**INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA LIBERAÇÃO DE ASCÓSPOROS
E NA PRÉ-PENETRAÇÃO DE *Guignardia citricarpa* Kiely
[*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) van der Aa]**

ALEXANDRE FURTADO SILVEIRA MELLO

Engenheiro Agrônomo

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

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro - 2003

ERRATA

ALEXANDRE FURTADO SILVEIRA MELLO. INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA LIBERAÇÃO DE ASCÓSPOROS E NA PRÉ-PENETRAÇÃO DE *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) van der Aa]

p.	item	linha	onde se lê	leia-se
31	4.3	décima sexta	$y = - 0,27x^2 + 2,70x + 4,08$ $R^2 = 0,38$ (eq. 6)	$y = - 0,76x^2 + 11,21x + 8,36$ $R^2 =$ 0,42 (eq. 6)
37	4.4	quinta a nona	Tabela 3. Germinação de ... secagem gradativa	Tabela 3. Estimativas de contraste e nível de significância entre as médias dos experimentos 1 e 2 para o ensaio onde a secagem das gotas de suspensão de conídios foi feita de maneira gradativa
37	4.4	décima sexta até décima oitava	Tabela 4. Estimativas de contraste ... maneira gradativa	Tabela 4. Germinação de conídios de <i>G. citricarpa</i> (%) em função de períodos de molhamento contínuo de 12 horas (12M), 24 horas (24M) ou períodos de 6 horas intercalados por períodos secos de 6 (6M+6S+6M) e 8 horas (6M+8S+6M) ou períodos de 12 horas intercalados por períodos secos de 6 (12M+6S+12M) e 8 horas (12M+8S+12M), secagem gradativa

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

Mello, Alexandre Furtado Silveira

Influência da umidade na liberação de ascósporos e na pré-penetração de
Guignardia citricarpa Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) van der Aa] /
Alexandre Furtado Silveira Mello. - Piracicaba, 2003.

51 p.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
2003.

Bibliografia.

1. Conídio 2. Efeito do molhamento 3. Fungo fitopatogênico 4. Laranja
5. Mancha-preta-dos-citros 6. Micologia I. Título

CDD 634.31

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

*Aos meus pais Jorge e Alice pela
oportunidade e carinho desde o meu
nascimento.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia pela oportunidade concedida tanto na graduação como na realização no curso de mestrado.

À Profa. Dra. Lilian Amorim, pela orientação, confiança, apoio e incentivo ao longo dos quase cinco anos de convivência.

Aos meus amigos e irmãos Ademir Neves e Alexandre Marinelli pelos vários momentos compartilhados e pela companhia constante.

Aos amigos e colegas do setor de fitopatologia Ana Beatriz, Ana Paula M., Ana Paula T., Andressa, Cândido, Daniel, Hugo, Ivan, Leonardo C., Leonardo F., Luciana, Luiz Fernando, Margarita, Marília, Maristela, μ -nuto, Patrícia Cia, Paulo Albuquerque, Paulo Tarso, Rachel, Ricardo, Rock, Silvio, Solange pelos inúmeros momentos de alegria e dúvidas compartilhados, que para sempre permaneceram na minha memória e que sem dúvida foram o principal esteio na minha permanência no mestrado.

À Fapesp pela concessão da bolsa de estudos desde a minha graduação.

À querida “Marisol” que mesmo geograficamente distante sempre esteve presente e me apoiando em todas as coisas realizadas, certas ou não.

À Dra. Leila de Castro Louback Ferraz, pelos ensinamentos, amizade e pela oportunidade de ingresso no Setor de Fitopatologia.

A Marcel Bellato Spósito pelo apoio no fornecimento de mudas.

A Maristela Minatel pelo apoio na realização dos ensaios *in vitro*.

Ao Eng. Agro. Rodrigo Mendes e ao Dr. Wellington Luis de Araújo do Departamento de Genética e a Ms. Marília Della Vechia do Setor de Fitopatologia pela paciência nos ensinamentos e na realização das PCR's.

À minha grande amiga Sabrina Motoshima pela companhia constante.

Às amigas Ana Beatriz, Ana Paula Teixeira e Andressa Machado pela colaboração direta na realização deste trabalho.

A Silvíca's pela amizade, parceria e apoio sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Jorge Rezende pela concessão do laboratório de virologia para a realização das avaliações moleculares.

Aos funcionários Marise, Jefferson e Marina, pelo apoio.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Origem e importância da mancha preta dos citros.....	4
2.2 Sintomatologia da mancha preta dos citros.....	5
2.3 Etiologia da mancha preta dos citros	7
2.4 Epidemiologia da mancha preta dos citros.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Importância de ascósporos e conídios de <i>Guignardia citricarpa</i> na infecção de plantas armadilhas	12
3.1.1 Localização do experimento	12
3.1.2 Material vegetal.....	12
3.1.3 Avaliação da doença	13
3.1.4 Variáveis climáticas	16
3.2 Efeito de variáveis climáticas na liberação de ascósporos quantificada em armadilha caça-esporos	16
3.2.1 Armadilhas caça-esporos	16
3.2.2 Variáveis climáticas	17
3.2.3 Análise de regressão.....	17
3.3 Desenvolvimento de protocolo para quantificação da germinação de conídios de <i>G. citricarpa</i> “in vitro”	18
3.3.1 Cultivo de <i>G. citricarpa</i> (origem, obtenção e manutenção da colônia)	18

3.3.2 Preparo das lâminas de poliestireno	19
3.3.3 Preparo da suspensão de esporos	19
3.3.4 Efeito de suco de laranja e de limão de diferentes cultivares na germinação “in vitro” de <i>G. citricarpa</i>	20
3.3.5 Avaliação.....	20
3.3.6 Delineamento estatístico e análise de dados	21
3.4 Efeito de períodos de molhamento contínuos e descontínuos na germinação de conídios de <i>Guignardia citricarpa</i> “in vitro”	21
3.4.1 Análise dos dados.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Importância de conídios e ascósporos de <i>Guignardia citricarpa</i> na infecção de plantas armadilhas	24
4.2 Efeito de variáveis climáticas na liberação de ascósporos quantificada em armadilha caça-esporos	27
4.3 Desenvolvimento de protocolo para quantificação da germinação de conídios de <i>G. citricarpa</i> “in vitro”	31
4.4 Influência de períodos de molhamento contínuos e descontínuos na germinação de <i>G. citricarpa</i>	36
5 CONCLUSÕES	40
ANEXO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

**INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA LIBERAÇÃO DE ASCÓSPOROS E NA PRÉ-
PENETRAÇÃO DE *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.)
van der Aa]**

Autor: ALEXANDRE FURTADO SILVEIRA MELLO

Orientadora: Profa. Dra. LILIAN AMORIM

RESUMO

A mancha preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der Aa.], é uma doença de grande ocorrência no sul do Estado de São Paulo. Estudos epidemiológicos dessa doença ainda são controversos devido principalmente, às diferenças climáticas e do sistema de produção no Brasil, quando comparados com os países pioneiros no estudo da doença. Nesse trabalho, procurou-se elucidar as épocas favoráveis à infecção e a importância relativa de conídios e ascósporos nesse processo por meio de plantas armadilhas. Mudanças de limão ‘Siciliano’ (*Citrus limon* (L.) Burn. f.), suscetíveis a *G. citricarpa*, foram colocadas em dois talhões de um pomar de citros em uma propriedade comercial. Num dos talhões as folhas caídas no solo, fonte de inóculo de ascósporos, foram removidas. No outro talhão as folhas permaneceram sobre o solo. Durante os meses de outubro de 2002 a maio de 2003 três mudas permaneceram expostas em cada talhão por um mês, ao

final do qual eram substituídas por novas. Não foi possível diferenciar a importância de conídios e de ascósporos por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR) nem de sintomatologia das folhas, pois a infecção foi constatada somente em duas das avaliações realizadas. A relação entre a liberação de ascósporos e as condições climáticas também foi avaliada. Armadilhas caça-esporos foram instaladas em campo comercial e semanalmente o número de ascósporos capturados foi relacionado com a temperatura média diária, com a precipitação diária e a precipitação três dias antes da leitura dos ascósporos. Os resultados obtidos demonstram que a precipitação acumulada em três dias foi relacionada com a liberação de ascósporos pela equação $L = 6,45 + 0,04 Pp3d - 0,17 T$ onde L é a leitura de ascósporos, Pp3d é a precipitação três dias antes da leitura de ascósporos e T é a temperatura, com $R^2 = 0,49$. Paralelamente, foram conduzidos experimentos *in vitro*, visando a determinação de sucos cítricos que favorecessem a germinação de conídios, com o objetivo final de realizar experimentos que avaliassem a influência de períodos descontínuos de molhamento na capacidade de germinação de conídios de *P. citricarpa*. Suco de laranja das cultivares Pêra e Valência na concentração de 4% mostraram-se os mais favoráveis na indução da germinação de conídios com índice de germinação variando entre 23,89 e 41,81%. A interrupção do período de molhamento independentemente de ser gradativa ou rápida não influenciou na germinação de conídios, mostrando assim a grande capacidade germinativa do fungo.

**INFLUENCE OF HUMIDITY ON THE ASCOSPORE RELEASE AND ON THE
PRE-PENETRATION OF *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa*
(McAlp.) Van der Aa]**

Author: ALEXANDRE FURTADO SILVEIRA MELLO

Adviser: Profa. Dra. LILIAN AMORIM

SUMMARY

Citrus black spot, caused by the fungi *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der Aa], is a disease of large importance to the South of São Paulo State. Epidemiological studies on this disease are yet controversial due to climatic differences and to the production system used in Brazil, when comparing them to the countries pioneering the study of this disease. The favorable seasons and the relative importance of conidia and ascospores in this process by the usage of trap plants were aimed to be elucidated in the present work. Young plants of lemon (*Citrus limon* (L.) Burn. f.) susceptible to *G. citricarpa* were placed inside two citrus orchards located in a commercial production area. The leaves on the floor, which are ascospores inoculum source, were removed from one of the orchards. In the other, the leaves were kept on the soil. Three young plants were kept exposed in each orchard for one month during October 2002 and May 2003. At the end of the period, they were replaced for new ones. It was neither possible to differentiate the importance of conidia and ascospores by

means of Polymerase Chain Reaction (PCR) nor by means of leaf symptoms, because the infection was noted only in two evaluations performed. The relationship between the ascospore release and the climatic conditions were also evaluated. Spore traps were installed in the commercial production area and the number of trapped ascospores was weekly related to the daily average temperature, to the daily precipitation, and to the precipitation occurred three days before the evaluation of ascospores. The results obtained showed that the precipitation accumulated within three days was related to the ascospores release by the equation $L = 6.45 + 0.04 \text{ Pp3d} - 0.17 \text{ T}$, where L is the ascospores evaluation, Pp3d is the precipitation occurred three days before the ascospores evaluation, and T is the temperature, with $R^2 = 0.49$. In addition, *in vitro* experiments were carried out aiming to determine the citrus juice that enabled the germination of conidia. The final objective was to perform experiments that evaluated the influence of interrupted dew periods on the germination capacity of conidia of *P. citricarpa*. Orange juice from cvs. Pêra and Valência at 4% showed to be more favorable to the germination induction of conidia, with a germination index varying from 23.89 to 41.81%. The interruption in the dew period did not influence on the germination of conidia, independently of being gradual or abrupt, showing the large germination capacity of the fungi.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de caráter predominantemente agrícola aonde produtos como soja, milho, cana-de-açúcar e citros têm um papel importante para o equilíbrio da balança comercial. Dentre as culturas de exportação, a de citros é uma das que apresentam maior destaque, gerando no ano de 2002 um rendimento 18.446.901 de toneladas e com previsão de safra para 2003 de 17.216.007 de toneladas. Para o Estado de São Paulo essa cultura adquire um caráter ainda mais importante, uma vez que esse representa 72% de toda a área cultivada e 82% da produção brasileira (FNP Consultoria & Comércio, 2003).

Historicamente as plantas cítricas foram introduzidas pelos colonizadores e em 1540 havia laranjais por todo o litoral brasileiro (Silveira, 1996). Atualmente o parque citrícola do Estado de São Paulo e do triângulo mineiro está baseado em 4 cultivares principais como copa: Pêra, Valência, Natal e Hamlin. Dentre essas, as cvs. Pêra e Valência vêm se destacando principalmente pela melhor qualidade dos frutos produzidos, a primeira representa cerca de 50 % do total de copas utilizadas e a última cerca de 27,5%, apresentando um crescimento médio de 1,5 e 0,83% ao ano respectivamente (FNP Consultoria & Comércio, 2002).

Dentre os custos de produção, os gastos com produtos fitossanitários representam em torno de 24% do total empreendido no Estado de São Paulo para lavouras de citros em produção estável. Neste contexto, as doenças surgem como um dos principais problemas da cultura. Cronologicamente, a primeira doença epidêmica na citricultura brasileira foi a tristeza (Citrus tristeza vírus – CTV), que causou enormes danos na época de sua ocorrência (1937). Posteriormente surgiram doenças como a gomose causada por

Phytophthora spp., o cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv *citri*), a leprose (Citrus leprosis vírus – CiLV), a clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*) e algumas doenças de menor importância.

Além das doenças acima citadas outra doença fúngica que atualmente causa significativo impacto econômico principalmente na região sul do Estado de São Paulo é a pinta preta ou mancha preta dos citros causada por *Guignardia citricarpa* Kiely. A data do ingresso da doença no Brasil é controversa, existindo um registro que assinala sua chegada em um período entre 1938 e 1940 no município de Piracicaba/SP onde frutos com sintomas típicos foram observados em uma feira livre, porém, após este período e até a década de 80 não houve mais relatos da doença, provavelmente por conta da eliminação de grande parte do parque citrícola por causa da tristeza dos citros. No início da década de 80, sua ocorrência foi relatada no Estado do Rio de Janeiro, atingindo vários municípios produtores da Baixada Fluminense (Ramos & Pio, 2000). Em 1992, a doença reapareceu no Estado de São Paulo, em uma importante região citrícola, compreendida pelos municípios de Conchal e Mogi-Guaçu (Goes & Feichtenberger, 1993). Atualmente, no Estado de São Paulo a doença encontra-se presente, de forma comprovada, em pomares de 44 municípios. Além desse Estado, a doença também ocorre no Vale do Caí, no Rio Grande do Sul, desde meados da década de 80 e, a partir do final da década de 90, também no Triângulo Mineiro, no Estado de Minas Gerais.

O fungo *G. citricarpa* apresenta duas estruturas infecciosas: os ascósporos e os conídios. A maioria dos estudos sobre a doença aponta os primeiros como os principais agentes causais. Estes estudos porém, em sua maioria, foram realizados em regiões onde as lavouras são irrigadas o que permite uma homogeneização no período de florescimento. No Brasil, as plantações de citros são realizadas em sua maioria sem irrigação podendo os conídios apresentar papel mais importante na infecção da doença do que os ascósporos.

Neste sentido, realizaram-se experimentos com os objetivos de: (i) avaliar a capacidade do patógeno em germinar em períodos descontínuos de molhamento *in vitro*; (ii) analisar a influência de variáveis climáticas na liberação dos ascósporos; e (iii)

avaliar o papel de ascósporos e conídios na infecção de plantas armadilhas colocadas em campos de laranja com a presença do fungo na forma exclusiva de conídios ou na forma de conídios e ascósporos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem e importância da mancha preta dos citros

A mancha preta ou pinta preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der Aa.], foi inicialmente descrita em 1895 na Austrália causando grandes perdas em frutos de laranja ‘Valência’ (Kiely, 1948). O segundo relato dessa doença ocorreu em 1925 na África do Sul onde Doidge (1929) encontrou a doença em uma região de baixa importância econômica na citricultura daquele país. Devido ao pouco cuidado fitossanitário, a doença atingiu estágio epidêmico entre 1956 e 1959 e a principal região produtora (Transvall) foi atingida (Kotzé, 1996). Posteriormente a doença passou a ser relatada em vários países entre eles: China, Filipinas, Indonésia, Taiwan, Japão, Swazilândia, Zimbábue, Moçambique, Argentina, Peru e Brasil (Kotzé, 1988; Feichtenberger, 1996).

No Brasil a época de ingresso da doença é controversa; uma primeira linha apresenta essa como sendo em agosto de 1937 (Averna-Saccá, 1940) onde a doença foi observada em frutos de laranjeira ‘Pêra’ e ‘Seleta’ no mercado municipal de Piracicaba/SP. Como deste período até 1980 não houveram relatos da doença, supõe-se que ou a identificação tenha sido incorreta ou que a doença tenha sido erradicada de maneira temporária com a eliminação de grande parte do parque citrícola em virtude da tristeza dos citros neste mesmo período (Goes, 1998).

O novo surgimento da doença ocorreu no início de 1980 no Estado do Rio de Janeiro, nos municípios de São Gonçalo e Itaboraí (Robbs, 1990; Robbs & Bittencourt, 1995). Posteriormente, a doença foi diagnosticada no Rio Grande do Sul em 1986

(Feichtenberger, 1996), São Paulo (Goes & Feichtenberger, 1993) e Minas Gerais em 2001.

No Estado de São Paulo, responsável por 82% da produção nacional (FNP Consultoria & Comércio, 2003), a doença surgiu nos municípios de Conchal e Engenheiro Coelho (Goes & Feichtenberger, 1993). Em seguida foram encontrados focos nos municípios de Limeira, Araras, Rio Claro, Mogi Guaçu, Aguaí, Pirassununga, Santa Cruz das Palmeiras e Casa Branca (Feichtenberger, 1996; Goes, 1998).

No Brasil a importância da mancha preta dos citros está mais relacionada com a diminuição na produtividade em virtude da queda prematura dos frutos e aumento no custo de produção em virtude das grandes quantidades aplicadas de fungicidas, do que com a comercialização de frutas para exportação, uma vez que o Brasil é apenas o 9º país exportador de laranja fresca (FNP Consultoria & Comércio, 2003). O país, apesar de maior produtor mundial de laranja, assume tal condição como exportador, principalmente por causa das suas condições climáticas, que tornam o fruto com aparência indesejável ao mercado externo (Gimenes – Fernandes, comunicação pessoal).

No suco de laranja, principal produto exportado na cadeia citrícola, observa-se que o grau de severidade da pinta preta dos citros não está correlacionado com a qualidade do suco quando avaliadas a quantidade de sólidos solúveis (° Brix), acidez total e a relação entre ambos (Schinor, 2001), ao contrário do que é citado por Goes (1998) onde frutos infectados na África do Sul apresentam conteúdo de ácidos mais baixo o que os torna mais adocicados do que frutos sadios.

2.2 Sintomatologia da mancha preta dos citros

A mancha preta dos citros pode afetar frutos, folhas, pedúnculos, pecíolos, ramos verdes e espinhos. A manifestação dos sintomas de frutos infectados por *G. citricarpa* pode demorar entre dois e cinco meses uma vez que o fungo apresenta um longo período de quiescência que em geral só termina com o amadurecimento do fruto (Goes, 1998). Além disso, as partes afetadas em alguns casos podem não apresentar os sintomas

típicos da doença (Aguilar-Vildoso, 2002). Aumento de temperatura próximo ao período da maturidade do fruto (McOnie, 1964b) e aumento da intensidade luminosa (Brodrick & Rabie, 1970) também são fatores que podem interferir na duração deste período.

De acordo com Fundecitrus (2000) existem quatro sintomas mais conhecidos:

- Mancha preta: também conhecido como mancha dura este sintoma é o mais típico da doença, surgindo quando os frutos estão na fase de transição do verde-amarelo, onde as lesões nos frutos verdes têm halo amarelado e nos de casca amarela apresentam halo esverdeado. Com o desenvolvimento da lesão, as bordas ficam mais elevadas com centro deprimido, contendo em seu centro pontos escuros, que são as estruturas assexuais de multiplicação do fungo (picnídios);

- Falsa melanose ou pinta preta: este sintoma se assemelha ao da melanose dos citros causado por *Diaporthe citri*. As manchas são pequenas (menores que 1 mm de diâmetro), salientes, de coloração marrom-chocolate só que ao contrário das manchas causadas por *Diaporthe* as de *Guignardia* não são ásperas ao tato;

- Mancha sardenta: as lesões são levemente deprimidas e avermelhadas, surgindo muitas vezes em frutos armazenados para exportação. Pode-se admitir que este sintoma seja um estágio intermediário da mancha dura, ou uma infecção tardia do fruto;

- Mancha virulenta: As lesões originam-se do desenvolvimento dos outros tipos de sintoma que se agregam formando lesões maiores e irregulares.

Recentemente devido à participação novos agentes, outros sintomas foram descritos (Fundecitrus, 2003):

- Mancha rendilhada: lesões superficiais sem bordas definidas e de textura lisa que aparecem quando os frutos ainda estão verdes;

- Mancha trincada: lesão superficial que ocorre em pequeno número em frutos ainda verdes, quando o fruto amadurece a lesão trinca. Este sintoma está geralmente associado ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*).

2.3 Etiologia da mancha preta dos citros

A mancha preta dos citros é causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, que segundo Sivanesan (1984) é um ascomiceto, Loculoascomiceto, da ordem Dothideales e família Dothideaceae. Inicialmente, a fase anamórfica ou imperfeita foi considerada como *Phoma citricarpa* (McALp) Petrak (Fawcett, 1936). Atualmente, essa fase é referida como *Phyllosticta citricarpa* Van der Aa.

G. citricarpa produz ascocarpos ou peritécios somente em folhas em decomposição no solo (Feichtenberger et al., 1997). Eles são agregados ou isolados, globosos (100-175 µm de diâmetro), apresentando um ostíolo circular e não papilado. Os ascos são cilíndrico-clavados, bitunicados, apresentando 8 ascósporos em seu interior. Os ascósporos são unicelulares, hialinos, cilíndricos com o centro dilatado, apresentando apêndices hialinos nas duas extremidades.

A fase anamórfica *P. citricarpa* produz picnídios em lesões de frutos, folhas, ocasionalmente em pedúnculos de frutos e também em folhas velhas. Essas estruturas têm coloração marrom-escura ou preta, aparecem isoladamente ou em agregados de tamanho que varia de 115 até 190 µm de diâmetro, apresentando um ostíolo com diâmetro entre 12 e 14,5 µm (Feichtenberger et al., 1997). Segundo os mesmos autores conídios ou picnidiósporos apresentam forma obovóide (8-10,5 x 5,5-7 µm) ou subglobosos, são hialinos, unicelulares, multigutulados, com um apêndice (5-10 µm) hialino numa das extremidades. Normalmente os conídios ficam agregados devido a uma substância mucilaginosa que os recobre. Sob condições naturais, essa mucilagem apresenta-se de coloração creme claro, de aspecto brilhante (Baldassari et al., 2001). De acordo com Punithalingam & Woodhams (1982), essa mucilagem serve de proteção contra o ressecamento das estruturas do fungo quando expostas em ambiente adverso. Em condições laboratoriais, Cardoso Filho (2003) observou que colônias de *G. citricarpa* cultivadas em meio da ágar a 3% com discos de folhas de limão ‘Siciliano’, com substância mucilaginosa de cor mais pardacenta e menos brilhante (fato decorrente da idade da colônia) apresentavam viabilidade de germinação de conídios menor do que aquelas que se apresentavam mais claras e brilhantes.

Até 2002, acreditava-se que *G.citricarpa* apresentava uma raça avirulenta e uma outra raça virulenta (Kotzé, 1988). Porém, por meio de estudos moleculares e cultivo *in vitro*, Baayen et al. (2002) provaram que o isolado antes classificado como avirulento, na verdade era uma outra espécie conhecida como *Guignardia mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*) que é comumente encontrada em 48 famílias de plantas geralmente como um comportamento endofítico em árvores.

Com exceção da laranjeira ‘Azeda’ (*Citrus aurantifolia*) e seus híbridos (Kotzé, 1981) todas as variedades comerciais são suscetíveis a *G. citricarpa*. Aparentemente, no campo o comportamento do fungo varia pouco quando comparadas seleções de uma mesma cultivar (Schinor et al., 2002b). Porém, *in vitro*, observou-se que a densidade de estruturas reprodutivas e a porcentagem de picnídios com liberação de esporos foi diferente entre seleções de uma mesma cultivar (Schinor et al., 2002a), mostrando assim que estudos complementares devem ser realizados para o esclarecimento do comportamento do fungo sobre as diferentes cultivares.

2.4 Epidemiologia da mancha preta dos citros

A mancha preta dos citros pode ser causada por dois tipos de esporos diferentes, os picnidiósporos (conídios) e os ascósporos. O ciclo da doença em geral se inicia quando um esporo se deposita sobre um fruto, uma folha ou um ramo e passa a infectá-lo. À medida que o fruto amadurece, surge na lesão originada pela infecção e colonização do fungo uma estrutura reprodutiva assexual denominada picnídio que produz os conídios que são disseminados a curta distância pela água (chuva, orvalho, irrigação), atingindo frutos suscetíveis próximos e principalmente na mesma planta. A formação de ascósporos ocorre em corpos de frutificação que se desenvolvem nas folhas infectadas caídas no chão. Os ascósporos se disseminam por respingos de água e vento, infectando folhas e frutos a curtas e longas distâncias (Fundecitrus, 2000).

Internacionalmente a literatura principalmente oriunda da Austrália e da África do Sul (países onde surgiu inicialmente a doença) aponta os ascósporos como principal

fonte infecciosa e principal agente causador das epidemias (Kiely, 1948; 1949; McOnie, 1964a; 1964c; 1965; 1967; Kotzé, 1981; 1988; 1996 e Schutte et al., 1997). Nestes países a doença é monocíclica, apresentando apenas o ciclo primário (infecção a partir de ascósporos), desprezando-se o possível papel do ciclo secundário (diversos ciclos assexuais recorrentes) no desenvolvimento da epidemia. Existem duas possíveis explicações para essa característica epidemiológica nesses países. A primeira delas é que nestes países as plantações de citros são irrigadas, fazendo com que a floração e a frutificação ocorram sempre em uma época específica e a outra é que a descarga dos ascósporos está concentrada totalmente durante o estágio fenológico mais suscetível do hospedeiro, ou seja, a formação dos frutos (McOnie, 1964a; 1964c).

No Brasil, a maioria dos pomares não é irrigada; essa característica faz com que a floração seja irregular causando assim a sobreposição de safras tornando possível a coexistência de frutos maduros e frutos jovens em uma mesma árvore. Essa característica faz com que os conídios adquiram um papel tão importante no desenvolvimento da doença quanto os ascósporos. Este comportamento foi relatado por Spósito et al. (2001), que observaram que no início da evolução da doença, as plantas sintomáticas possuem um padrão de distribuição agregado e que a ocorrência da doença é verificada num raio de 30 metros a partir de uma planta doente, sugerindo, assim, o envolvimento adicional de conídios (picnidiósporos) aos ascósporos na dispersão da doença.

Além da fonte de inóculo disponível, as condições climáticas são outro fator determinante para a liberação de conídios (Gottwald, 1983) e infecção do patógeno (Kotzé, 1988). Para *G. citricarpa*, Mendes (1999) observou que o crescimento micelial *in vitro* foi favorecido por temperaturas entre 21 e 27 °C e a esporulação por uma faixa de temperatura menor entre 21 e 24 °C. Além da temperatura, esse mesmo autor avaliou a influência dos períodos de luminosidade, observando que quanto maior a fotofase maiores foram o crescimento micelial e a esporulação do fungo.

Para a germinação dos conídios do fungo *in vitro*, Noronha (2002) observou que a faixa de temperatura foi muito ampla ocorrendo formação de apressórios de 10 até 40 °C com a taxa de germinação variando em função dos períodos de molhamento

utilizados. O período de luminosidade, porém, parece exercer grande efeito na germinação dos conídios. Mendes (1999) observou que períodos de luz constante foram mais favoráveis à germinação dos conídios do que os períodos de escuro total, apresentando o período de 12 horas de claro, 12 de escuro comportamento intermediário na germinação dos conídios. Esse comportamento do fungo na fase imperfeita se assemelha aos encontrados por Brodrick & Rabie (1970) para a fase perfeita, onde a face de frutos assintomáticos colocados sob luminosidade apresentou maior severidade de doença do que aquela que recebeu menor luminosidade.

Os conídios de *G. citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*) em ensaios *in vitro* apresentaram maior taxa de germinação com formação de apressório quando submetidos a períodos mínimos de molhamento de 12 horas e temperatura mínima de 3 e máxima de 48,4 °C segundo estimativa de uma função beta-generalizada e molecular desenvolvida por Noronha (2002). A mesma autora observou que para temperaturas extremas ocorre a necessidade de um aumento no período de molhamento para a formação de apressórios, sendo isso possível somente a partir de 48 horas de molhamento.

Os ascósporos apresentam período para germinação e formação de apressórios ainda meio controversos. Segundo Kiely (1948) estes requerem períodos de mais de 24 horas para germinar e cerca de 48 horas para desenvolver apressório. Para McOnie (1967) a partir de 4-5 horas já se inicia a germinação de ascósporos sendo esta por volta de 45% após 24 horas de incubação, a formação de apressórios por sua vez se inicia com cerca de 24 horas com taxa de 20%.

Apesar da maioria dos trabalhos científicos avaliarem períodos de molhamento constante, o que se observa em condições de campo é uma alternância entre períodos úmidos e períodos secos ao longo do dia, muitas vezes obrigando os patógenos a interromperem sua germinação e desenvolvimento até o período mais úmido do dia seguinte. Para as diferentes espécies de *Alternaria*, esse mecanismo de sobrevivência é assegurado pela presença de melanina e a estrutura multicelular do conídio que garante uma proteção mútua (Rotem, 1998).

Bashi & Rotem (1974) observaram que o comportamento de quatro patógenos diferentes variou muito quando esses foram submetidos a condições descontínuas de

umidade. *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* infectou igualmente as plantas de tomateiro após um período de molhamento contínuo ou interrompido, graças à sobrevivência do seu tubo germinativo. O oomyceto *Phytophthora infestans* penetrou rapidamente folhas de batata compensando assim a sensibilidade de seus esporângios à dessecação. Os conídios de *Alternaria porri* f. sp. *solani* além de penetrarem rapidamente nas folhas, apresentaram resistência a seca. E por fim, o desenvolvimento de *Uromyces phaseoli* em feijoeiro nas condições de semi-árido somente foi observado nas épocas úmidas, uma vez que comparativamente aos outros microrganismos a infecção é lenta e a sobrevivência entre períodos de baixa umidade é baixa (Bashi & Rotem, 1974).

Além da infecção, outra fase do ciclo de relações patógeno-hospedeiro influenciado pelo molhamento é a esporulação. Bashi & Rotem (1975) notaram que *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* quando submetido a períodos interrompidos pela seca produziu menos esporos do que quando o molhamento foi contínuo. Para *Alternaria porri* f. sp. *solani* essa interrupção favoreceu a esporulação.

Para *Guignardia citricarpa* o efeito de períodos descontínuos de molhamento na germinação de conídios ainda não foi avaliado, dificultando assim a criação de sistemas de previsão que possam auxiliar na determinação das melhores épocas de controle da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Importância de ascósporos e conídios de *Guignardia citricarpa* na infecção de plantas armadilhas

3.1.1 Localização do experimento

O experimento foi realizado na fazenda Oriçanga, de propriedade da Fisher Agropecuária S/A., localizada no município de Mogi-Guaçu-SP. Nesta fazenda dois talhões com manejos diferenciados foram utilizados: no primeiro, as folhas caídas no solo foram removidas mensalmente com o uso de um coletor de folhas, adaptado de colhedeira da cultura do cafeeiro. Esse talhão foi instalado em área que faz divisa com a cultura dos citros em apenas uma das faces retangular, sendo as demais faces formadas por áreas de mata nativa (Anexo). No segundo talhão as folhas foram mantidas no solo. As parcelas úteis utilizadas foram de 42 m por 45 m, num total de 1.890 m² e 72 plantas. No entanto uma bordadura constituída por 15 ruas com espaçamento de 7 metros entre elas foi utilizada para evitar a chegada de ascósporos provenientes de outros talhões. As plantas utilizadas no experimento como fonte de inóculo de conídios tinham 10 anos e eram da cultivar Valência com porta enxerto de limão cravo.

3.1.2 Material vegetal

Mudas de limão 'Siciliano' (*Citrus limon* (L.) Burn. f.), suscetíveis à *G. citricarpa*, com 6 meses de idade plantadas em baldes plásticos contendo 0,0097 m³ de uma mistura de terra e esterco bovino curtido, na proporção de 4:1, foram colocadas entre duas plantas de citros em cada um dos talhões acima descritos (Figura 1-A). Em

cada talhão foram colocadas três mudas que permaneceram no campo por um período de 60 dias, as quais posteriormente foram removidas para casa de vegetação telada no Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP. Na casa de vegetação, todas as folhas foram identificadas com fitilho para evitar que as brotações posteriores à remoção das plantas do campo fossem utilizadas (Figura 1B). Durante o período em que permaneceram na casa de vegetação, as mudas foram irrigadas ao pé, para evitar uma possível disseminação do patógeno.

Figura 1 - Disposição das plantas armadilhas de citros no campo (A) e em casa de vegetação com as folhas que estavam sujeitas a infecção no campo por *G. citricarpa* identificadas com fitilhos plásticos (B)

3.1.3 Avaliação da doença

a) Sintomatologia

Semanalmente, durante o período em que as plantas permaneceram na casa de vegetação, até dois meses após a coleta do material para diagnose molecular, todas as

folhas marcadas foram inspecionadas para averiguar se havia a presença de sintomas típicos de mancha preta dos citros.

b) Diagnóse molecular via Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Dois meses após a transferência das plantas para a ESALQ/USP, foram coletados discos de folha para realização da PCR. Cada amostra era constituída de quatro discos de folha obtidos pela pressão da abertura contra a tampa de um Eppendorf de 1,5 mL. O peso total dos quatro discos era de aproximadamente 40 mg, peso sugerido pelo protocolo utilizado para extração do DNA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit).

A extração do DNA foi realizada com o kit Wizard® de extração (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) da Promega e o protocolo utilizado foi o seguinte:

- Maceração de quatro discos de folha com nitrogênio líquido em Eppendorf de 1,5 mL;
- Adição de 600 µl de “Nuclei Lysis Solution” e agitação do tubo por três segundos;
- Incubação a 65 °C por 15 minutos;
- Adição de 3 µl de “RNase Solution to the Cell Lysate” e mistura da amostra invertendo o tubo por 5 vezes. Incubação da mistura por 37 °C por 15 minutos. Manutenção da amostra em temperatura ambiente por cinco minutos;
- Adição de 200 µl de “Protein Precipitation Solution” e agitação em vortex por 20 segundos;
- Centrifugação por 3 minutos a 14.000 g;
- Remoção do sobrenadante contendo o DNA (deixando o pellet formado com proteína) e transferência para Eppendorf de 1,5 mL limpo contendo 600 µl de isopropanol em temperatura ambiente;
- Mistura da solução invertendo-se o tubo até notar-se a presença de DNA;
- Centrifugação a 14.000 g por 1 minuto à temperatura ambiente;

- Descarte do sobrenadante e adição de 600 µl de etanol 70% e inversão do tubo por 5 vezes para lavar o DNA. Centrifugação a 14.000 g por um minuto à temperatura ambiente;
- Retirada do etanol com o uso de uma pipeta de Pasteur;
- Inversão do tubo sobre papel absorvente por 15 minutos;
- Adição de 100 µl de “DNA Rehydration Solution” e re-hidratação do DNA por meio de incubação a 65 °C por uma hora com agitação periódica dos tubos;
- Armazenamento dos tubos em freezer.

Após a extração do DNA fez-se o preparo das amostras para a realização da reação de PCR. Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes:

- 3 µl do DNA total extraído;
- 0,25 µl de dNTPs 10 mM;
- 1 µl (10 pmol) de primer GCP1 (5' AAGTGTGAGTGTCTGAAGGTGG 3')
- 1 µl (10 pmol) de primer GCP2 (5' GACGACTCGCTTTTCTACGGC 3') (Glienke de Blanco, 1999);
- 2,5 µl de buffer 10x da Taq polimerase;
- 1,8 µl de MgCl₂ 25mM;
- 0,25 µl de Taq polimerase (Promega) 5u/µl;
- 15,2 µl de H₂O milli Q.

Após o preparo das amostras estas foram encaminhadas para o termociclador onde ocorreu a reação de PCR com uma desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, seguida de mais 1 minuto de desnaturação (92 °C), 1 minuto de anelamento (67 °C) e 1 minuto de extensão (72 °C), sendo os ciclos a partir da segunda etapa repetidos por mais 35 vezes. Após estes ciclos ocorria mais um ciclo de 72 °C pelo período de 7 minutos. O resultado da amplificação foi comparado com padrão molecular de 1kb.

Após a reação de PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio, colocando-se em cada poço uma quantidade de 5 µl da reação de PCR misturada a 4 µl de tampão de carregamento (dae). Além de três amostras por planta foi utilizado marcador molecular de 1kb, uma testemunha negativa obtida de discos de

folhas sadias de citros e testemunha positiva formada por 40 mg de micélio de *Guignardia citricarpa* produzidos em meio de cenoura líquido (200 g de cenoura, fervido em 1 litro de água destilada por uma hora, posteriormente acrescidos de 10 g de dextrose e com pH ajustado a 6,8), meio este que promove o crescimento micelial do fungo com menor quantidade de melanina, substância que pode alterar os resultados na reação de PCR.

3.1.4 Variáveis climáticas

Diariamente, de 15 em 15 minutos por meio de um sistema de aquisição de dados (datalogger) acoplado à uma estação meteorológica portátil os dados de temperatura local (média, máxima e mínima), de precipitação, de velocidade do vento e de umidade relativa do ar foram armazenados e posteriormente transferidos para computador onde foram analisados. A primeira análise de dados constituiu-se no cálculo da quantidade de horas de molhamento por dia no período em que as plantas armadilhas permaneceram no campo, considerando-se o “dia” o período de 12:00 até 11:45 do dia seguinte. Os períodos foram classificados em quatro classes: (0) menos que seis horas de molhamento, (1) de 6 até 10 horas de molhamento; (2) de 10 até 12 horas de molhamento e (3) períodos acima de 12 horas de molhamento. Para cada período foi obtida a temperatura média diária.

3.2 Efeito de variáveis climáticas na liberação de ascósporos quantificada em armadilha caça-esporos

3.2.1 Armadilhas caça-esporos

Com o objetivo de avaliar o número de ascósporos presentes no ar e buscar uma possível correlação entre a liberação destes e algumas variáveis climáticas, foi colocada uma armadilha caça-esporos (Quest Spore trap - Quest developments ® - África do Sul),

em cada talhão e entre as plantas de citros (Figura 2-A). Semanalmente, as placas de acrílico (Figura 2-B) contidas no interior das armadilhas foram enviadas para o Laboratório do Prof. Antonio de Goes da UNESP – Jaboticabal onde a contagem dos ascósporos foi realizada.

Figura 2 - Vista geral da localização da armadilha caça-esporo acoplada a uma placa de energia solar (A) e vista da placa de acrílico (responsável pela captura dos esporos) contida no interior da armadilha (B)

3.2.2 Variáveis climáticas

A obtenção das variáveis climáticas foi a mesma do item 3.1.4, porém, no processamento dos dados calculou-se a precipitação acumulada nos três dias anteriores à leitura de ascósporos, a precipitação e a temperatura média no dia da leitura sendo o período do dia delimitado entre 00:00 e 23:45 horas.

3.2.3 Análise de regressão

O número médio de ascósporos coletados nas duas armadilhas foi relacionado linearmente às variáveis precipitação acumulada nos três dias anteriores à leitura, precipitação no dia da leitura e temperatura média por meio de análise da regressão linear simples e múltipla.

3.3 Desenvolvimento de protocolo para quantificação da germinação de conídios de *G. citricarpa* “in vitro”

Com o objetivo de se determinar o período de molhamento necessário para a germinação de *G. citricarpa* e a influência da descontinuidade do molhamento na infecção foram realizados alguns ensaios *in vitro* seguindo a metodologia utilizada por Noronha (2002). Porém, utilizando essa metodologia que empregava a sacarose (30 g / 1000 mL) com o objetivo de favorecer a germinação de conídios foram obtidos baixos índices de germinação (8%). Visando aumentar a taxa de germinação do fungo, foram realizados alguns ensaios preliminares utilizando-se suco extraído dos frutos de diferentes plantas cítricas misturado na suspensão de esporos (Kotzé - comunicação pessoal). Além de qualificar quais variedades eram favoráveis, foram realizados ensaios para determinação das concentrações mais adequadas à germinação.

3.3.1 Cultivo de *G. citricarpa* (origem, obtenção e manutenção da colônia)

Para a realização dos ensaios foram utilizados dois isolados cedidos pelo Fundo de defesa da citricultura (FUNDECITRUS) (um deles proveniente do município de Limeira/SP e isolado de frutos de laranja e outro oriundo de Olímpia/SP também isolado de frutos de laranja) e dois isolados obtidos a partir de frutos colhidos no campo do local especificado no item 3.1.1.

Inicialmente frutos da cv. Valência foram colhidos no campo, submetidos a uma assepsia com água e detergente, seguida de limpeza com papel toalha umedecido em álcool 70% e, por fim, limpeza com papel toalha embebido em hipoclorito de sódio 1%.

Após a assepsia foram removidas as lesões típicas de mancha preta (tomando-se o cuidado do corte ser superficial removendo-se a lesão somente em nível de flavedo, casca), uma vez que a região do albedo poderia causar a inibição da germinação do fungo (Goes, 1998; Cardoso Filho, 2003). Após a remoção, os fragmentos de lesão foram depositados em meio ágar-água 1,5% (5 fragmentos por placa) preparado no dia anterior ao isolamento em câmara asséptica. Três dias após o isolamento discos de

micélio provenientes do crescimento micelial do fungo a partir da lesão foram repicados para meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (200 g batata cozida, 15 g de dextrose e 15 g ágar para 1 L água destilada).

A cada quarenta dias as colônias do fungo foram repicadas para novas placas de BDA com o objetivo de evitar ressecamento do meio de cultura e conseqüentemente perda da colônia.

3.3.2 Preparo das lâminas de poliestireno

Lâminas de poliestireno foram confeccionadas pela adição, em um recipiente de vidro, de fragmentos de placa de poliestireno em 50 mL de acetato de amila. Diariamente o recipiente foi agitado para a homogeneização do material e três dias após o preparo, lâminas de vidro previamente lavadas com água e detergente foram imersas no líquido formado e colocadas para secar por cinco horas em capela de exaustão. Antes de serem usadas, as lâminas de poliestireno foram colocadas em câmara de fluxo laminar por uma hora, com o objetivo de eliminar eventuais resíduos de acetato de amila ainda presentes, o que poderia influenciar negativamente na germinação do fungo.

3.3.3 Preparo da suspensão de esporos

Foram adicionados sobre colônias de *G. citricarpa* 10 mL de água estéril e, posteriormente, procedeu-se à raspagem da colônia utilizando-se alça de Drigalsky flambada. Na seqüência, esse material foi filtrado em uma camada constituída por três gazes autoclavadas e foram adicionados mais 5 mL de água estéril sobre a gaze para a remoção de eventuais conídios remanescentes. A concentração de esporos foi determinada por meio de hemocítômetro utilizando-se uma concentração de 10^5 esporos por mL.

3.3.4 Efeito de suco de laranja e de limão de diferentes cultivares na germinação “in vitro” de *G. citricarpa*

Em um ensaio preliminar, foi avaliada a influência de suco de fruta de diferentes citros: laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cvs. Valência e Pêra, limões (*Citrus limon* (L.) Burn. f. cv. Siciliano e *Citrus aurantifolia* (L.) cv. Taiti (Davies & Albrigo, 1994). Para a obtenção do suco os frutos foram cortados ao meio e espremidos sobre três gazes (previamente esterilizadas); posteriormente este suco foi misturado nas quantidades de 2, 4 e 10 µl em 100 µl da suspensão de esporos. Em seguida, o suco misturado à suspensão de esporos foi agitado vigorosamente em vortex por 20 segundos para promover a dissolução da massa de esporos evitando assim posteriores problemas na germinação e na contagem.

Após o preparo da suspensão de conídios e mistura com os sucos a serem testados, alíquotas de 40 µl da suspensão de esporos foram pipetadas e depositadas nas lâminas de poliestireno, as quais foram em seguida, colocadas sobre um suporte de vidro dentro de placas de Petri contendo duas folhas de papel de filtro autoclavado umedecido com 5 mL de água estéril. As placas foram incubadas em câmaras climatizadas (tipo B.O.D.) por 24 horas, com fotofase de 12 horas e temperatura de 25 °C.

Com base nos resultados do ensaio preliminar, foram realizados mais dois experimentos, utilizando os dois tratamentos que mais favoreceram a germinação dos esporos, com o objetivo de comprovação dos resultados e definição do suco de fruta que mais favoreceu a germinação, bem como da concentração a ser utilizada nos ensaios de molhamento *in vitro*.

3.3.5 Avaliação

A avaliação foi realizada em microscópio óptico, no aumento de 400x onde foram considerados germinados aqueles conídios cujo tubo germinativo fosse igual ou

maior que o seu próprio tamanho. Esse procedimento foi realizado 24 horas após a deposição das gotas sobre as lâminas de poliestireno.

3.3.6 Delineamento estatístico e análise de dados

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com 13 tratamentos (suco de fruta das cvs. Valência, Pêra, Siciliano e Taiti a 2, 4 e 10 µl de suco/ 100 µl de suspensão, e uma testemunha somente com a suspensão de esporos em água destilada) e seis repetições, sendo cada repetição constituída por uma gota da suspensão na lâmina de poliestireno (3 gotas por lâmina), onde foi feita a contagem de 60 esporos por gota. Nas duas repetições do ensaio realizado posteriormente com os dois tratamentos mais bem sucedidos a metodologia utilizada foi igual à anteriormente mencionada. A análise de dados foi realizada por meio de regressão polinomial pelo programa Plotit.

3.4 Efeito de períodos de molhamento contínuos e descontínuos na germinação de conídios de *Guignardia citricarpa* “in vitro”

Para esse ensaio foi utilizada a mesma metodologia descrita para o item 3.3 para o preparo das lâminas e preparo da suspensão de esporos. Para favorecer a germinação adicionou-se 40 µl/mL de suco de laranja ‘Pêra’ na suspensão de esporos. A influência de períodos de molhamento contínuos ou não na germinação de conídios foi o objeto de estudo e os tratamentos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados nos ensaios de influência de períodos contínuos ou não de molhamento na germinação de conídios de *G. citricarpa*

Tratamento	Descrição
12M	12 horas de molhamento contínuo
6M+6S+6M	Dois períodos de 6 horas de molhamento intercalados por um período seco de 6 horas
6M+8S+6M	Dois períodos de 6 horas de molhamento intercalados por um período seco de 8 horas
24M	24 horas de molhamento contínuo
12M+6S+12M	Dois períodos de 12 horas de molhamento intercalados por um período seco de 6 horas
12M+8S+12M	Dois períodos de 12 horas de molhamento intercalados por um período seco de 8 horas

Para a interrupção dos períodos de molhamento, foram utilizados dois procedimentos diferentes, caracterizando condições experimentais distintas. Na primeira, as lâminas foram transferidas das placas com papel de filtro umedecido para placas com papel de filtro seco e, uma vez encerrado o período seco, essas retornavam às placas com papel de filtro úmido (secagem gradativa). Na outra condição, as lâminas de poliestireno com as gotas de suspensão de esporos foram removidas das placas com papel de filtro úmido e depositadas no interior de uma capela por 20 minutos, até que as gotas secassem completamente. Na sequência essas foram encaminhadas para placas com papel de filtro seco e ficaram no interior da B.O.D. pelos períodos pré-determinados (secagem rápida). O retorno à condição úmida se deu através da adição de 40 µl de água estéril sobre cada uma das gotas secas e transferindo-se as lâminas para as placas com papel de filtro úmido.

Para finalizar os tratamentos acrescentou-se 20 µl de lactoglicerol em cada gota de suspensão e a contagem de esporos germinados foi realizada ao final do experimento. Foram realizadas duas repetições em épocas diferentes tanto para a condição de secagem gradativa, como para secagem rápida.

3.4.1 Análise dos dados

Os dados de porcentagem de germinação foram comparados por meio de análise de variância conforme o delineamento inteiramente ao acaso, considerando-se o ensaio fatorial, de modo a serem avaliados o efeito dos ensaios 1 e 2 e dos períodos de molhamento (Tabela 1), além da interação entre eles. A comparação entre períodos de molhamento foi feita pelo teste de contrastes ortogonais, tomando-se como dois grandes grupos o período total de molhamento (grupo de tratamentos com total de 12 h de molhamento e grupo com 24 h de molhamento). A seguir, comparou-se dentro dos grupos: molhamento contínuo com molhamento alternado e dentro deste, compararam-se os períodos secos de 6 e 8 horas. Para esta análise, utilizou-se a transformação angular da porcentagem de germinação ($\arcsen \sqrt{x/100}$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Importância de conídios e ascósporos de *Guignardia citricarpa* na infecção de plantas armadilhas

Das cinco análises moleculares realizadas via PCR, somente em uma das vezes foi diagnosticada uma amostra infectada. Este fato ocorreu na primeira remessa, quando uma amostra de uma planta que esteve presente no campo, onde as folhas não foram removidas (FNR), apresentou uma banda no gel após a reação molecular (Figura 3).

Figura 3 - Foto do gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo correspondente à 1ª remessa de plantas. M. marcador molecular de 1kb; 1. testemunha positiva; 2. testemunha negativa, 3-11 amostras coletadas de FNR e 12-20 amostras coletadas do tratamento onde as folhas foram removidas

Foi observada no campo a presença de vários frutos com sintomas típicos da doença mostrando assim a existência da fonte de inóculo. Além da fonte de inóculo, outros fatores podem influenciar a infecção e a colonização do fungo. A temperatura média observada no campo variou entre 19,74 e 24,37 °C (Tabela 2) faixa de temperatura que permite a germinação e a infecção de conídios e ascósporos (Noronha, 2003; Kotzé, 1981). Períodos de umidade relativa iguais ou acima de 95% também ocorreram ao longo dos períodos em que as plantas armadilhas permaneceram no campo (Tabela 2), assegurando assim o molhamento necessário para a infecção e colonização das plantas (Noronha, 2003).

Tabela 2. Número de dias em que o número de horas de molhamento foi inferior a 6 horas (0), entre 6 e 10 horas (1), entre 10 e 12 horas (2) e superior a 12 horas (3) e temperatura média ao longo dos períodos, considerando períodos de 12:00 às 11:45 do dia seguinte

Períodos	0	1	2	3	T °C
20/09/02 – 20/11/02	23	15	6	18	24,37
20/11/02 – 20/01/03	8	18	15	21	24,34
20/01/03 – 20/03/03	2	6	23	28	24,01
20/03/03 – 20/05/03	2	10	9	37	19,74

Uma vez asseguradas as condições para o desenvolvimento da doença, o método de diagnose torna-se responsável pela confiabilidade das avaliações. A reação em cadeia de polimerase (PCR) é considerada uma das técnicas mais rápidas e precisas para a diagnose de doenças de plantas, apresentando uma sensibilidade na detecção na ordem de fentogramas, ao passo que técnicas serológicas possuem sensibilidade na ordem de µg ou ng (Van Regenmortel, 1982). Apesar desta característica, a PCR apresenta como obstáculo para sua utilização a possível ocorrência de falsos positivos, devido principalmente a contaminações de reagentes e pipetas, e a sensibilidade da enzima

utilizada nas reações à presença de substâncias inibidoras em certos extratos vegetais (Zerbini et al., 2001). Neste trabalho, as ponteiras plásticas utilizadas foram descartadas imediatamente após a utilização, com o objetivo de minimizar as chances de contaminação; além disso, a utilização de amostras positivas (micélio do fungo) e amostras negativas (amostras de tecido foliar sem a presença do fungo) confirmaram a efetividade da reação e a não contaminação das amostras, respectivamente.

Outra dificuldade muito comum na utilização da PCR e que resulta em falsos negativos, é a determinação das quantidades de reagentes a serem utilizadas. Normalmente os problemas mais comuns estão no uso de concentrações elevadas de primers promovendo anelamento não específico, na alteração da concentração de magnésio (cofator da Taq polimerase), no desbalanço entre as bases constituintes da dNTP, no uso de quantidade elevada de Taq polimerase ou de concentração de DNA inibindo assim a amplificação (Eeles & Stamps, 1993). Além da concentração de 3 µl utilizada inicialmente foram realizadas reações com volumes de 0,3, 1 e 2 µl com objetivo de analisar a influência destas na incidência de reações positivas; porém, observou-se que os resultados foram idênticos aos obtidos com a quantidade de 3µl, mostrando que neste caso a concentração de DNA nas amostras não havia sido a responsável pela baixa incidência de resultados positivos.

Além dos problemas anteriormente citados, no caso específico de *G. citricarpa* Bonants et al. (2003) observaram que amostras colhidas de lesões com grande número de picnídios inibiram a ocorrência de reações positivas. Estes autores atribuíram essa inibição principalmente a componentes da parede dos picnídios e a componentes químicos formados na região que circunda a região da lesão, como fenóis e melanina. Ainda segundo estes autores, apesar deste inconveniente, a PCR apresenta uma eficácia na detecção de *G. citricarpa* maior que a técnica de incubação recomendada e utilizada pela União Européia. Enquanto a primeira, em amostras contendo lesões, apresenta eficácia de 90% e, em amostras sem lesões, eficácia de cerca de 65%, a técnica de incubação apresenta eficácia entre 40 e 50%, sem considerar o período de espera que no primeiro caso é de um dia e no último, de no mínimo cinco dias (Bonants et al., 2003).

Nas avaliações via sintomas somente uma planta da segunda remessa apresentou sintomas típicos de mancha preta dos citros (Figura 4). Esta planta esteve presente no campo onde as folhas não foram removidas no segundo período.

Figura 4 - Folha de uma planta de limão ‘Siciliano’, da segunda remessa que esteve presente no campo em que não foi feita a remoção de folhas caídas no solo e que apresentou sintomas típicos de infecção de *G. citricarpa*

Os sintomas foliares causados por *G. citricarpa* não são tão freqüentes quanto os dos frutos e o seu surgimento pode demorar de alguns dias até períodos de 10 a 15 meses (Aguilar-Vildoso, 2002; Feichtenberger, 1996 e Fundecitrus, 2003). Dessa forma, é provável que parte das plantas tenha sido infectada, porém, não apresentando sintomas típicos da doença dentro do período analisado.

4.2 Efeito de variáveis climáticas na liberação de ascósporos quantificada em armadilha caça-esporos

A contagem dos ascósporos foi realizada semanalmente em microscópio óptico no aumento de 400x (Figura 5). As leituras nas armadilhas caça-esporos foram correlacionadas com os dados da estação meteorológica. Observou-se que as maiores quantidades de ascósporos ocorreram nos períodos em que houve maior precipitação nos dias que antecederam a liberação (Figura 6). Duas equações foram obtidas por meio de regressões lineares múltiplas entre a leitura de ascósporos (L) e as variáveis climáticas.

A primeira (eq. 1) relacionou a liberação à precipitação diária (P) e à temperatura (T). A segunda (eq. 2) relacionou a liberação à precipitação três dias antes da liberação de ascósporos (Pp3d) e à temperatura (T). Ambas foram significativas.

$$L = 9,23 + 0,05 P - 0,27 T, R^2 = 0,36 \quad (p < 0,0001) \quad \text{eq. (1)}$$

$$L = 6,45 + 0,04 Pp3d - 0,17 T, R^2 = 0,49 \quad (p < 0,0001) \quad \text{eq. (2)}$$

Cortesia : A. de Goes - UNESP - Jaboticabal

Figura 5 - Imagem de ascósporos de *G. citricarpa* (circulados) capturados em armadilha caça-esporos e observados em microscópio óptico em aumento de 400x

Figura 6 - Número de ascósporos de *G. citricarpa* encontrados nas armadilhas caça-esporos, precipitação três dias antes da liberação dos ascósporos e temperatura média diária no período de 18 de outubro de 2002 a 24 de fevereiro de 2003

Os dados apresentados na Figura 6 confirmam a relação existente entre precipitação e a presença de ascósporos no ar. Esta relação já havia sido cogitada por Kotzé (1963), que não observou a liberação deste tipo de esporo na ausência de chuva ou mesmo na presença de água na forma exclusiva de irrigação. Para *Venturia inaequalis*, fungo também loculoascomiceto, os ascósporos são produzidos em ascos no interior de ascocarpos, onde permanecem até sua liberação. Para que a liberação ocorra, é necessária a presença de água para que os ascos maduros do fungo distendam-se, de modo que sua extremidade superior se alinhe ao ostíolo do peritécio permitindo, assim, a projeção dos ascósporos. Após o alinhamento, os ascósporos são projetados por um mecanismo de ejeção, promovido por diferenças de pressão osmótica entre o protoplasma do asco e o conteúdo do vacúolo onde se encontram os ascósporos (Amorim, 1995). Por conta das semelhanças entre os corpos de frutificação, o mecanismo de liberação de *G. citricarpa* e de *V. inaequalis* devem ser igualmente influenciados pela presença de água.

A influência da precipitação e da umidade na liberação de ascósporos já foi relatada para outros fungos. Gadoury et al. (1998) observaram que, à medida que se aumentou o período de chuva houve um aumento exponencial na descarga de ascósporos de *Venturia inaequalis*. Além da chuva, o orvalho, definido como deposição de gotas de água por condensação direta do vapor d'água do ar, geralmente sobre superfícies resfriadas pela radiação noturna (Mota, 1985), pode favorecer a liberação de esporos de fungos. Stensvand et al. (1998) constataram que nos períodos em que ocorre a formação do orvalho pode ocorrer a liberação de até 20% do total de ascósporos produzidos pelo fungo *V. inaequalis* de uma temporada. De acordo com esses autores, as condições ideais para a efetividade da infecção dos ascósporos liberados durante o período de orvalho são: presença de clima favorável com noites quentes e formação abundante de orvalho, elevada liberação de ascósporos e poucos períodos de baixa umidade no limbo foliar ou ocorrência de chuvas.

Não foi observada uma correlação entre a liberação de ascósporos e a temperatura média do dia, o que pode ser atribuído inicialmente à baixa amplitude entre as temperaturas observadas ao longo dos períodos analisados e também à grande

amplitude de temperaturas em que os ascos liberam os ascósporos, sendo verificado que esta pode ocorrer entre o intervalo de 5 e 25 °C (Kotzé, 1963).

4.3 Desenvolvimento de protocolo para quantificação da germinação de conídios de *G. citricarpa* “in vitro”

No ensaio preliminar, cujo objetivo foi o de se determinar os sucos cítricos com potencial para favorecer a germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa*, observou-se que todos os extratos aquosos com sucos cítricos favoreceram a germinação dos conídios, quando comparados com a testemunha negativa que continha somente água (Figuras 7 e 8) e com a testemunha positiva, que continha sacarose 30 g/1000 mL (Noronha, 2003). As equações e os respectivos coeficientes de determinação para o tratamento com limão ‘Siciliano’ (eq. 3), limão ‘Taiti’ (eq.4), laranja ‘Valência’ (eq.5) e laranja ‘Pêra’(eq. 6) foram:

$$y = - 0,49x^2 + 7,48x + 4,49 \quad R^2 = 0,72 \quad (\text{eq. 3})$$

$$y = - 0,27x^2 + 2,70x + 4,08 \quad R^2 = 0,38 \quad (\text{eq. 4})$$

$$y = - 1,25x^2 + 16,71x + 5,60 \quad R^2 = 0,90 \quad (\text{eq. 5})$$

$$y = - 0,27x^2 + 2,70x + 4,08 \quad R^2 = 0,38 \quad (\text{eq. 6})$$

Os extratos obtidos com suco extraído de laranja ‘Valência’ e de laranja ‘Pêra’ mostraram-se mais favoráveis à germinação dos conídios do que os extratos que continham sucos extraídos de limão ‘Siciliano’ e ‘Taiti’ (Figura 7). Com exceção dos tratamentos em que se utilizou o limão ‘Taiti’, na medida em que se aumentou a concentração de suco cítrico na diluição, obteve-se aumento na germinação de conídios. Este aumento na porcentagem de germinação, em média, foi de 5,9 % entre a concentração mais diluída e a concentração mais elevada. Para os tratamentos com extratos contendo suco de limão ‘Taiti’, a porcentagem de germinação dos conídios diminuiu 7,78% entre a concentração mais elevada e a mais diluída (Figura 7).

Figura 7 - Influência dos sucos de limão 'Siciliano' (A), limão 'Taiti' (B), laranja 'Valência' (C) e laranja 'Pêra' (D) na germinação *in vitro* de conídios de *G. citricarpa*

Figura 8 - Conídio de *G. citricarpa* com apressório formado, sendo considerado na avaliação como conídio germinado (A). Conídios com tubos germinativos menores que seu próprio tamanho e que na avaliação foram considerados como não germinados (B)

O uso de substâncias químicas para favorecer a germinação de esporos é uma prática recomendada por muitos pesquisadores. Segundo Mahuku & Goodwin (1998) esporos de diferentes fungos são produzidos em massa mucilaginosa. Essa massa possui funções de sobrevivência, diferenciação, crescimento e patogenicidade do fungo (Mahuku & Goodwin, 1998) e especificamente protege os esporos de efeitos adversos do ambiente como o frio, radiações ultravioleta, dessecação e flutuações da umidade relativa do ar (Louis & Cooke, 1985; Louis et al., 1988 e Nicholson & Moraes, 1980). Além dessas funções a massa protetora de esporos pode promover a germinação e a infecção de esporos inibindo a toxidez de fenóis produzidos pelos hospedeiros, aderindo os esporos à superfície dos hospedeiros e prevenindo a perda excessiva de íons e nutrientes (Beckett et al., 1990). Além da função promotora, a massa mucilaginosa pode reduzir a germinação de esporos devido à presença de inibidores germinativos em sua constituição (Leite & Nicholson, 1992).

Mahuku & Goodwin (1998) observaram que, em condições laboratoriais, muitas vezes os conídios produzidos eram lavados em água ou tampões que removiam promotores de germinação, assim como componentes benéficos à germinação. Esses autores realizaram um ensaio avaliando a influência de mucina, goma xanthana e sacarose na germinação de esporos de 10 fungos diferentes e concluíram que, em geral, o uso dessas substâncias propiciou aumento na germinação dos esporos quando comparados com a germinação exclusiva em água. Para Mahuku & Goodwin (1998) o efeito de cada produto variou muito dependendo do fungo estudado, mostrando, assim, a necessidade de realização de ensaios preliminares com o objetivo de se determinar os produtos que favorecessem a germinação do fungo objeto de estudo.

A partir dos resultados obtidos no experimento inicial (Figura 7) foram realizados mais dois ensaios, com o objetivo de analisar melhor a influência das cultivares Valência e Pêra na germinação dos conídios. Nestes ensaios, confirmou-se que ambas cultivares favoreceram a germinação dos esporos, quando comparadas com a testemunha negativa, com água destilada estéril, e com a testemunha positiva, que era constituída de água estéril acrescida de sacarose na proporção de 30 gramas por 1000 mL, que é o método sugerido para favorecer a germinação de conídios (Noronha, 2003).

A média de germinação dos conídios, 24 horas após o preparo da suspensão, na testemunha negativa foi de 0,97%, na testemunha positiva foi de 8%.

Entre os tratamentos realizados, aquele que obteve maior efetividade na germinação dos conídios foi o extrato de suco de laranja 'Valência', na concentração de 4%, com média de 41% de formação de tubos germinativos iguais ou maiores que o tamanho do conídio nos dois experimentos realizados. Para o extrato contendo suco de laranja 'Pêra', não houve diferença numérica muito grande entre as diferentes concentrações analisadas; houve um aumento na ordem de 5,42 % entre a menor e a maior concentração utilizadas e a média geral entre as concentrações foi de 24,67% (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do suco de laranja 'Valência' (A) e 'Pêra' (B) na germinação *in vitro* de *G. citricarpa* para o experimento 1 (—) e experimento 2 (---)

As equações e os coeficientes de determinação para os tratamentos com extrato de suco de laranja cv. Valência, experimento 1 (eq. 7), experimento 2 (eq. 8) e cv. Pêra experimento 1 (eq. 9), experimento 2 (eq. 10) foram, os seguintes:

$$y = -1,48x^2 + 17,73x + 6,04 \quad R^2 = 0,76 \quad (\text{eq. 7})$$

$$y = -1,33x^2 + 14,93x + 1,87 \quad R^2 = 0,86 \quad (\text{eq. 8})$$

$$y = -0,83x^2 + 10,94x + 2,67 \quad R^2 = 0,72 \quad (\text{eq. 9})$$

$$y = -0,37x^2 + 5,97x + 3,20 \quad R^2 = 0,53 \quad (\text{eq. 10})$$

Essa diferença numérica na porcentagem de germinação dos conídios entre os tratamentos que utilizaram extratos de suco das cultivares Pêra e Valência deve ser devida principalmente à diferença do ratio (relação entre sólidos solúveis (Brix) e acidez) entre as cultivares uma vez que, para os frutos utilizados a acidez foi de 3,70 para a cv. Pêra e 2,83 para a cv. Valência (Figueiredo, 1991).

4.4 Influência de períodos de molhamento contínuos e descontínuos na germinação de *G. citricarpa*

As análises de variância efetuadas segundo o esquema fatorial, nas duas condições experimentais adotadas, indicaram não haver interação significativa entre os ensaios e os tratamentos. Nos ensaios em que a transição entre a condição úmida e a condição seca foi gradativa, somente o efeito de tratamentos foi significativo, levando à comparação das médias de tratamentos nos dois ensaios conjuntamente (Tabela 3). Na Tabela 4 são apresentados os contrastes e os respectivos testes de significância.

Sob secagem rápida, foi observada diferença significativa entre ensaios ($P < 0,0001$), o que levou à análise dos contrastes entre médias de períodos de molhamento para cada ensaio isoladamente (E_1 , E_2). Em E_1 somente houve diferença significativa entre o conjunto de tratamentos com 12 horas de molhamento e o conjunto com 24 horas de molhamento (Tabela 5). Nenhum dos contrastes mais específicos

mostrou-se significativo (Tabela 6). Na segunda repetição do ensaio com períodos de molhamento interrompidos de maneira rápida (E₂), não foi detectada significância para qualquer dos contrastes, ou seja, os tratamentos tiveram efeitos similares quanto à percentagem de germinação de esporos (Tabela 6).

Tabela 3. Germinação de conídios de *G. citricarpa* (%) em função de períodos de molhamento contínuo de 12 horas (12M), 24 horas (24M) ou períodos de 6 horas intercalados por períodos secos de 6 (6M+6S+6M) e 8 horas (6M+8S+6M) ou períodos de 12 horas intercalados por períodos secos de 6 (12M+6S+12M) e 8 horas (12M+8S+12M), secagem gradativa

Contrastes ortogonais	Estimativa do contraste	P > F
Tot 12 M 'vs' Tot 24 M	0,0428	0,0979
12M contínuo 'vs' 12 M alternado	-0,0420	0,2752
6M+6S+6M 'vs' 6M+8S+6M	0,1239	0,0067
24M contínuo 'vs' 24 M alternado	-0,0088	0,8180
12M+6S+12M 'vs' 12M+8S+12M	0,08857	0,0492

Tabela 4. Estimativas de contraste e nível de significância entre as médias dos experimentos 1 e 2 para o ensaio onde a secagem das gotas de suspensão de conídios foi feita de maneira gradativa

Tratamentos	Germinação de esporos (%)		
	Experimento 1*	Experimento 2*	Média**
12M	34,72	23,61	29,17
6M+6S+6M	41,11	36,39	38,75
6M+8S+6M	25,28	30	27,64
24M	28,06	27,5	27,78
12M+6S+12M	28,33	20,83	24,58
12M+8S+12M	28,89	35,56	32,22

*média de 6 repetições ** média dos dois experimentos

Tabela 5. Média dos ensaios de germinação de conídios de *G. citricarpa* (%) em função de períodos de molhamento contínuo de 12 horas (12M), 24 horas (24M) ou períodos de 6 horas intercalados por períodos secos de 6 (6M+6S+6M) e 8 horas (6M+8S+6M) ou períodos de 12 horas intercalados por períodos secos de 6 (12M+6S+12M) e 8 horas (12M+8S+12M), por meio de secagem rápida

Tratamentos	Germinação de esporos (%)	
	Ensaio 1*	Ensaio 2*
12M	1,94	4,44
6M+6S+6M	1,67	4,72
6M+8S+6M	1,94	4,72
24M	3,61	8,06
12M+6S+12M	4,17	4,44
12M+8S+12M	3,61	5,00

*média de 6 repetições

Tabela 6. Estimativas de contraste e nível de significância dos ensaios 1 e 2 para o ensaio onde a secagem das gotas de suspensão de conídios foi feita de maneira rápida

Contrastes ortogonais	Ensaio 1		Ensaio 2	
	Estimativa do contraste	P >F	Estimativa do contraste	P >F
Tot 12 M 'vs' Tot 24 M	0,0625	0,0044	0,0231	0,3493
12M contínuo 'vs' 12M alternado	0,0212	0,7495	-0,1054	0,8604
6M+6S+6M 'vs' 6M+8S+6M	0,1755	0,5806	0,0722	1,0000
24 M contínuo 'vs' 24 M alternado	-0,0150	0,9479	-0,0026	0,0531
12M+6S+12M 'vs' 12M+8S+12M	-0,0062	0,4920	-0,1709	0,7559

Os resultados obtidos mostraram que o método utilizado para a simulação de molhamento pouco influenciou a germinação dos conídios. Na média dos experimentos

onde a secagem foi realizada gradativamente, somente o período de tratamento com 12 horas interrompidas com período de 6 horas apresentou diferença estatística do tratamento interrompido por 8 horas (Tabela 3). No ensaio onde a secagem foi rápida, no primeiro experimento, o grupo cuja somatória de período de molhamento era igual a 24 horas favoreceu a germinação, quando comparado com o grupo de períodos de 12 horas, porém, no segundo ensaio não houve diferença estatística entre os grupos (Tabelas 5 e 6). Com base nesses resultados, percebe-se a grande amplitude de períodos de molhamento que o fungo *G. citricarpa* possui para germinar, independentemente da interrupção dos períodos de molhamento.

Fungos fitopatogênicos, em geral, apresentam maiores taxas de germinação e infecção com o aumento da duração do período de molhamento, até que essa atinja um nível constante (Pitelli & Amorim, 2003; Rupe et al., 1996). Para o fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, foi observado que o período de molhamento está associado à temperatura do ambiente e que, em casos onde a temperatura foi mais baixa, o período de molhamento exigido foi maior (Rupe et al., 1996).

Para o fungo *Guignardia citricarpa*, experimentos *in vitro* mostraram que a porcentagem relativa de apressórios formados estava intimamente ligada com o período de molhamento. Porém, apesar de o fungo apresentar maior capacidade germinativa em períodos de molhamento maiores (24 e 48 horas), observou-se que, a partir de 8 e 12, horas já havia sido formado um número expressivo de apressórios (Noronha, 2003). Esses resultados se assemelham aos obtidos nesse trabalho, onde se observou que além da capacidade de germinação em períodos curtos, o fungo apresenta a capacidade de germinar em condições de molhamento interrompido, dificultando assim a elaboração de sistemas de previsão para o controle da doença.

5 CONCLUSÕES

A precipitação exerce grande influência na liberação de ascósporos.

Extratos de suco de laranja ‘Valência’ e ‘Pêra’ favorecem a germinação de conídios *in vitro*.

A interrupção do molhamento *in vitro* não afeta a germinação de conídios de *P. citricarpa* mostrando assim a grande amplitude de condições favoráveis à infecção do fungo.

ANEXO

Vista aérea do local onde foram depositadas as mudas visando a determinação do período mais favorável e da fonte de inóculo mais eficiente na infecção de citros por *G. citricarpa*. Em detalhe (branco) localização da parcela útil onde foram depositadas as mudas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-VILDOSO, C.I. (Coord.). **Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros**. Brasília: MAPA;DAS;DDIV, 2002. 72p.
- AMORIM, L. Disseminação. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.14, p.268-294.
- AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, v.15, n. 11/12, p.468-474, 1940.
- BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER Aa, H.A.; WEERDT, M. de; BROUWERSHAVEN, I.R. van; SCHUTTLE, G.C.; MACCHERONI JR, W.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v.92, p.464-477, 2002.
- BALDASSARI, R.B.; GOES, A. de; SANTOS, J.M. dos; TIMOSSI, A.J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.1, p.88-92, 2001.

- BASHI, E.; ROTEM, J. Adaptation of four pathogens to semi-arid habitats as conditioned by penetration rate and germinating spore survival. **Phytopathology**, v.64, p.1035-1039, 1974.
- BASHI, E.; ROTEM, J. Sporulation of *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici* in tomatoes and *Alternaria porri* f. sp. *solani* in potatoes under alternating wet-dry regimes. **Phytopathology**, v.65, p.532-535, 1975.
- BECKETT, A.; TATNELL, J.A.; TAYLOR, N. Adhesion and pre-invasion behaviour of urediniospores of *Uromyces viciae-fabae* during germination on host and synthetic surfaces. **Mycological Research**, v.94, p.865-875, 1990.
- BONANTS, P.J.M.; CARROLL, G.C.; WEERDT, M. de; VAN BRIYWERSHAVEN, I.R.; BAAYEN, R.P. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.503-513, 2003.
- BRODRICK, H.T.; RABIE, C.J. Light and temperature effects on symptom development and sporulation of *Guignardia citricarpa* Kiely, on *Citrus sinensis* (LINN) Osbeck. **Phytophylactica**, v.2, p.157-164, 1970.
- CARDOSO FILHO, J. A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo : *Guignardia citricarpa*). Piracicaba, 2003. 125p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. **Citrus**. Wallingford: CAB, 1994. 254p.

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

EELES, R.A.; STAMPS, A.C. **Polymerase chain reacticon (PCR):** the technique and its application. Austin: R.G. Landes Company, 1993. 107p.

FAWCETT, H.S. **Citrus disease and control**. New York: Mc Graw Hill, 1936. 656p.

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

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, cap.25, p. 261-296.

FIGUEIREDO, J. O. de. Variedades de copa de valor comercial. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.228-264.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2002. **Agrianual 2002:** Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2002. p.285-315: Citros – laranja.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2003. **Agrianual 2003:** Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2003. p.295-314: Citros – laranja.

FUNDECITRUS. **Manual de pinta preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, 2000. 7p. (Boletim Técnico)

- FUNDECITRUS. **Manual de pinta preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, 2003. 7p. (Boletim Técnico)
- GADOURY, D.M.; STENSVAND, A.; SEEM, R.C. Influence of light, relative humidity, and maturity of populations on discharge of ascospores of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, v.88, p.902-909, 1998.
- GLIENKE DE BLANCO, C. *Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Piracicaba, 1999. 200p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- GOES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, v.19, p.305-320, 1998.
- GOES, A. de; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p. 138, 1993. Suplemento. /Apresentado ao 26. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Aracajú, 1993 – Resumo/.
- GOTTWALD, T.R. Factors affecting spore liberation by *Cladosporium carpophilum*. **Phytopathology**, v.73, p.1500-1505, 1983.
- KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v.73, p.249-292, 1948.
- KIELY, T.B. Black spot of citrus in New South Wales coastal orchards. **The Agricultural Gazette**, v.1, p.17-20, 1949.

- KOTZÉ, J. M. Studies on the black spot disease of citrus caused by *Guignardia citricarpa* KIELY, with particular reference to its epiphytology and control at Letaba. Pretoria, 1963. 147p. Thesis (Ph. D.) – University of Pretoria.
- KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.65, p.945-950, 1981.
- KOTZÉ, J.M. Black spot. In WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 1988. p. 10-12.
- KOTZÉ, J.M. History and epidemiology of citrus black spot in South Africa. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.2, p.1296-1299, 1996.
- LEITE, B.; NICHOLSON, R.L. Mycosporine-alanine: A self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Experimental Mycology**, v.16, p.76-86, 1992.
- LOUIS, I.; COOKE, R.C. Conidial matrix and spore germination in some plant pathogens. **Transactions of the British Mycological Society**, v.84, p.661-667, 1985.
- LOUIS, I.; CHEW, A.; LIM, G. Influence of spore density and extracellular conidial matrix on spore germination in *Colletotrichum capsici*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.91, p.694-697, 1988.
- MAHUKU, G.S.; GOODWIN, P.H. Influence of sucrose, mucin, xanthan gum on spore germination of ten different fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.849-852, 1998.

- McONIE, K.C. Orchard development and discharge of ascospores of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. **Phytopathology**, v.54, p.1448-1453, 1964a.
- McONIE, K.C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, v.54, p.64-67, 1964b.
- McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and others hosts of a *Guignardia easiluy* confused with *G. citricarpa* the citrus black spot pathogens. **Phytopathology**, v.54, p.40-43, 1964c.
- McONIE, K.C. Source of infection for black spot of citrus. **The South African Citrus Journal**, p. 5-9, June, 1965.
- McONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. **Phytopathology**, v.57, p.743-746, 1967.
- MENDES, D. Aspectos nutricionais e físicos no desenvolvimento de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorph. *Guignardia citricarpa*) agente causal da mancha preta dos frutos cítricos Jaboticabal, 1999. 58p. Trabalho (Monografia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- MOTA, F.S. da. **Meteorologia agrícola**. São Paulo: Nobel, 1985. 376p.
- NICHOLSON, R.L.; MORAES, W.B.C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the spore matrix. **Phytopathology**, v. 70, p.255-261, 1980.

- NORONHA, M. A. de. 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]. Piracicaba, 2002. 67p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- PITELLI, R.L.C.M.; AMORIM, L. Effects of different dew periods and temperatures on infection of *Senna obtusifolia* by a Brazilian isolate of *Alternaria cassiae*. **Biological Control**, v.28, n.2, p.237-242, 2003.
- PUNITHALINGAM, E.; WOODHAMS, J.E. The conidial appendage in *Phyllosticta* spp. **Nova Hedwigia**, v.36, p.151-175, 1982.
- RAMOS, H.H.; PIO, L.C. Tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários. In: FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO & ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL. **Curso para formação de técnicos-instrutores com capacitação para o ensino da aplicação e manuseio de produtos fitossanitários**. São Paulo: Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2000. p.68-119.
- ROBBS, C.F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, v.11, p.87-95, 1990.
- ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A. M. **A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do Estado do Rio de Janeiro**. Guaratiba: EMBRAPA/CTAt, 1995. 5p. (Comunicado Técnico, 19).
- ROTEM, J. **The genus Alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity**. St. Paul: APS Press, 1998. 326p.

- RUPE, J.C.; SUTTON, E.A.; BECTON, C.M.; GBUR, E.E. Effect of temperature and wetness period on recovery of the southern biotype of *Diaporthe phaseolorum* var *caulivora* from soybean. **Plant Disease**, v.80, n.3, p.255-257, 1996.
- SCHINOR, E.H. Resistência de clones de laranjeira 'Pêra' e variedades afins à mancha preta dos citros. Piracicaba, 2001. 90p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SCHINOR, E.H.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Colonização de folhas de laranjeira 'Pêra' e variedades afins por *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.479-483, 2002a.
- SCHINOR, E.H.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Incidência e severidade da mancha preta dos citros em seleções de laranjeira 'Pêra' e variedades afins. **Laranja**, v.23, n.2, p.371-386, 2002b.
- SCHUTTE, G.C.; BEETON, K.V.; KOTZÉ, J.M. Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.81, p.851-854, 1997.
- SILVEIRA, J.A.M. **Resumo informativo da cultura dos citros no Estado de São Paulo**. Piracicaba: ESALQ, Depto. Ciência do Solo, 1996. 57p.
- SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs**. Berlin: J Cramer, 1984. 701p.
- SPÓSITO, M.B.; BASSANEZI, R.B.; FARIAS, P.R.; LOURENÇO, S.A.; LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Distribuição espacial da mancha preta dos citros em pomar de laranjeira "Natal". **Fitopatologia**

Brasileira, v.26, p.409, 2001. Suplemento. /Apresentado ao 34.Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, 2001 – Resumo/.

STENSVAND, A.; AMUNSDEN, T.; SEMB, L.; GADOURY, D.M.; SEEM, R.C.
Discharge and dissemination of ascospores by *Venturia inaequalis*. **Plant Disease**, v.82, p.761-764, 1998.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. **Serology and immunochemistry of plant viruses**.
New York: Academic Press, 1982. 302p.

ZERBINI, F.M.; AMBROZEVIĆIUS, L.P.; NAGATA, A.K.I. Diagnose molecular de fitoviroses. In: ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja; Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001. cap 5, p.95-120.