002) - T)^{(3,532)})) * ((0,176e-3) * (1 - (4,694) * \exp(-(0,385) * M)))$. Em ambas as funções, Y é a variável analisada, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas. Observou-se valor menor de B5 para a germinação, demonstrando que o intervalo ótimo de temperatura para germinação foi mais amplo quando comparado ao da formação de apressórios (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores dos parâmetros e dos coeficientes de determinação do modelo beta-monomolecular $Y=(B1*((T-B2)^{B3})*((B4-T)^{B5})*(B6*(1-B7*\exp(-B8*M))))$, onde Y representa as fases da pré-penetração analisadas: germinação e formação de apressórios de conídios de *Guignardia psidii*, T representa a temperatura, M representa a duração do período de molhamento, B2 e B4 correspondem, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima, B1, B3, B5, B6, B7 e B8 são parâmetros da equação, sem significado biológico

Fases da pré-penetração (Y)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	R ²
Germinação	1,03	2,076	2,429	46,534	2,124	3.10^{-5}	16,405	0,651	0,826
Apressórios	3.10^{-5}	10	4,276	40,002	3,532	2.10^{-4}	4,694	0,385	0,644

Com o aumento da temperatura e do período de molhamento, observou-se o aumento gradual da porcentagem de germinação (Figura 6) e formação de apressório (Figura 7) *in vivo*. Estas variáveis atingiram o máximo a 25°C e duração de período de molhamento de 24 horas, que corresponderam aos valores médios de 45,6% de conídios germinados e 11,2% de apressórios formados. A partir de 25°C, houve decréscimo nas variáveis avaliadas. Tanto a germinação quanto a formação de apressório elevaram-se à medida que se aumentou a duração do molhamento. A faixa de temperatura favorável a germinação foi entre 20°C a 30°C, pois somente entre estas temperaturas esta variável atingiu média superior a 30% com 24 horas de molhamento (Anexo A3). Nesta faixa de temperatura, a média de conídios germinados ultrapassou 40% apenas a 25°C, sendo, portanto a melhor temperatura para esta variável. A 15°C e 35°C a germinação atingiu média de cerca de 20% e a 10°C e 40°C de cerca de 10% com 24 horas de molhamento. Já a formação de apressório apresentou faixa favorável entre 25°C e 30°C (Anexo A4), pois somente nestas temperaturas esta variável ultrapassou a média de 6% com 24 horas de molhamento. A temperatura de 25°C foi a mais adequada, apresentando média superior a 11% de apressórios formados a 24 horas de molhamento.

Figura 6 – Superfície de resposta da germinação de conídios de *Guignardia psidii*, em função da temperatura e do período de molhamento *in vivo*, descrita pela função $Y = ((1,03) * ((T - 2,076)^{2,429}) * (((46,534) - T)^{2,124})) * ((0,279e-4) * (1 - (16,405) * \exp(-0,651 * M))))$, em que Y é a porcentagem de germinação dos conídios, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas

Figura 7 – Superfície de resposta da formação de apressórios por conídios de *Guignardia psidii*, em função da temperatura e do período de molhamento *in vivo*, descrita pela função $Y = ((0,351e-4) * ((T - 10)^{4,276}) * (((40,002) - T)^{3,532})) * ((0,176e-3) * (1 - (4,694) * \exp(-0,385 * M))))$, em que Y é a porcentagem de apressórios formados, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas

Em geral, em todas as temperaturas estudadas notaram-se conídios de formato ovalado, que emitem apenas um apressório ou tubo germinativo, o qual pode terminar em apressório, geralmente de formato globoso a oval (Figura 9C). A presença do apêndice apical nos conídios, característica presente nesta espécie foi visualizada (Figura 8). Não se observou orientação do crescimento dos tubos germinativos para locais específicos da superfície do fruto (Figura 9E), ocorrendo aparentemente penetração direta na cutícula do fruto por meio dos apressórios. Outra observação importante foi a emergência do tubo germinativo a partir de qualquer região do conídio, não havendo local específico para tal, porém sempre formando-se próximo a região de contato com o substrato. Com a formação do apressório e a transferência do conteúdo protoplasmático do conídio para este, ocorreu, na maioria das vezes, o colapso do conídio e do tubo germinativo quando presente (Figura 9D). Na temperatura de 35°C não foi verificada a presença de alterações morfológicas nos apressórios, como foi observada *in vitro* (Figura 9F).

Figura 8 - Aspecto de conídio de *Guignardia psidii* em microscópio eletrônico de varredura. (A) barra = 10µm; (B) barra = 5 µm

Figura 9 – Aspecto dos conídios de *Guignardia psidii* em microscópio eletrônico de varredura, com 24 horas de período de molhamento submetidos as temperaturas 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C (A a G respectivamente), barra = 20 μm

3.3.3 Avaliação da pré-penetração de conídios de *G. psidii* em diferentes idades de frutos de goiabeira

Observou-se o aumento gradual da porcentagem de germinação e formação de apressório com o aumento da idade da goiaba inoculada (Figura 10). A média de conídios germinados e apressório formados na idade de 10 dias foram, respectivamente, de 8,4% e 3,2% (Figura 11A e B), elevando-se gradativamente com o aumento da idade do fruto. Ao final, frutos com maturidade fisiológica (com 110 dias) apresentaram média final de 43,2% de conídios germinados e 26,4% de apressórios formados (Figura 11I e J).

À medida que a idade dos frutos aumentou, observaram-se nítidas mudanças em suas superfícies. A superfície dos frutos mais jovens (10 dias) apresentou-se mais irregular e com maior quantidade de tricomas quando comparada à superfície de frutos com mais idade (Figura 12).

Figura 10 – Germinação e formação de apressórios de conídios de *Guignardia psidii* em diferentes idades de fruto de goiabeira

Figura 11 - Aspecto dos conídios de *Guignardia psidii* em microscópio eletrônico de varredura a 25°C e 24 horas de período de molhamento sobre a superfície de frutos com 10 dias (A e B), 35 dias (C e D), 60 dias (E e F), 85 dias (G e H) e 110 dias (I e J); barra = 20 μ m

Figura 12 - Aspecto em microscópio eletrônico de varredura da superfície dos frutos de goiabeira com 10 dias (A), 35 dias (B), 60 dias (C), 85 dias (D) e com 110 dias (E); barra = 50 μ m

3.4 Discussão

A temperatura, a duração do período de molhamento e a idade do fruto se mostraram importantes fatores, afetando a fase de pré-penetração de *G. psidii*. A germinação e a formação de apressório dos conídios apresentaram, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, superfícies de resposta semelhantes nas quais se observou o aumento gradual da porcentagem de germinação e formação de apressório a partir de 10°C, atingindo máximo a 25°C e decaindo até 40°C. Tal resultado leva a concluir que entre as temperaturas testadas, 25°C corresponde à temperatura favorável à pré-penetração de conídios de *G. psidii*. A maioria dos patógenos cresce melhor a temperaturas entre 24 a 26°C (BROWN, 1922) e geralmente, a melhor temperatura para formação de apressório coincide com aquela para a germinação do esporo (ISHIDA; AKAI, 1969; MIEHLE; LUKEZIC, 1972; SKOROPAD, 1967).

Tozetto (1995) estudou a influência da temperatura sobre a germinação de conídios de *G. psidii* em folhas de celofane. O autor verificou o aumento do índice de germinação dos conídios a partir de 14°C, atingindo melhor índice na faixa entre 21 e 28°C, e decaindo a 35°C. Estes resultados concordam com a faixa favorável à germinação obtida neste estudo. Os resultados obtidos neste trabalho também foram similares aos obtidos em testes *in vitro* com conídios de *Guignardia bidwellii* (*Phyllosticta ampellicida*), agente causador da podridão preta da uva. Neste caso, observou-se o aumento progressivo da porcentagem de germinação na faixa entre 15 a 30°C, seguido de decréscimo rápido em temperaturas acima de 30°C (CALTRIDER, 1961). A superfície de resposta de apressórios formados em testes *in vitro* com conídios de *Guignardia citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*), agente causal da mancha preta dos citros, demonstrou maior porcentagem de apressórios formados a 30°C (NORONHA, 2002), valor próximo ao obtido para *G. psidii*, o qual foi 25°C. Estrada, Dodd e Jeffries (2000) obtiveram resultados similares de taxa de apressórios melanizados *in vitro* e na superfície de frutos de mangueira para *C. gloeosporioides*, com maior porcentagem a 30°C que a temperaturas inferiores, porém a frequência de pegs de penetração foi mais alta a 25°C. Sobre a faixa de temperatura favorável a formação de apressórios de *G. psidii*, Tozzeto (1995) não verificou diferenças significativas nas temperaturas de 21, 28 e 35°C em folhas de celofane, apresentando assim faixa favorável mais ampla que a obtida neste estudo.

Com relação às superfícies de resposta geradas por *G. psidii* *in vivo*, observa-se semelhança em relação ao relatado por Spotts (1977). O autor observou aumento progressivo da

porcentagem de infecção de folhas de uva por conídios de *G. bidwellii* na faixa entre 10 a 26,5°C, seguido de decréscimo da mesma em temperaturas acima de 26,5°C. Entretanto, temperaturas mais amenas foram favoráveis para ocorrer a infecção do fungo *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda, em frutos de pessegueiro e cerejeira. A melhor temperatura para infecção de *M. fructicola* em cereja foi entre 20 a 22,5°C e de 22,5 a 25°C em pêssogo (BIGGS; NORTHOVER, 1988).

Apesar da temperatura mais adequada para germinação de *G. psidii* *in vitro* e *in vivo* ter sido a mesma (25°C) com 24 horas de molhamento (AnexoB1), a média da porcentagem de germinação *in vitro* de conídios de *G. psidii* foi expressivamente menor que a média obtida no experimento *in vivo*, cujos valores foram respectivamente 20,8% e 45,6%. Muitos estudos são realizados *in vitro* sob condições controladas e em água destilada esterilizada, os quais permitem a manipulação e observação de estruturas delicadas durante o processo de pré-infecção e infecção, porém tais condições não representam o estado natural (HOWARD, 1994). A diferença entre a germinação *in vitro* e *in vivo*, permite concluir que há influência de estímulos exógenos, presentes nos frutos maduros, na germinação dos conídios de *G. psidii*. Em frutos de abacateiro, por exemplo, a cera presente na superfície do fruto induziu a germinação e formação de apressório de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose (PODILA; ROGERS; KOLATTUKUDY, 1993). Em frutos maduros de tomateiro, abacateiro e bananeira, o gás etileno produzido pelos frutos induziu a germinação e formação de apressório de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae*, agentes causais da antracnose (FLAISHMAN; KOLLATUKUDY, 1994). No entanto, a germinação de conídios de *P. ampellicida* sobre folhas de uva assim como em superfície de poliestireno foi superior a 90% dentro do período de incubação de 60 a 90 minutos (KUO; HOCH, 1995). Buscando esclarecer os fatores que influenciam a germinação dos conídios de *P. ampellicida*, Kuo e Hoch (1996) demonstraram que a adesão dos conídios foi pré-requisito para a ocorrência da germinação e tal fixação foi dependente do molhamento ou hidrofobicidade do substrato.

No entanto, a formação de apressórios foi menor nos experimentos *in vivo* quando comparada aos experimentos *in vitro*. Enquanto nos experimentos *in vivo* essa variável apresentou média de 11,2%, nos experimentos *in vitro* correspondeu a 20,8% (Anexo B2) a 25°C e 24 horas de molhamento. Isso sugere que a formação de apressórios dependeu de estímulo diferente daquele relacionado à germinação dos conídios. De acordo com Emmett e Parbery

(1975), enquanto alguns autores afirmam que os fungos precisam da superfície de determinada planta para formar apressórios, outros demonstram obter igualmente bons resultados com a mesma espécie de fungo *in vitro*. Geralmente, apressórios se formam em hospedeiros suscetíveis e resistentes, em tecidos vivos ou mortos e em ampla faixa de hospedeiros e não hospedeiros. Embora a especificidade a superfície seja importante em alguns casos, geralmente parece não ser regra (EMMETT; PARBERY, 1975). Existem trabalhos que relacionam a formação de apressórios a estímulos físicos das superfícies sobre as quais o esporo germina. A dureza da superfície pode em alguns casos ser fundamental. Com o aumento da dureza da superfície, conídios germinados de *Colletotrichum phomoides* (*Colletotrichum coccodes*) produziram proporções cada vez maiores de apressórios (VAN BURGH, 1950). Este fato poderia explicar a maior formação de apressórios de *G. psidii* sobre o poliestireno.

Por meio do experimento *in vitro*, observou-se que a temperatura ótima e faixa favorável à melanização dos apressórios de conídios de *G. psidii*, as quais foram respectivamente 25°C e 25 a 30°C (Anexo C3). Diversos trabalhos demonstram a necessidade da melanização do apressório para que o processo de infecção seja bem sucedido. Apressórios de *Colletotrichum lagenarium*, por exemplo, apresentaram como requisito para penetração a biossíntese de melanina, sendo apressórios pigmentados e levemente pigmentados capazes de penetrar no substrato (KUBO et al., 1982; KUBO; FURUSAWA; SHISHIYAMA, 1987). Apressórios de *Magnaporthe grisea*, agente causal da brusone do arroz, tratados com inibidores da biossíntese da melanina se tornaram incapazes de penetrar no hospedeiro, demonstrando que a melanina confere patogenicidade ao facilitar o desenvolvimento de pressão elevada dentro do apressório (HOWARD; VALENT 1996; MONEY; HOWARD, 1996).

Sobre a duração do período de molhamento, observou-se que, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a germinação e a formação de apressório de conídios de *G. psidii* apresentaram as porcentagens elevadas à medida que se aumentou a duração do período de molhamento. Sendo, portanto necessário longo período de molhamento para o sucesso no processo de pré-penetração. O aumento da taxa de germinação com o aumento da duração do molhamento também foi observado em experimentos *in vitro* com conídios de *Potentialmyces pyri*, agente causal de podridão em pêra (LIU; XIAO, 2005). Em pêssegos e cerejas a incidência de infecção provocada por *Monilinia fructicola* também se elevou com o aumento da duração do período de molhamento (BIGGS; NORTHOVER, 1988).

No entanto, a porcentagem de germinação máxima não atingiu a média de 50% mesmo com a maior duração de molhamento estudada, a qual foi de 48 horas *in vitro* e 24 horas *in vivo*. Enquanto que, com apenas 10 horas de incubação, mais de 80% dos conídios de determinado isolado de *C. gloeosporioides* já haviam germinado em membrana de celofane, resultados estes similares aos obtidos em superfície de frutos de mangueira (ESTRADA; DODD; JEFFRIES, 2000). O requisito de maior período de molhamento pode ser devido a necessidade do patógeno de debilitar o tecido invadido, por meio de agentes tóxicos ou enzimáticos, e é possível que esta exigência seja mais comum em espécies patogênicas fracas. Entretanto, um período de molhamento longo também pode ser requerido para infecção de órgãos resistentes por espécies virulentas (ROTEM, 1994).

Com relação ao experimento envolvendo diferentes idades de frutos, verificou-se aumento gradual na germinação e formação de apressório de *G. psidii* com o aumento da idade do fruto, indicando que frutos com mais idade favorecem o processo de infecção. Diversos autores relataram que a proximidade da fase de amadurecimento de frutos favorece a expressão de infecções, as quais podem surgir também durante a pós-colheita ou a senescência (CRUICKSHANK; WADE, 1992; LUO et al., 2001; MARI et al., 2003; LUO; MICHAILIDES, 2003). Sob condições de campo, conídios de *C. gloeosporioides* dispersos pela chuva em superfícies do hospedeiro podem manter o potencial para infectar e causar antracnose em frutos de mangueira por período de várias semanas. Esses propágulos podem ser carregados para o estágio de pós-colheita onde podem germinar e causar lesões nos frutos. Conídios com capacidade de germinar foram retirados de superfícies de mangas maduras um mês após a colheita. Conídios dispersados durante a fase inicial de desenvolvimento do fruto podem ter menos chance de sobreviver já que são expostos a condições ambientais adversas por longo tempo. Entretanto, conídios depositados tardiamente em frutos em desenvolvimento podem persistir na superfície do hospedeiro, para infecções quiescentes ou após a colheita, onde o ambiente é normalmente favorável para o crescimento do patógeno (ESTRADA; DODD; JEFFRIES, 2000).

A germinação do conídio e a formação do apressório de *Colletotrichum piperatum* mostraram ser atrasadas na superfície de pimentões imaturos, mas não em frutos maduros (GROVER, 1971 apud PRUSKY, 1996). *Geotrichum candidum* produziu podridões em frutos de tomateiro maduros com coloração avermelhada, porém pouca ou nenhuma infecção em frutos

menos maduros (WELLS; SPALDING, 1975). Em cerejeiras, a suscetibilidade dos frutos a infecções pelo fungo *Monilinia laxa*, causador da podridão parda, aumentou com o amadurecimento do fruto (XU; BERTONE; BERRIE, 2007). Entretanto, conídios de *Colletotrichum musae* têm sido relatados germinando na superfície de frutos de bananeira verdes e maduros, porém o último estimulou maior formação de apressórios (PRUSKY; PLUMBLEY, 1992).

A baixa porcentagem de germinação e formação de apressórios em frutos com 10 dias de idade pode ter sido influenciada pela maior irregularidade e concentração de tricomas na superfície do fruto, que podem ter dificultado a fixação dos conídios. Os tricomas são divididos em tricomas glandulares ou não glandulares ou tectores. Os tricomas tectores são considerados mecanismos estruturais de resistência pré-formados, pois a pilosidade dos órgãos vegetais evita a formação do filme de água necessário para a germinação fúngica, além de evitar o contato direto de células epidérmicas e estruturas de infecção do fungo (PASCHOLATI; LEITE, 1995). A relação entre características foliares e a resistência à antracnose foi observada durante o estágio de pré-infecção do patógeno *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*, agente causal da antracnose em feijoeiro. Um cultivar resistente de feijoeiro apresentou maior pilosidade que outro suscetível. Devido a esse fato, o cultivar suscetível apresentou maior quantidade de estruturas do patógeno sobre a superfície foliar e, conseqüentemente, maior severidade de doença quando comparado ao resistente (JERBA; RODELLA; FURTADO, 2005).

Outras barreiras mecânicas podem ser impostas pelo hospedeiro para interromper e também atrasar ou prevenir completamente o processo de infecção. A cutícula pode servir como barreira estrutural, a qual o fungo encontra dificuldade em penetrar, ou pode conter substâncias contrárias ao desenvolvimento do fungo (MARTIN, 1964). Em nectarinas o desenvolvimento de infecções quiescentes de *M. fructicola* aumentou à medida que a espessura da cutícula diminuiu (MICHAILIDES; JOHNSON; MORGAN, 1992).

Outros fatores além de estruturas físicas podem estar relacionados com a baixa porcentagem de desenvolvimento de *G. psidii* nas primeiras idades de fruto estudadas. Lee e Bostok (2006) comentam que as características da superfície, como topografia e hidrofobicidade superficial assim como fatores químicos como nutrientes e compostos voláteis podem possuir alguma influência na formação de apressório do fungo *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda em nectarinas. A frequência de apressórios produzidos por conídios de *M.*

fructicola dependeu do estágio fenológico de desenvolvimento do fruto, com numerosos apressórios formados em frutos imaturos (estádio II) e nenhum apressório observado em frutos maduros (estádio III). Os autores, em experimentos adicionais, testaram emissões voláteis de diferentes estádios de nectarina e pêssgo. Os resultados demonstraram que compostos voláteis dos estádios iniciais I e II do fruto inibiram a formação de apressório e a germinação do conídio cerca de 50%, enquanto que compostos voláteis do estágio mais avançado III do fruto elevaram a germinação do conídio e da elongação do tubo germinativo, mas inibiram a formação de apressório em quase todos os conídios germinados. Em maçã, a ausência de concentrações críticas de compostos como a sacarose ou frutose na constituição química de frutos imaturos, pareceu estar envolvida com a resistência dos mesmos a *Botryosphaeria ribis*, *Glomerella cingulata*, *Neofabraea malicorticis* e *Physalospora obtusa*, agentes causais de podridão em maçã (SITTERLY; SHAY, 1960).

Em manga, uma mistura de compostos antifúngicos foi encontrada em concentrações fungitóxicas na casca de frutos não maduros resistentes ao fungo *Alternaria alternata*, agente causal da mancha de alternaria (DROBY et al., 1986). Em abacate, o patógeno causador da antracnose *Colletotrichum gloeosporioides* infectou frutos imaturos produzindo apressórios, os quais permaneceram quiescente até a maturação do fruto. A quiescência deste patógeno em frutos imaturos foi atribuída à presença de elevadas concentrações do antifúngico diene e do flavonóide epicatequina, compostos presente na casca. A epicatequina inibiu enzimas pectolíticas do fungo, as quais poderiam estar envolvidas no ataque do fungo (PRUSKY et al., 1982; WATTAD; DINOOR; PRUSKY, 1994). O decréscimo da concentração do antifúngico diene e da epicatequina durante o amadurecimento dos frutos foi sugerido como fator principal na ativação de infecções quiescentes por *C. gloeosporioides* em abacate (PRUSKY; WATTAD; KOBILER, 1996).

Além disso, fatores intrínsecos ao patógeno também podem estar relacionadas. A auto-inibição da germinação é fenômeno comum entre espécies de *Colletotrichum*, diversos compostos químicos já foram relatados presentes na matriz mucilagem gerando este fenômeno. Inibidores produzidos por *C. gloeosporioides* f. sp. *jussiaeae* presentes na água de lavagem dos conídios inibiram a própria germinação e a de *C. fragariae* mas não a de 16 outras espécies de *Colletotrichum*. (TSURUSHIMA et al., 1995).

Com relação ao formato e tamanho dos conídios de *G. psidii* observados tanto *in vitro* quanto *in vivo* estão de acordo com o relatado por Ullasa e Rawal, (1984), Gonzáles e Rondón (2005) e Van der Aa (1973). Os autores descrevem conídios tipicamente unicelulares, globosos a elipsóides, granulados, com parede fina e geralmente flexível. São pequenos, geralmente nesta espécie variando entre 6 a 12 μm por 5 a 8 μm , com apressórios formando-se diretamente do conídio ou do tubo germinativo. O apêndice apical visualizado em conídios de *G. psidii* também se encontra presente em conídios de *G. bidwellii* (KUO; HOCH, 1995). Assim como em *G. psidii*, conídios de *G. citricarpa*, cultivados sobre folhas de limão “Siciliano”, apresentaram um único tubo germinativo por onde todo o conteúdo protoplasmático do esporo foi transferido para o apressório. A formação de apressório neste fungo caracterizou-se por apresentar variações de tamanho e forma (NORONHA, 2002). Conídios de *G. bidwellii*, sobre folhas de uva, também apresentaram semelhanças com as características descritas para *G. psidii*. Conídios do agente causal da podridão preta da uva apresentaram tubos germinativos que emergiram de qualquer região da superfície do esporo e não apresentaram nenhum poro germinativo discernível morfológicamente ou outro local pré-determinado envolvendo o posicionamento do tubo germinativo, entretanto, a emergência do tubo germinativo era predominantemente em locais próximos a interface conídio-folha. Geralmente, os apressórios eram sésseis em tubos germinativos curtos (5 μm de comprimento) e ocasionalmente estes eram longos (20-40 μm). Uma vez que o citoplasma havia migrado do conídio e do tubo germinativo para o apressório, estas estruturas entravam em colapso (KUO; HOCH, 1996).

As alterações na morfologia dos apressórios foram observadas a 35°C *in vitro*, porém não *in vivo*. De acordo com Emmett e Parbery (1975), as variações morfológicas em apressórios podem ser induzidas por diversos fatores. Dentre estes, os fatores físicos os quais incluem a temperatura, disponibilidade de água, intensidade da luz e dureza da superfície e os fatores químicos que incluem o complexo de compostos químicos agindo na superfície da planta e os fatores genéticos. Neste caso, pode-se sugerir a influência da temperatura *in vitro* na morfologia dos apressórios produzidos por conídios de *G. psidii*, porém um ou mais fatores adicionais presentes nos frutos mantiveram o formato comum dos apressórios na mesma temperatura como, por exemplo, a presença de compostos químicos na planta ou até a dureza da superfície.

3.5 Conclusão

A temperatura e duração de molhamento, bem como a idade dos frutos influenciaram a fase de pré-penetração de *Guignardia psidii*. A germinação, formação de apressórios e apressórios melanizados (*in vitro*) apresentaram melhores índices a 25°C e maior duração de molhamento (24 horas *in vivo* e 48 horas *in vitro*). Além disso, com o aumento da idade dos frutos, maior foi a porcentagem de conídios germinados e apressórios formados. Assim, este trabalho contribui para a compreensão das condições favoráveis à pré-infecção de *G. psidii* em goiaba e conseqüentemente fornece subsídios para a definição de momento ideal para controle desta doença.

Referências

- AMARAL, C.S.; SALVAIA, A.; ANGELI, S.S.; MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Incidência de patógenos pós-colheita em goiabas Kumagai. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 32, p. 57-58, 2006. Suplemento.
- BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B. Effects of bean line pattern mosaic virus on the monocyclic components of rust and angular leaf spot of *Phaseolus* bean at different temperatures. **Plant Pathology**, London, v. 47, p. 289-298, 1998.
- BENO-MOUALEM, D.; PRUSKY, D. Early events in the development of quiescent infection of avocado fruits against *Colletotrichum Gloeosporioides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 90, p. 553-559, 2000.
- BIGGS, A.R.; NORTHOVER, J. Influence of temperature and wetness duration on infection of peach and sweet cherry fruits by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 78, p. 1352-1356, 1988.
- _____. Association of sweet cherry epidermal characters with resistance to *Monilinia fructicola*. **HortScience**, St. Joseph, v. 24, p. 126-127, 1989.
- BROWN, W. On the germination and growth of fungi at various temperatures and in various concentrations of oxygen and carbon dioxide. **Annals of Botany**, Oxford, v. 36, p. 257-283, 1922.
- CALTRIDER, P.G. Growth and sporulation of *Guignardia bidwellii*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 51, p. 860-863, 1961.

- CRUICKSHANK, R.H.; WADE, G.C. The activation of latent infections of *Monilinia fructicola* on apricots by volatiles from the ripening fruit. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, p. 107-112, 1992.
- DROBY, S.; PRUSKY, D.; JACOBY, G.; GOLDMAN, A. Presence of antifungal compounds in the peel of mango fruits and their relation to latent infections of *Alternaria alternata*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, p. 173-183, 1986.
- EMMETT, R.W.; PARBERRY, D.G. Appressoria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 147-167, 1975.
- ESTRADA, A.B.; DODD, J.C.; JEFFRIES, P. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 608-618, 2000.
- FLAISHMAN, M.A.; KOLATTUKUDY, P.E. Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as signal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 6579-6593, 1994.
- GONZÁLEZ, M.S.; RONDÓN, A. First report of *Guignardia psidii*, an ascigerous state of *Phyllosticta psidiicola*, causing fruit rot on guava in Venezuela. **Plant Disease**, St Paul, v. 89, p. 773, 2005. Abstract.
- GUISTERREZ, A.S.D.; WATANABE, H.; SCHMIDT, M.R. A goiaba em números. **Frutas e Legumes**, São Paulo, v. 2, p.18-21, 2002.
- HOWARD, R.J. Cell biology of pathogenesis. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Ed.). **Rice blast disease**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 3-22.
- HOWARD, R.J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 491-512, 1996.
- ISHIDA, N.; AKAI, S. Relation of temperature to germination of conidia and appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. **Mycologia**, Lancaster, v. 61, p. 382-386, 1969.
- JARVIS, W.R. Latent infection in pre- and postharvest environment. **HortScience**, St. Joseph, v. 29, p. 749-751, 1994.
- JERBA, V.F.; RODELLA, R.A.; FURTADO, E.L. Relação entre a estrutura foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 217-223, 2005.
- KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Microscopia eletrônica de varredura**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ, Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, 1999. 40 p.

KUBO, Y.; FURUSAWA, I.; SHISHIYAMA, J. Relation between pigment intensity and penetrating ability in appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, p. 870–873, 1987.

KUBO, Y.; SUZUKI, K.; FURUSAWA, I.; ISHIDA, N.; YAMAMOTO, M. Relation of appressorium pigmentation and penetration of nitrocellulose membranes by *Colletotrichum lagenarium*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 498-501, 1982.

KUO, K.C.; HOCH, H.C. Visualization of the extracellular matrix surrounding pycnidiospores, germings and appressoria of *Phyllosticta ampellicida*. **Mycologia**, Lancaster, v. 87, p. 759-771, 1995.

_____. Germination of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores: prerequisite of adhesion to the substratum and the relationship of the substratum wettability. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 20, p. 18-29, 1996.

LEE, M.H.; BOSTOCK, R.M. Induction, regulation, and role in pathogenesis of appressoria in *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, p. 1072-1080, 2006.

LIU, Q.; XIAO, C.L. Influence of nutrient and environmental factors on conidial germination of *Potrebniamyces pyri*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 95, p. 572-580, 2005.

LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J. Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 102-111, 2003.

LUO, Y.; MA, Z.; MICHAILIDES, T.J. Analysis of factors affecting latent infection and sporulation of *Monilinia fructicola* on prune fruit. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, p. 999-1003, 2001.

MARI, M.; CASALINI, L.; BARALDI, E.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G.C. Susceptibility of apricot and peach fruit to *Monilinia laxa* during phenological stages. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 30, p. 105-109, 2003.

MARTIN, J.T. Role of cuticle in the defense against plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 2, p. 81-100, 1964.

MICHAILIDES, T.J.; JOHNSON, R.S.; MORGAN, D.P. Effect of nitrogen fertilization on brown rot (*Monilinia fructicola*) susceptibility in nectarines. **Phytopathology**, Lancaster, v. 82, p.1064, 1992. Abstract.

MIEHLE, B.R.; LUKEZIC, F.L. Studies on conidial germination and appressorium formation by *Colletotrichum trifolii* Bain and Essary. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 18, p. 1263-1269, 1972.

MONEY, N.P.; HOWARD, R.J. Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 20, p. 217-227, 1996.

NORONHA, M.A. **Escala diagramática para avaliação da mancha preta em folhas de citros e efeito da temperatura e da duração do molhamento na pré-penetração de conídios de *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der Aa]**. 2002. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

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

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

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

PRUSKY, D.; WATTAD, C.; KOBILER, L. Effect of ethylene on activation of lesion development from quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 9, p. 864-868, 1996.

PRUSKY, D.; KEEN, N.T.; SIMS, J.J.; MIDLAND, S. Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 1578-1582, 1982.

ROTEM, J. Climate and weather influence on epidemics. In: HORSFALL, J.G.; DIMOND, A.E. **Plant disease: how disease develops in populations**. New York: Academic, 1978. p. 317-436.

_____. **The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity**. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1994. 326 p.

ROTEM, J.; COHEN, Y.; BASHI, E. Host and environmental influences on sporulation *in vivo*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 16, p. 83-101, 1978.

SITTERLY, W.R.; SHAY, J.R. Physiological factors affecting the onset of susceptibility of apple fruit to rotting by fungus pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v. 50, p. 91-93, 1960.

- SKOROPAD, W.P. Effect of temperature on the ability of *Colletotrichum graminicola* to form appressoria and penetrate barley leaves. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 47, p. 431-434, 1967.
- SPOTTS, R.A. Effect of leaf wetness duration and temperature on the infectivity of *Guignardia bidwellii* on grape leaves. **Phytopathology**, Lancaster, v. 67, p. 1378-1381, 1977.
- SWINBURNE, T.R.; BROWN, A.E. Appressoria development and quiescent infections of banana fruit by *Colletotrichum musae*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 80, p. 176-178, 1983.
- TAMM, L.; FLUCKIGER, W. Influence of temperature and moisture on growth, spore production, and conidial germination of *Monilinia laxa*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, p. 1321-1326, 1993.
- TOZETTO, L.J. **Caracterização, biologia e controle em pós-colheita de *Guignardia psidii* Ullasa & Rawal [*Phyllosticta psidiicola* (Petr) van der Aa], agente causal de podridão em frutos de goiabeira.** 1995. 115 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 1995.
- TOZETTO, L.J.; RIBEIRO, W.R.C. Ocorrência de podridão em frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), causada por *Phyllosticta* sp., em Brasília DF. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 160, 1993. Abstract.
- _____. Tratamento pós-colheita de goiaba (*Psidium guajava*, L.) contra podridão de *Guignardia psidii*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 20, p. 229-234, 1998.
- TSURUSHIMA, T.; UENO, T.; FUKAMI, H.; IRIE, H.; INOUE, M. Germination self-inhibitors from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *jussiaeae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 8, p. 652-657, 1995.
- ULLASA, B.A.; RAWAL, R.D. *Guignardia* fruti rot of guava – A new disease from Bangalore. **Current Science**, Bangalore, v. 53, p. 435-436, 1984.
- VAN BURGH, P. Some factors affecting appressorium formation and penetrability of *Colletotrichum phomoides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 40, p. 29, 1950. Abstract.
- VAN DER AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 5, p. 1-105, 1973.
- WATADA, A.E.; HERNER, R.C.; KADER, A.A.; ROMANI, R.J.; STABY, G.L. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. **HortScience**, St. Joseph, v. 19, p. 20-21, 1984.
- WATTAD, C.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 7, p. 293-297, 1994.

WELLS, J.M.; SPALDING, D.H. Stimulation of *Geotrichum candidum* by low oxygen and high carbon dioxide atmospheres. **Phytopathology**, Lancaster, v. 65, p. 1299-1302, 1975.

XU, X.M. ; ROBINSON, J. Modelling the effects of wetness duration and fruit maturity on infection of apple fruits of Cox's Orange Pippin and two clones of Gala by *Venturia inaequalis*. **Plant Pathology**, London, v. 54, p. 347-356, 2005.

XU, X.M.; BERTONE, C.; BERRIE, A. Effects of wounding, fruit age and wetness duration on the development of cherry brown rot in the UK. **Plant Pathology**, London, v. 56, p. 114-119, 2007.

4 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DIÓXIDO DE CARBONO E ETILENO NA PRÉ-PENETRAÇÃO DE *Guignardia psidii* EM GOIABA

Resumo

O aumento do mercado consumidor de frutos de goiabeira *in natura* está associado a qualidade dos mesmos durante a pós-colheita. Recentemente, a pinta preta provocada pelo fungo *Guignardia psidii* Ullasa e Rawal (*Phyllosticta psidiicola* (Petrak) van der Aa) vem gerando perdas pós-colheita na produção. Este trabalho buscou avaliar o efeito de diferentes concentrações de dióxido de carbono (0, 3, 6 e 12%) e etileno (0, 1, 3 e 6 ppm) na pré-penetração de *G. psidii* *in vitro* e *in vivo*. As diferentes concentrações dos gases foram, *in vitro*, injetadas em recipientes herméticos de 1,7 L os quais continham placas de poliestireno com alíquotas de 40 µL de suspensão de 10⁵ conídios/mL e, *in vivo*, injetadas em recipientes herméticos de 3,7 L os quais continham frutos inoculados, em suas superfícies, com 30 µL de suspensão de 10⁵ conídios/mL. Os estudos *in vitro* foram avaliados por meio de microscópio de luz e os *in vivo* por meio de microscópio eletrônico de varredura. Nos experimentos *in vitro*, todas as concentrações de dióxido de carbono testadas provocaram queda na germinação dos conídios quando comparadas ao controle. Porém, entre as diferentes concentrações, não foram observados efeitos marcantes nesta variável. Assim, no controle esta variável apresentou valor médio de 45,1% enquanto que nas concentrações 3, 6 e 12% do gás passou para, respectivamente, 24,6%, 22,6% e 25,8%. Entretanto, o aumento das concentrações do dióxido de carbono provocou decréscimo progressivo da taxa de formação de apressórios e apressórios melanizados de *G. psidii*. No controle houve 23,2% de apressórios formados e 18,1% de apressórios melanizados e na concentração de 12% de dióxido de carbono, esses valores foram reduzidos para 4,1% e 0,5%, respectivamente. No entanto, no experimento *in vivo*, as taxas de germinação e formação de apressórios apresentaram redução gradativa entre o controle e as concentrações de 3 e 6% de dióxido de carbono, elevando-se novamente a 12%, passando de 28,2% de conídios germinados e 20,5% de apressórios formados na concentração de 6% de dióxido de carbono para, respectivamente, 49,3% e 38,2% a 12% de concentração desse gás. Esse comportamento pode ser explicado devido à remoção dos conídios não germinados durante o preparo das amostras para visualização em microscópio eletrônico. O etileno, tanto nos experimento *in vitro* quanto *in vivo* não apresentou efeito sobre a germinação e formação de apressórios de *G. psidii*. Na concentração controle, apresentou, *in vitro*, 34,6% de conídios germinados, 34,2% de apressórios formados e 29,9% de apressórios melanizados e na maior concentração de etileno estudada (6 ppm) 26,7% de conídios germinados, 26,3% de apressórios formados e 20,2% de apressórios melanizados. Nos ensaios *in vivo*, o controle apresentou 40% de conídios germinados e 32,7% de apressórios formados e na maior concentração de etileno estudada, 49,3% de conídios germinados e 38,2% de apressórios formados. Esses resultados indicam que a manipulação da concentração de dióxido de carbono, durante a pós-colheita, pode contribuir para reduzir infecções que ainda não se estabeleceram nos frutos.

Palavras-chave: Goiaba; *Guignardia psidii*; Pré-penetração; Dióxido de carbono; Etileno

EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CARBON DIOXIDE AND ETHYLENE IN THE *Guignardia psidii* PRE-PENETRATION IN GUAVA FRUITS

Abstract

The increase in the consumption market of the guava fruit *in natura* is associated with the quality of the fruits after postharvest. Recently, the black spot caused by the fungus *Guignardia psidii* Ullasa and Rawal (*Phyllosticta psidiicola* (Petrak) van der Aa) has been generating postharvest losses in the production. This work evaluated the effect of different concentrations of carbon dioxide (0, 3, 6 e 12%) and ethylene (0, 1, 3 e 6 ppm) in the pre-penetration of *G. psidii* *in vitro* and *in vivo*. The gases different concentrations were, *in vitro*, injected in hermetic flasks of 1.7 L which contained polystyrene Petri dishes with aliquots of 40 µL conidial suspension with 10⁵ conidia/mL and, *in vivo*, injected in hermetic flasks of 3.7 L which contained fruits inoculated with aliquots of 30 µL conidial suspension with 10⁵ conidia/mL on its surfaces. The *in vitro* studies were evaluated by light microscope and the *in vivo* by scanning electron microscope. In the *in vitro* experiments, all the concentrations of carbon dioxide tested provoked decrease in the conidia germination when compared with the control. However, between the different concentrations, it was not observed remarkable effects in this variable. Thus, in the control this variable presented a mean value of 45.1% while in 3, 6 and 12% concentrations of this gas, it passed to, respectively, 24.6%, 22.6% and 25.8%. However, the increase in the carbon dioxide concentrations provoked a progressive decrease in the *G. psidii* appressoria formation and melanized appressoria rates. In the control there was 23.2% formed appressoria and 18.1% melanized appressoria and in the carbon dioxide concentration of 12%, these values were reduced to 4.1% and 0.5%, respectively. However, in the *in vivo* experiment, the germination and appressorium formation rates presented a gradual decrease between the control and the carbon dioxide concentrations of 3 and 6%, rising again at 12%, going from 28.2% germinated conidia and 20.5% formed appressoria at 6% of carbon dioxide, to, respectively, 49.3% and 38.2% at 12% of this gas. This behavior can be due to the removal of the non germinated conidia during the samples preparation for the light microscope observation. Ethylene, both in the *in vitro* and in the *in vivo* experiments, did not present effect over the *G. psidii* germination and appressorium formation. The control concentration, presented *in vitro*, 34.6% germinated conidia, 34.2% formed appressoria and 29.9% melanized appressoria and in the ethylene highest concentration studied (6 ppm) 26.7% germinated conidia, 26.3% formed appressoria and 20.2% melanized appressoria. In the *in vivo* assays, the control presented 40% germinated conidia and 32.7% formed appressoria and in the ethylene highest concentration studied, 49.3% germinated conidia and 38.2% formed appressoria. These results indicate that the manipulation of the carbon dioxide during the postharvest, can contribute to reduce the infections that did not establish in the fruits yet.

Keywords: Guava; *Guignardia psidii*; Pre-penetration; Carbon dioxide; Ethylene

4.1 Introdução

A elevada perecibilidade da goiaba, a qual a torna alvo fácil para o estabelecimento de diversas doenças, é um problema enfrentado pelos produtores na comercialização desta fruta *in natura*, tanto no mercado nacional, como no mercado internacional.

O dióxido de carbono (CO_2), a determinadas concentrações pode influenciar no processo de infecção de diversos fitopatógenos favorecendo ou evitando danos em frutos e vegetais perecíveis. A adição de dióxido de carbono na atmosfera durante o armazenamento de cerejas foi um eficiente método utilizado para reduzir a podridão parda provocada pelo fungo *Monilinia fructicola*, durante o transporte ferroviário, antes do advento da refrigeração mecânica (DE VRIES-PATERSON; JONES; CAMERON, 1991). Tratamentos com dióxido de carbono provaram ser bastante efetivos reduzindo podridões pós-colheita causadas por fungos, por meio da inibição de diversas funções metabólicas (SOMMER, 1985). Em nectarinas, 15% de dióxido de carbono a 5°C durante 16 dias provocaram efeito fungistático em *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda (AHMADI; BIASI; MITCHAM, 1999). Concentrações de 3% ou mais o dióxido de carbono retardaram o crescimento de *Geotrichum candidum*, causador de podridão mole em tomate (WELLS; SPALDING, 1975). Entretanto, o aumento na multiplicação do fungo *Fusarium oxysporum* f. *cubense* foi observado mediante a elevação dos níveis de dióxido de carbono entre concentrações de 2 a 25% (STOVER; FREIBERG, 1958).

O etileno (C_2H_4) é um simples hidrocarboneto que regula diversos processos metabólicos e de desenvolvimento. Está envolvido na germinação de sementes, influencia no crescimento da planta, estimula a senescência de órgãos vegetais e induz o amadurecimento de frutos. Além disso, o etileno é funcional durante estresses abióticos e bióticos como elevadas temperaturas, secas, ferimentos e infecções por diferentes patógenos (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992 apud GERAATS et al., 2003). O papel do etileno em interações planta-patógeno é complexo. Este gás, em alguns casos liberado pelo fruto e em outros inserido de maneira artificial, atua no processo de patogênese, acelerando ou retardando doenças em frutos. Concentrações de etileno variando entre 8 a 200 ppm foram relatadas induzindo a resistência de batata doce a *Ceratocystis fimbriata* (STAHMANN; CLARE; WOODBURY, 1966). Entretanto, a remoção do etileno em câmaras para o armazenamento refrigerado de pêssegos não provocou efeito sobre a incidência de podridões provocada por fitopatógenos (NAVA; BRACKMANN, 2001), e a inibição do etileno

durante a pós-colheita em goiabas não impediu o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, quando estas completaram o amadurecimento (BASSETTO et al., 2002). Em tangerinas maduras com coloração de casca verde e inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides*, a antracnose iniciou-se após tratamento das frutas com concentrações de etileno entre 5 a 50 ppm (BROWN; BARMORE, 1977).

A qualidade do fruto da goiabeira em pós-colheita vem sendo afetada pela pinta ou mancha preta. Esta podridão é provocada pelo fungo *Guignardia psidii* Ullasa e Rawal e o anamorfo *Phyllosticta psidiicola* (Petrak) van der Aa, tornando os frutos inviáveis para o consumo *in natura*. Recentemente no Brasil, a pinta preta foi relatada em frutos de goiabeira da variedade Kumagai em elevada porcentagem na região produtora de Campinas, no estado de São Paulo. A incidência média do fungo *G. psidii*, no período de janeiro a novembro de 2005, foi de 18,6%, com um pico de 58% em abril (AMARAL et al., 2006).

Os sintomas da doença constituem-se, inicialmente, de pontos amarelados os quais evoluem rapidamente na superfície dos frutos, formando lesões deprimidas, preto-esverdeadas a marrom-escuras, que podem apresentar, na superfície, frutificações do fungo, geralmente conidiomas picnidiais. Nas áreas próximas ou sob as lesões, a polpa apresenta podridão mole. As lesões são circulares, geralmente com 1 a 2,5 cm de diâmetro e ocorrem em qualquer área do fruto, podendo posteriormente coalescer (MANICA et al., 2001; TOZETTO; RIBEIRO, 1998).

Além da idéia de que a infecção por *G. psidii* ocorra em frutos jovens, permanecendo em estado quiescente, até a maturidade (LIN; LAI; TSAI, 2003; TOZETTO; RIBEIRO, 1993), também existe a possibilidade de ocorrer durante a pós-colheita, por meio do contato entre frutos doentes e sadios durante o período de armazenamento. Nesse contexto, a manipulação dos gases no ambiente de armazenamento dos frutos poderia auxiliar no controle da doença, impedindo ou retardando as infecções que ocorrem nessa fase.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito dos gases dióxido de carbono e etileno sobre os processos de pré-penetração de *G. psidii* em goiaba.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia e no Laboratório do Núcleo de Apoio à Pesquisa / Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola e no Laboratório de Pós-Colheita de Plantas Hortícolas do Departamento de Produção Vegetal da Universidade de São Paulo, campus “Luiz de Queiroz” na cidade de Piracicaba, no estado de São Paulo.

4.2.2 Obtenção e manutenção do isolado de *G. psidii*

O isolado de *G. psidii* foi obtido de frutos doentes em campo comercial no município de Campinas, no estado de São Paulo e identificado com base na literatura e por meio dos postulados de Koch. Este isolado foi cultivado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e mantido em câmara de crescimento modelo E7 (Convion, Canadá), a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sob alternância de luz (12 horas claro/12 horas escuro). Nestas condições, a fase assexuada do fungo, correspondente a *Phyllosticta psidiicola*, colonizou e se reproduziu sobre o meio de cultura. Esta fase foi utilizada em todos os experimentos do presente trabalho.

4.2.3 Efeito *in vitro* de dióxido de carbono e etileno na pré-penetração de conídios de *G. psidii*

Conídios de *G. psidii* foram obtidos de colônias de 10 dias, cultivadas em meio BDA, a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sob alternância de luz (12 horas claro/12 horas escuro). Com auxílio de pincel e água destilada autoclavada, conídios de *G. psidii* foram removidos da superfície das colônias. Em seguida, a suspensão obtida foi filtrada em gaze esterilizada para retirar fragmentos de micélio e centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se novamente água destilada estéril para ressuspender os conídios precipitados. A suspensão foi calibrada para 10^5 esporos/mL com

auxílio da câmara de Neubauer. A centrifugação objetivou remover parte da matriz mucilaginosa que envolve os conídios. Experimentos realizados previamente demonstraram que este processo permitiu aumento na porcentagem de conídios germinados de *G. psidii*, facilitando assim os estudos realizados.

Três alíquotas de 40 µl da suspensão foram depositadas na superfície de placas de poliestireno. Cada placa foi mantida em recipiente hermético de 1,7 L, nos quais foram injetados volumes de dióxido de carbono para obter concentrações de 3, 6 e 12%, além do controle (0%). As concentrações testadas foram medidas, no início e no final do experimento, com auxílio do aparelho PBI Dansensor modelo Check Mate 9900 O₂/CO₂ (PBI Dansensor, Dinamarca). Da mesma forma, em outros recipientes, foram testadas as concentrações 0, 1, 3 e 6ppm de etileno. As concentrações de etileno foram medidas, no início e no final do experimento, com auxílio de cromatógrafo a gás modelo TRACE 2000 CG (ThermoFinnigan, EUA). Os recipientes permaneceram em temperatura ambiente (25°C ±3°C) por 12 horas, em escuro contínuo.

Transcorrido o tempo, os recipientes foram abertos e a germinação dos conídios foi interrompida adicionando-se 15 µL de lactoglicerol em cada gota. Em microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Alemanha) foram registradas imagens dos conídios para estudo e contados 100 conídios por gota, avaliando-se as porcentagens de conídios germinados, de apressórios formados e de apressórios melanizados.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa PlotIT versão 3.2 (Scientific Programming Enterprises, EUA). O experimento foi realizado duas vezes, com quatro repetições. Os valores apresentados correspondem ao primeiro experimento realizado.

4.2.4 Efeito de dióxido de carbono e etileno na pré-penetração de conídios de *G. psidii* em frutos de goiabeira

Os frutos de goiabeira utilizados nos experimentos, pertencentes à variedade 'Kumagai', foram obtidos junto a produtor da região de Campinas, no estado de São Paulo, e encontravam-se em maturidade fisiológica segundo WATADA et al., (1984). Os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos, lavados em água corrente e deixados para secar em temperatura ambiente, para posterior inoculação.

A inoculação das goiabas consistiu na deposição de uma gota com 30 μL de suspensão com cerca de 10^5 conídios/mL, sobre suas superfícies previamente demarcadas com adesivos plásticos. Cada goiaba inoculada foi depositada em recipiente hermético com capacidade de 3,7 L, contendo um chumaço de algodão umedecido com água destilada, para obtenção de ambiente saturado em água. Em seguida, cada recipiente foi fechado para se injetar as concentrações de gases a serem estudadas.

Foram testadas as concentrações 0, 3, 6 e 12% de dióxido de carbono e 0, 1, 3 e 6ppm de etileno. O procedimento de calibração dos gases dentro dos recipientes foi realizado da mesma maneira como descrito no item 4.2.3. Os recipientes permaneceram em temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) por 12 horas, em escuro contínuo.

Transcorrido o período de incubação, as amostras foram retiradas com auxílio de bisturi e preparadas para visualização em microscópio eletrônico de varredura, seguindo a metodologia descrita por Kitajima e Leite (1999). Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras circulares, com cerca de 0,5 cm de diâmetro e 2-3 mm de espessura foram fixadas em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2%; CaCl_2 0,001 M e tampão cacodilato 0,05 M) por, no mínimo, 2 horas. Após este procedimento, as amostras foram lavadas três vezes de 10 minutos cada em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7 e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram imersas três vezes de 10 minutos cada em água destilada, seguidas de desidratação em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 10 minutos em cada concentração. Na concentração de 100% o procedimento foi realizado três vezes. Em seguida, as amostras foram secas ao ponto crítico por meio de imersão dos fragmentos em gás carbônico líquido, em aparelho de ponto crítico modelo CPD 030 (Balzers, Lichtenstein) e posterior fixação em suportes de alumínio (*stubs*) com fita dupla face de carbono. Após este processo, os *stubs* com as amostras foram metalizados com vapor de ouro em aparelho metalizador modelo MED 010 (Balzers Union, Lichtenstein), a 50 mA, por 180 segundos. As observações foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 435 VP (Zeiss, Inglaterra). Foram registradas imagens dos conídios para estudo e a avaliação correspondeu à contagem de 100 conídios por amostra, avaliando-se as porcentagens de conídios germinados e apressórios formados. O conídio foi considerado como germinado quando o tubo germinativo excedeu a metade do diâmetro do mesmo.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa PlotIT versão 3.2 (Scientific Programming Enterprises, EUA) . O experimento foi realizado somente uma vez, com cinco repetições.

4.3 Resultados

4.3.1 Efeito *in vitro* de dióxido de carbono e etileno na pré-penetração de conídios de *G. psidii*

Nos experimentos *in vitro*, todas as concentrações de dióxido de carbono testadas provocaram queda na germinação dos conídios quando comparadas ao controle. No entanto, entre as concentrações estudadas, a germinação manteve-se estável.. No controle esta variável apresentou valor médio de 45,1% enquanto que nas concentrações 3, 6 e 12% do gás passou para, respectivamente, 24,6%, 22,6% e 25,8%. Porém, o aumento da concentração deste gás provocou o decréscimo progressivo da média de apressórios formados e de apressórios melanizados, que passaram de 23,2% de apressórios formados e 18,1% de apressórios melanizados no controle para, respectivamente, 4,1% e 0,5% na concentração de 12% de dióxido de carbono (Figura 1). Para o etileno, não foi possível verificar alterações na média das mesmas variáveis avaliadas com o aumento das concentrações desse gás. O controle apresentou 34,6% de conídios germinados, 34,2% de apressórios formados e 29,9% de apressórios melanizados e, na maior concentração de etileno estudada (6 ppm), 26,7% de conídios germinados, 26,3% de apressórios formados e 20,2% de apressórios melanizados (Figura 2).

Sob o microscópio de luz, verificou-se que com o aumento da concentração do dióxido de carbono, foi visualizada a gradativa predominância de apressórios não melanizados (Figura 3A a D). No entanto, com o aumento da concentração do etileno não foi visualizada diferença nas estruturas analisadas de *G. psidii* (Figura 3E a H).

Figura 1 – Efeito *in vitro* de dióxido de carbono nas concentrações 0, 3, 6 e 12% sobre a germinação, formação de apressórios e apressórios melanizados de conídios de *Guignardia psidii*

Figura 2 – Efeito *in vitro* do gás etileno nas concentrações 0, 1, 3 e 6ppm sobre a germinação, formação de apressórios e apressórios melanizados de conídios de *Guignardia psidii*

Figura 3 – Aspecto dos conídios de *Guignardia psidii* submetidos a diferentes concentrações de dióxido de carbono e etileno. Conídios submetidos a 0, 3, 6 e 12% de dióxido de carbono (A a D respectivamente). Conídios submetidos a 0, 1, 3 e 6 ppm de etileno (E a H respectivamente). Observados em microscópio de luz, aumento de 400x, barra = 20 μm

4.3.2 Efeito de dióxido de carbono e etileno na pré-penetração de conídios de *G. psidii* em frutos de goiabeira

As concentrações de 3% e 6% de dióxido de carbono proporcionaram redução gradativa na germinação e formação de apressórios de *G. psidii in vivo*. Entretanto, na concentração de 12%, observou-se significativo aumento nestas duas variáveis. Numericamente, a germinação e a formação de apressórios passaram, respectivamente, de 28,2% e 20,5% na concentração de 6%, para 49,2% e 38,2% na concentração de 12% (Figura 4). Esse aumento, observado na maior concentração do gás, poderia estar relacionado à remoção dos conídios não germinados, e, portanto não aderidos à superfície dos frutos, pelos procedimentos necessários ao preparo das amostras para visualização no microscópio de varredura. Detalhes dos esporos submetidos às diferentes concentrações de dióxido de carbono podem ser observados na Figura 5.

O gás etileno não apresentou efeitos pronunciados nas variáveis analisadas. Para esse gás, o controle apresentou 40% de conídios germinados e 32,7% de apressórios formados. Na concentração de 6ppm, os valores dessas mesmas variáveis foram, respectivamente, 49,3% e 38,2% (Figura 5). Os esporos submetidos ao etileno podem ser visualizados na Figura 7.

Figura 4 – Efeito *in vivo* de dióxido de carbono nas concentrações 0, 3, 6 e 12% sobre a germinação e formação de apressórios de conídios de *Guignardia psidii*

Figura 5 – Aspecto de conídios de *Guignardia psidii* sob efeito do dióxido de carbono nas concentrações 0, 3, 6 e 12% (respectivamente A, B, C e D) na superfície de frutos de goiabeira; barra = 10 μm

Figura 6 – Efeito *in vivo* do gás etileno nas concentrações 0, 1, 3 e 6 ppm sobre a germinação e formação de apressórios de conídios de *Guignardia psidii*

Figura 7 – Aspecto de conídios de *Guignardia psidii* sob efeito do gás etileno nas concentrações 0, 1, 3 e 6 ppm (respectivamente A, B, C e D); barra = 10 μ m

4.4 Discussão

O aumento da concentração do dióxido de carbono *in vitro* reduziu a formação de apressórios e apressórios melanizados de *G. psidii*, indicando a diminuição da capacidade de infecção do fungo sob as concentrações testadas deste gás. O mesmo não ocorreu *in vivo*, onde se observou o decréscimo das porcentagens de germinação de conídios e apressórios formados nas concentrações 3 e 6% de dióxido de carbono como ocorreu *in vitro*, seguido, no entanto, do aumento das mesmas na concentração de 12%. A elevada concentração do gás pode ter impedido a adesão dos conídios sobre a superfície dos frutos. Consequentemente ocorreu remoção mais acentuada de conídios não germinados durante o processamento das amostras para visualização no microscópio eletrônico de varredura, gerando falso aumento da porcentagem de conídios germinados.

Existem concentrações de dióxido de carbono que inibem, mas existem concentrações que podem estimular crescimento e esporulação dos fungos, sendo que os níveis deletérios variam muito com a espécie (TABAK; COOKE, 1968). O acréscimo de 5% de dióxido de carbono diminuiu o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* a 12,5°C e *Whetzelinia sclerotiorum* a 5,5°C, entretanto estimulou o fungo *Monilinia fructicola* em ambas as temperaturas (EL-GOORANI; SOMMER, 1979).

O controle do início do desenvolvimento de infecções provocadas pelo fungo *Monilinia fructicola* em frutos de cerejeira melhorou com o aumento dos níveis de dióxido de carbono de 12 para 50%. A 50% de dióxido de carbono, o desenvolvimento da podridão parda em cerejas foi completamente inibido por sete dias a 20°C, porém os frutos desenvolveram a doença dentro de dois a quatro dias depois de retornarem ao ar a 25°C, indicando que este tipo de tratamento é fungistático e não fungicida (DE VRIES-PATERSON; JONES; CAMERON, 1991). A exposição de frutos de abacateiro a 30% de dióxido de carbono por 24 horas elevou os níveis do antifúngico diene e do flavonóide epicatequina (composto capaz de inibir enzimas pectolíticas do fungo) presentes na casca do fruto, atrasando o desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose (PRUSKY; PLUMBLEY; KOBILER, 1991; ARDI et al., 1998).

Entretanto, o fungo causador de podridões em maçã *Penicillium expansum* apresentou crescimento *in vitro* expressivo quando submetido a concentrações de dióxido de carbono variando entre 2,5 a 20%. Todavia, o elevado nível do gás inibiu parcialmente a esporulação do

fungo, principalmente a 20%, porém quando removido o gás e restabelecida a atmosfera normal, as colônias retomaram o crescimento e esporulação (BRACKMANN et al., 1996). Concentrações de dióxido de carbono entre 2 a 25% no ar, por 16 a 42 horas estimularam frequentemente a multiplicação de *Fusarium oxysporum f. cubense* no solo. Devido a estes resultados, os fungos *F. oxysporum f. lycopersici*, *F. oxysporum f. nicotianae* e *F. oxysporum f. cucumerinum* também foram submetidos ao tratamento e a estimulação procedeu com 4% de dióxido de carbono enriquecido no ar. Concentrações acima de 25% de dióxido de carbono no ar, por 48 horas, não causaram a inibição da sobrevivência ou multiplicação dos fungos estudados. Experimentos adicionais levaram a acreditar que a estimulação da multiplicação destas espécies de *Fusarium* com dióxido de carbono pode ter sido provocada devido a participação deste gás, presente na atmosfera do solo, nos processos metabólicos do fungo. Pois os resultados indicaram que o dióxido de carbono, em concentrações normalmente encontradas na atmosfera do solo foram fixadas por *Fusarium oxysporum f. cubense* (STOVER; FREIBERG, 1958).

O etileno não apresentou efeito na germinação e formação de apressórios, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Este gás também não causou efeito no crescimento de *Gloeosporium album* agente causal de podridões em maçãs, exceto sob baixas temperaturas (3,3°C) onde inibiu o crescimento do fungo (LOCKHART; FORSYTH; EAVES, 1968). Entretanto, em tecido de raiz de variedade suscetível de batata doce, a exposição à concentrações de etileno variando entre 8 a 220 ppm induziu a resistência a infecção por *Ceratocystis fimbriata*. Neste caso, o etileno pode ter agido como estímulo a mudanças metabólicas localizadas levando às reações de necrose e hipersensibilidade em plantas infectadas (STAHMANN; CLARE; WOODBURY, 1966). Concentrações de etileno variando de 1 a 1000 ppm, em experimentos *in vitro* a 20°C, estimularam a germinação de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Thielaviopsis paradoxa*, porém provocaram pouco ou nenhum efeito nos fungos *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer* (EL-KAZZAZ; SOMMER; KADER, 1983). O tratamento de tangerinas com etileno em pós-colheita, visando modificar a cor da casca de verde para alaranjada, favoreceu a infecção por *Colletotrichum gloeosporioides* (BROWN, 1975, BROWN; BARMORE, 1977). No entanto, a antracnose não se desenvolveu em frutos maduros com 25% de coloração alaranjada expostos ao etileno para homogeneização da cor. Testes histoquímicos da casca indicaram que fenóis e lignina estavam presentes em associação com a hifa de infecção (BROWN, 1978). A exposição

de conídios do agente causal da antracnose *Colletotrichum gloeosporioides* a concentrações de 5 e 45 ppm de etileno, em abacate maduro, imaturo e *in vitro*, estimulou a germinação dos conídios e formação de apressórios, mas não ativou o desenvolvimento de lesões precoces nos frutos imaturos (PRUSKY; WATTAD; KOBILER, 1996), já que o desenvolvimento de lesões iniciadas a partir de apressórios quiescentes de *C. gloeosporioides* em frutos está relacionado com o decréscimo da concentração do antifúngico diene presente na casca, fato que ocorre com o amadurecimento do fruto (PRUSKY; KEEN, 1993). Observou-se que frutos maduros de abacateiro, inoculados com *C. gloeosporioides* e expostos ao etileno, apresentaram o desenvolvimento de lesões na mesma velocidade que frutos não tratados com etileno. Em ambos verificou-se que os níveis do antifúngico diene decaíram igualmente (PRUSKY; WATTAD; KOBILER, 1996).

4.5 Conclusões

Os resultados permitem concluir que o dióxido de carbono, por apresentar efeito inibitório sobre os processos de pré-penetração de *G. psidii*, possui maior potencial para uso no controle da pinta preta da goiaba em pós-colheita. Mais estudos com relação ao uso deste gás se fazem necessárias. Por exemplo, empregando-o associado a outras medidas de controle como a refrigeração ou em associação com outros gases em atmosferas controladas. No entanto, o gás etileno não provocou efeito sobre as variáveis estudadas, pertencentes à fase de pré-penetração de *G. psidii*.

Referências

- AHMADI, H.; BIASI, W.V.; MITCHAM, E.J. Control of brown rot decay of nectarines with 15% carbon dioxide atmospheres. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, p. 708-712, 1999.
- AMARAL, C.S.; SALVAIA, A.; ANGELI, S.S.; MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Incidência de patógenos pós-colheita em goiabas Kumagai. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 32, p. 57-58, 2006. Suplemento.
- ARDI, R.; KOBILER, I.; KEEN, N.T.; PRUSKY, D. Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruit to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 269-285, 1998.

BASSETTO, E.; SESSO, T.M.; JACOMINO, A.P.; KLUGE, R.A. Efeito de 1-MCP e Prochloraz na conservação de goiabas “Pedro Sato”. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, Hermosillo, v. 4, p. 122-127, 2002.

BRACKMANN, A.; SAQUET, A.A.; VEIGA, V.V.; BORTOLUZ, L. Efeito das concentrações de CO₂ e O₂ no crescimento e esporulação de *Penicillium expansum* (Link.) Thom, *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 2, p. 147-150, 1996.

BROWN, G.E. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, Lancaster, v. 65, p. 404-409, 1975.

_____. Hypersensitive response of orange-colored Robinson tangerines to *Colletotrichum gloeosporioides* after ethylene treatment. **Phytopathology**, Lancaster, v. 68, p. 700-706, 1978.

BROWN, G.E.; BARMORE, C.R. The effect of ethylene on susceptibility of Robinson tangerines to anthracnose. **Phytopathology**, Lancaster, v. 67, p. 120-123, 1977.

DE VRIES-PATERSON, R.M.; JONES, A.L.; CAMERON, A.C. Fungistatic effects of carbon dioxide in a package environment on the decay of Michigan sweet cherries by *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, St Paul, v. 75, p. 943-946, 1991.

EL-GOORANI; M.A.; SOMMER, N.F. Suppression of postharvest plant pathogenic fungi by carbon monoxide. **Phytopathology**, Lancaster, v. 69, p. 834-838, 1979.

EL-KAZZAZ, M.K.; SOMMER, N.F.; KADER, A.A. Ethylene effects on *in vitro* and *in vivo* growth of certain postharvest fruit-infection fungi. **Phytopathology**, Lancaster, v. 73, p. 998-1001, 1983.

GERAATS, B.P.J.; BAKKER, P.A.H.M.; LAWRENCE, C.B.; ACHUO, E.A.; HOFTE, M.; VAN LOON, L.C. Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 813-821, 2003.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Microscopia eletrônica de varredura**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ, Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, 1999. 40 p.

LIN, C.C.; LAI, C.S.; TSAI, S.F. Ecological survey of guava new fruit rot - *Phyllosticta* rot (black spot) and other fruit rots. **Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 45, p. 263-270, 2003.

LOCKHART, C.L.; FORSYTH, F.R.; EAVES, C.A. Effect of ethylene on development of *Gloeosporium album* in apple and on growth of the fungus in culture. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.48, p. 557-559, 1968.

MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. **Goiaba do plantio ao consumidor: tecnologia de produção, pós-colheita, comercialização**. Porto Alegre: Cinco Continentes. 2001. 124 p.

NAVA, G.A.; BRACKMANN, A. Efeito da remoção de etileno e sistemas de armazenamento sobre a qualidade de pêssegos (*Prunus persica* (L.) Batsch), cv. Chiripá. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, p. 153-158, 2001.

PRUSKY, D.; KEEN, N.T. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. **Plant Disease**, St Paul, v. 77, p. 114-119, 1993.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R.; KOBILER, I. The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, London, v. 40, p. 45-52, 1991.

PRUSKY, D.; WATTAD, C.; KOBILER, L. Effect of ethylene on activation of lesion development from quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 9, p. 864-868, 1996.

SOMMER, N.F. Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 7, p. 331-339, 1985.

STAHMANN, M.A.; CLARE, B.G.; WOODBURY, W. Increased disease resistance and enzyme activity induced by ethylene and ethylene production by black rot infected sweet potato tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 41, p. 1505-1512, 1966.

STOVER, R.H.; FREIBERG, S.R. Effect of carbon dioxide on multiplication of *Fusarium* in soil. **Nature**, London, v. 181, p. 788-789, 1958.

TABAK, H.H.; COOKE, W.B. The effects of gaseous environments on the growth and metabolism of fungi. **Botanical Review**, Lancaster, v. 34, p. 126-252, 1968.

TOZETTO, L.J.; RIBEIRO, W.R.C. Ocorrência de podridão em frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), causada por *Phyllosticta* sp., em Brasília DF. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 160, 1993. Abstract.

_____. Tratamento pós-colheita de goiaba (*Psidium guajava*, L.) contra podridão de *Guignardia psidii*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 20, p. 229-234, 1998.

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

WELLS, J.M.; SPALDING, D.H. Stimulation of *Geotrichum candidum* by low oxygen and high carbon dioxide atmospheres. **Phytopathology**, Lancaster, v. 65, p. 1299-1302, 1975.

ANEXOS

Anexo A - Superfícies de resposta da germinação (A) e formação de apressórios (B) por conídios de *Guignardia psidii*, em função da temperatura e do período de molhamento *in vitro* e superfícies de resposta da germinação (C) e formação de apressórios (D) por conídios de *G. psidii*, em função da temperatura e do período de molhamento *in vivo*, (A) descrita pela função $Y=((1,172836)*((T-(6,66267))^{(1,83021)})*(((40,7201)-T)^{(,939981)}))*((,037301)*(1-(1,23561)*\exp(-,176584)*M)))$ e (B) descrita pela função $Y=((,016498)*((T-(9,90673))^{(4,05899)})*(((40,7107)-T)^{(2,95846)}))*((,611e-5)*(1-(1,17224)*\exp(-,090582)*M)))$, (C) descrita pela função $Y=((1,02989)*((T-(2,07595))^{(2,42938)})*(((46,5336)-T)^{(2,12356)}))*((0,279e-4)*(1-(16,4046)*\exp(-,650653)*M)))$, e (D) descrita pela função $Y=((0,351e-4)*((T-(9,99994))^{(4,27578)})*(((40,0019)-T)^{(3,53199)}))*((0,176e-3)*(1-(4,69358)*\exp(-,384784)*M)))$. Onde Y é a variável analisada, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas

Anexo B - Superfícies de resposta da germinação (A) e formação de apressórios (B) por conídios de *Guignardia psidii*, em função da temperatura e do período de molhamento até 24 horas *in vitro*, (A) descrita pela função $Y=((,172836)*((T-(6,66267))^{(1,83021)})*(((40,7201)-T)^{(.939981)}))*((,037301)*(1-(1,23561)*\exp(-,176584)*M)))$ e (B) descrita pela função $Y=((,016498)*((T-(9,90673))^{(4,05899)})*(((40,7107)-T)^{(2,95846)}))*((,611e-5)*(1-(1,17224)*\exp(-,090582)*M)))$, em que Y é a variável analisada, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas

Anexo C - Superfície de resposta da germinação (A), formação de apressório (B) e apressórios melanizados (C) por conídios de *Guignardia psidii*, em função da temperatura e do período de molhamento *in vitro*, descritas pelas funções (A) $Y = ((6,165) * ((T - 6,718)^{2,276}) * (((41,463) - T)^{1,423})) * ((0,005) * (1 - (0,993) * \exp(-(0,431e-3) * M))))$, (B) $Y = ((0,323e-5) * ((T - 10)^{3,554}) * (((43,414) - T)^{3,26})) * ((0,202) * (1 - (0,981) * \exp(-(0,006) * M))))$ e (C) $Y = ((0,179) * ((T - 10)^{4,282}) * (((41,898) - T)^{3,703})) * ((0,603e-6) * (1 - (1,004) * \exp(-(0,002) * M))))$, em que Y é a variável analisada, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas

Maria Eugenia Escanferla

Bióloga

Pré-Penetração de *Guignardia psidii* em goiaba: influência da temperatura, duração do molhamento, idade dos frutos e concentração de etileno e dióxido de carbono

Orientador:

Prof. Dr. NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR

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

Piracicaba

2007