CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE
ESPÉCIES DE *Elsinoe* EM CITROS (*Citrus* spp)

GISELE MARIA FANTIN

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

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

PÍRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1988

F216c

Fantin, Gisèle Maria

Caracterização morfológica, fisiológica e
patogênica de espécies de Elsinoe em citros
(Citrus spp.) Piracicaba, 1988.
90p. illus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fruta cítrica - Doença 2. Fungo fito-
patogênico - Caracterização 3. Verrugose
em fruta cítrica I. Escola Superior de Agri-
cultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.3

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E PATOGENICA DE ESPÉ-
CIES DE *Elsinoe* EM CITROS (*Citrus* spp.)

GISÈLE MARIA FANTIN

Aprovada em: 14.03.1989.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

ESALQ/USP

Prof. Dr. Tasso Leo Krüger

ESALQ/USP

Prof. Dr. Chukichi Kurosawa

FCA/UNESP

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Aos meus pais
e irmãos,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus agradecimentos:

- Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati pela valiosa orientação e principalmente pelo interesse, incentivo e amizade, colaborando de forma decisiva para minha formação científica.
- Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" que possibilitou a participação no Curso de Pós-Graduação e a realização do presente trabalho.
- Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ pelos ensinamentos e amizade.
- Aos amigos Dr^a Raquel Ghini, Dr. Wagner Bettiol, M.S. Regina Eli de Almeida Pereira, M.S. Izabel Cristina Takitane, Dr. Ricardo Shirota, Eng^o Agr^o Oswaldo Lombardi Filho, Eng^o Agr^o Luiz Fernando M. de Oliveira, M.S. Antonio Carlos Maringoni e M.S. João Tavares Bueno, pela obtenção de material doente de diversas localidades e pela convivência e amizade.
- A Maria Aparecida Pessoa da Cruz Centurion, Margarete Camargo e Lillian Bacchi pelo indispensável auxílio e pela convivência e amizade.
- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, em especial ao Sr. Pedro da Silva pelo valioso auxílio prestado durante a execução dos experimentos.
- Ao Dr. Joaquim Teófilo Sobrinho pela concessão das mudas de plantas utilizadas neste trabalho.

- Ao Centro de Informática na Agricultura e em especial ao M.S. Gabriel Adrian Sarries pelo auxílio nas análises estatísticas dos experimentos.
- Ao Dr. Haroldo Alberti, Chefe do Laboratório Regional de Presidente Prudente do Instituto Biológico pela compreensão e apoio durante a execução dos experimentos.
- Ao Dr. Benedito de Camargo Barros, Chefe da Seção de Doenças das Plantas Alimentícias Básicas e Olerícolas do Instituto Biológico pelo apoio, incentivo e amizade.
- Ao Dr. Eduardo Feichtenberger pela colaboração na revisão bibliográfica.
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e demais colegas pela amizade e estímulo.
- À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.
- A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
SUMMARY.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Identificação das Espécies do Patógeno.....	5
2.2. Metodologias de Isolamento, Esporulação e Inoculação.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Isolamento.....	37
3.2. Preservação do Fungo.....	38
3.3. Metodologia para Esporulação.....	38
3.3.1. Comparação de períodos de crescimento em BDA.....	39
3.3.2. Comparação de períodos de crescimento em solução de Fries.....	40
3.3.3. Comparação de tamanhos de discos de micélio.....	41
3.3.3.1. 8 tamanhos de discos de micélio de isolados de <i>E.australis</i> e <i>E. fawcetti</i>	41

3.3.3.2. 3 tamanhos de disco de micé- lio de isolados de <i>E. australis</i> .	41
3.3.3.3. 3 tamanhos de disco de micé- lio de isolados de <i>E. fauceetti</i> .	42
3.3.4. Comparação de substratos líquidos para a produção de conídios.....	42
3.4. Caracterização Morfológica.....	43
3.4.1. Coloração da colônia.....	43
3.4.2. Dimensionamento microscópico dos coní- dios.....	43
3.5. Caracterização Fisiológica.....	44
3.5.1. Crescimento a 32°C.....	44
3.5.2. Esporulação.....	44
3.6. Caracterização Patogênica.....	45
3.6.1. Obtenção do inóculo.....	46
3.6.2. Inoculação.....	47
4. RESULTADOS.....	48
4.1. Metodologia para Esporulação.....	48
4.1.1. Comparação de períodos de crescimento em BDA.....	48
4.1.2. Comparação de períodos de crescimento em solução de Fries.....	48
4.1.3. Comparação de tamanhos de disco de mi- cêlio.....	50

4.1.3.1. Comparação de 8 tamanhos de disco de micélio.....	50
4.1.3.2. Comparação de 3 tamanhos de disco de micélio de isolados de <i>E. australis</i>	50
4.1.3.3. Comparação de 3 tamanhos de disco de micélio de isolados de <i>E. fawcetti</i>	53
4.1.4. Comparação de substratos para produção de conídios.....	53
4.2. Caracterização Morfológica.....	53
4.2.1. Coloração da colônia.....	53
4.2.2. Dimensionamento microscópico dos conídios.....	57
4.3. Caracterização Fisiológica.....	60
4.3.1. Crescimento a 32°C.....	60
4.3.2. Esporulação.....	60
4.4. Caracterização Patogênica.....	66
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ESPÉCIES DE *Elsinoe* EM CITROS (*Citrus* spp)

Autora: Gisèle Maria Fantin

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Espécies de *Elsinoe* causando verrugose em frutas e folhas de plantas cítricas foram isoladas a partir de amostras provenientes de várias localidades dos Estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Goiás. *Elsinoe australis* foi obtido de frutas de laranja, tangerina, lima ácida e tangor Murcote, enquanto *E. fawcetti* foi encontrado apenas em folhas e frutas de limão.

Métodos para isolamento e esporulação *in vitro* foram aperfeiçoados para estas espécies. A esporulação de *E. australis* só foi conseguida pela modificação do método convencional para *E. fawcetti*: substituindo substrato água por suspensão de fubã. Essa modificação melhorou também a esporulação de *E. fawcetti*.

Elsinoe australis foi morfológicamente distinto de *E. fawcetti* pela cor preta de suas colônias cultivadas na ausência de luz e pelas dimensões dos conídios que apresentaram maior relação comprimento/largura.

Verificou-se a temperatura de 32°C, próxima à indicada como diferenciadora das espécies, maior crescimento das colônias de *E. australis*.

Os testes de patogenicidade, realizados através de inoculação em folhas destacadas, evidenciaram a distinção das espécies: *E. fawcetti* causou lesões típicas da doença sobre limão Cravo, Rugoso e Siciliano, ao passo que *E. australis* não causou sintomas sobre estas variedades.

MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION
OF *Elsinoe* SPECIES ON CITRUS (*Citrus* spp)

Author: Gisèle Maria Fantin

Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

Species of *Elsinoe* causing scab on citrus fruits and leaves were isolated from samples proceeding from some localities in the State of São Paulo, Paraná, Minas Gerais and Goiás. *Elsinoe australis* was obtained from orange, tangerine, acid lime and Murcott, while *E. fawcetti* was observed only on leaves and fruits of lemon.

The methods for isolation and sporulation *in vitro* were improved for these two species. Sporulation of *E. australis* was only obtained by modifying the conventional method for *E. fawcetti*: using corn meal suspension instead of water. This modification improved also the sporulation of *E. fawcetti*.

Elsinoe australis was morphologically distinct from *E. fawcetti* by the black color of its colonies grown in the absence of light and conidium dimensions that had a larger length/width rate.

At the temperature of 32°C which is close to that indicated to separate these two species, it was observed a higher growth of colonies of *E. australis*.

The pathogenicity tests performed through inoculation of detached leaves, showed the distinction between species: *E. fawcetti* produced typical disease lesions on Rangpur lime, Rough and "Siciliano" lemons, while, *Elsinoe australis* did not cause symptoms on these varieties.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira constitui um importante campo de exploração agrícola, essencialmente no Estado de São Paulo, que é responsável por 80% da produção nacional de citros, e ocupa um lugar de destaque no contexto mundial.

A produção nacional de laranjas, que representa a quase totalidade da produção de frutas cítricas, vem crescendo ano a ano e na safra 1986/87 foi ao redor de 10 milhões de toneladas, das quais a indústria absorve a maior parte para a produção de suco, que é praticamente todo exportado (AMARO, 1987). Com relação à fruta "in natura", 1.500 mil toneladas são utilizadas para consumo interno, mas a exportação tem se mantido estagnada durante os últimos anos e foi de 87.000 toneladas em 1986 (TAVARES, 1987).

Apesar da boa aceitação do suco de laranja nos mercados internacionais, a fruta fresca de origem brasileira, entretanto, não é considerada de boa qualidade para o consumo. A exportação de frutas cítricas é feita principalmente para os países baixos. Não há exportação para o mercado japonês principalmente pela sua exigência fitossanitária

para a entrada destes produtos. Estas restrições também são feitas pelos EUA às frutas oriundas do Brasil (TAVARES, 1987).

Muitos fatores concorrem para a redução na qualidade das frutas e também na produtividade da cultura. Há limitações de ordem climática e agrônômica e dentre elas um grande número de doenças.

Uma das doenças que tem causado preocupação desde a década de 1930 é a verrugose, cujo aparecimento sobre laranjas no Estado de São Paulo foi identificado inicialmente em Limeira e a partir de então estudado seu controle (WRIGHT & MOREIRA, 1934; MOREIRA, 1980; FEICHTENBERGER et alii, 1986).

A verrugose é atualmente uma doença amplamente disseminada em todas as regiões citrícolas do país. Sua importância é grande para as frutas que se destinam ao consumo "in natura", pois torna-as impróprias para o mercado externo e deprecia grandemente sua comercialização interna pelo mau aspecto da casca (FEICHTENBERGER et alii, 1986). Pode também provocar a queda de frutinhos novos quando ocorrerem danos extensivos (BRUN, 1971).

Além disso, esta doença é responsável pela maior parte das pulverizações com fungicidas nesta cultura (FEICHTENBERGER et alii, 1986).

Ultimamente vem ocasionando maiores prejuízos

pois contribui fundamentalmente para o aumento da incidência de outra doença, a leprose, que é uma virose transmitida por um ácaro que se protege nas lesões salientes e corticosas da casca das frutas, causadas pela verrugose (CHIAVEGATO, 1987; ZANIN, 1988).

Muitos estudos foram feitos sobre a verrugose e seu agente causal no Brasil, mas apenas na época do seu aparecimento (BITANCOURT, 1934, 1935; BITANCOURT & JENKINS, 1936 a,b, 1937 a,b, 1939; JENKINS, 1933 e JENKINS & BITANCOURT, 1939). Estes foram direcionados principalmente à taxonomia do fungo, tendo sido identificados através da descoberta da fase teleomórfica, duas espécies: *Elsinoe australis* em laranja doce e *E. fawcetti* em laranja azeda (BITANCOURT & JENKINS, 1936 a,b).

Recentemente, WHITESIDE (1975, 1978) encontrou na Flórida apenas uma espécie do fungo: *E. fawcetti*, a qual apresentou dois biótipos, sendo um deles capaz de infectar laranjas doces. Discutiu, então, a possibilidade da existência deste biótipo no Brasil ao mesmo tempo que criou margem a dúvidas sobre a taxonomia de *E. australis*. Surgiu portanto, a necessidade de esclarecer as questões apontadas.

Este trabalho tem por objetivo diferenciar *E. australis* de *E. fawcetti*. Os métodos de isolamento, crescimento, esporulação e inoculação *in vitro* são aperfeiçoados

para possibilitar a distinção das espécies através de suas características morfológicas, fisiológicas e patogênicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Identificação das Espécies do Patógeno

Têm-se estabelecido, segundo estudos conduzidos em sua maioria na década de 1930, que as plantas cítricas estão sujeitas a dois tipos de verrugose com características sintomatológicas semelhantes: a verrugose da laranja azeda, causada por *Elsinoe fawcetti* Bitancourt e Jenkins cuja forma imperfeita corresponde a *Sphaceloma fawcetti* Jenkins e a verrugose da laranja doce causada por *Elsinoe australis* Bitancourt e Jenkins que no estágio conidial corresponde a *Sphaceloma australis* Bitancourt e Jenkins (BITANCOURT & JENKINS, 1937; BRUN, 1971; SIVANESAN & CRITCHETT, 1974a,b; KIMATI & GALLI, 1980; ROSSETTI, 1980; SIVANESAN, 1984 e FEICHTENBERGER et alii, 1986).

Elsinoe fawcetti afeta folhas, ramos, frutas (SIVANESAN & CRITCHETT, 1974b) e botões florais (KIMATI, 1980) de um pequeno número de gêneros e espécies dentro das rutáceas (WINSTON et alii, 1925). Possui distribuição mundial generalizada em áreas de condições climáticas propícias. O grau e ordem de suscetibilidade dentro desse grupo variam de acordo com fatores varietais, climáticos ou geo-

gráficos (PELTIER & FREDERICH, 1923, 1924 e BRUN, 1971). Plantas mais frequentemente relatadas como suscetíveis incluem laranja azeda, limões Rugoso, Siciliano, Doce e Cravo, pomelo, algumas variedades de mandarim, tangerinas King, Satsuma e Cravo, *Poncirus trifoliata*, calamondim (*Citrus mitis*) e "Pointed Leaf papeda" (*C. hystrix*). Kumquats (*Fortunella* spp) e a maioria das variedades de laranja doce e Lima são geralmente mais resistentes, embora exemplos de infecção nestes hospedeiros sejam conhecidos (BITANCOURT & JENKINS, 1937a; JOTANI, 1957 e BRUN, 1971).

As lesões foliares são anfígenas, inicialmente pontos semi-translúcidos, tornando-se papiladas, creme a amarelo pálido ou de cores variadas, maiores que 3 mm de diâmetro. As lesões são irregularmente discóides a subglobosas, confluentes, principalmente ao longo das nervuras principais, cor de mel ou canela, papiladas, verrugosas, profundamente fendidas e rachadas quando velhas, maiores que 1 mm de diâmetro. Frutas e brotos jovens podem desenvolver sintomas semelhantes. Tecidos infectados podem mostrar distorção e pode ocorrer abscisão de frutas doentes, folhas e partes de folhas (WINSTON, 1923 e SIVANESAN & CRITCHETT, 1974b).

A fase perfeita é muito raramente encontrada; os ascomas são pulvinados, circulares a elípticos, de cor marrom escura, com mais de 120 µm de largura (espessura),

composto de tecido pseudoparenquimatoso contendo vários lóculos com ascos. Os ascos são subglobosos a elípticos, com parede espessada no topo, medindo 12 a 16 μm e contendo 8 ascosporos. Os ascosporos são hialinos, oblongo elípticos, com 1 a 3 septos, usualmente constrictos no septo central, com 10 - 12 x 5 - 6 μm .

O acêrvulo é epidérmico a subepidérmico, separado ou confluyente, composto de pseudoparênquima hialino a marrom pálido. As células conidiogênicas são formadas diretamente das células superiores do pseudoparênquima ou de conidióforos contínuos ou com até 2 septos, monofialídicos a polifialídicos, terminais, integrados, hialinos a marrom pálido medindo 12 - 22 x 3 - 4 μm . Os conídios são hialinos, unicelulares, elipsoidais de 5 - 10 x 2 - 5 μm (SIVANESAN & CRITCHETT, 1974b e SIVANESAN, 1984). BITANCOURT & JENKINS (1936b) citam também a presença de conídios coloridos em forma de fuso, de cor amarelo pálido a castanho avermelhado, com parede externa endurecida medindo aproximadamente 4 x 10 μm , podendo atingir 16 μm de comprimento. São da mesma forma encontrados na Flórida (JENKINS, 1931 e WHITESIDE, 1975).

Em alguns hospedeiros, o fungo é classificado como *Sphaceloma fawcetti* var. *scabiosa*, identificado inicialmente na Austrália (JENKINS, 1936), mas possivelmente endêmico no sudoeste do Pacífico, sudeste da Ásia, África e

provalmente Nova Zelândia (BUGNICOURT & MARTY, 1961; BRUN, 1971). Importante principalmente em limões (OXENHAM, 1961 e BRUN, 1971) particularmente como doença séria de porta enxertos de limão Rugoso em viveiros chegando a provocar queda de frutas jovens (Mc. CLEERY, 1930). JENKINS et alii (1953) comparando lesões da verrugose comum da Argentina com material australiano as consideraram idênticas mas um levantamento posterior não deu nenhuma evidência de sua presença na Argentina. Diferentemente da verrugose comum causada por *E. fawcetti*, este não é aparentemente um patógeno frequente ou sério em laranja azeda (Mc. CLEERY, 1930 e BRUN, 1971). ROSSETTI (1980) faz referência ao patógeno sobre tangerina.

Os sintomas gerais são semelhantes aos da verrugose comum causada por *E. fawcetti* mas as duas doenças diferem na forma e aparência das lesões individuais, maiores que 1 a 1,25 mm de diâmetro: a verrugose causada por *S. fawcetti* var. *scabiosa* é tipicamente discóide, lisa, rasa ou crateriforme dando um aspecto de manchas circulares, marrons, elevadas, distintas, maiores de 2 mm de diâmetro, e não regularmente pulvinadas a subglobosas, ou muito irregularmente papiladas (Verrugosas) e profundamente fissuradas como na verrugose comum. Os conídios são mais longos, medindo 8 - 16 x 2 - 6 μ m, podendo apresentar um septo e os conidióforos, mais escuros e robustos, são mais facilmente vistos (JENKINS, 1936 e SIVANESAN & CRITCHETT, 1974a).

COBB (1895), na Austrália, dimensionou os conídios de uma verrugose cinzenta em limão como 3 a 4 μ m de largura por 4 a 7 μ m de comprimento e concorda com JENKINS (1936) que seja aparentemente causada por *Sphaceloma fawcetti* var. *scabiosa*.

A segunda espécie, *Elsinoe australis*, causa sintomas principalmente em frutas, e é menos frequente ou ausente em folhas e brotos, chegando a causar deformação nos frutos jovens. Está confinada à América do Sul nos países: Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. Incide especialmente sobre frutos de laranja doce e também tangerinas, tangerona, Kumquat (*Fortunella margarita*), lima da Pérsia, limão Seda, pomelo e "Pointed Leaf papeda" (*Citrus hystrix*) (JENKINS & BITANCOURT, 1937 e 1939; BRUN, 1971). Citado como possível sobre laranja azeda no Paraguai por FAWCETTI & BITANCOURT (1940) e em um levantamento feito no Brasil foi descrito como o presente também em limão, laranja azeda e lima ácida (LIST of intercepted plant pests, 1955).

As lesões são solitárias ou confluentes; nos frutos são circulares e irregulares, salientes, corticosas na textura e aparência, maiores que 4 mm de diâmetro; quando foliares inicialmente formam cavidades em forma de funil, posteriormente semelhantes a verrugas, lisas, brilhantes, maiores que 2 mm de diâmetro, anfigenas, especialmente ao longo das nervuras principais. As lesões dos brotos lembram

as das folhas.

Os ascomas, raramente encontrados, são globosos, separados ou agregados, pseudoparenquimatosos, epidérmicos a subepidérmicos, maiores de 150 μm de diâmetro. Os ascos ficam na parte superior do ascoma, são elípticos a subglobosos, medindo 15 - 30 x 12 - 20 μm . com 8 ascosporos hialinos, retos ou curvos, com 1 a 3 septos, levemente constritos no septo, e a célula mediana superior pode tornar-se longitudinalmente septada medindo 12 - 20 x 4 - 9 μm . O acêrvulo é semelhante na aparência aos ascomas. As células conidiogênicas são formadas diretamente das células superiores do pseudoparênquima ou de conidióforos com 0 a 3 septos, hialinos a marrom pálido, monofialídicos a polifialídicos, terminais, integrados, determinados, medindo 6 - 18 x 4 - 5 μm . Os conídios são hialinos não septados medindo 4 a 6 x 2 - 4 μm (SIVANESAN & CRITCHETT, 1974a e SIVANESAN, 1984). Não são comuns, e geralmente ausentes sobre as lesões (BITANCOURT & JENKINS, 1937a).

Ambos fungos agentes causais afetam apenas tecidos novos: folhas com mais de 1,5 cm de largura (KIMATI & GALLI, 1980) ou que tenham atingido um quarto da sua extensão final (KUCHAREK & WHITESIDE) são praticamente imunes e os frutos com 3 a 4 cm de diâmetro (BITANCOURT, 1934) ou 10 a 12 semanas após a queda das pétalas (WHITESIDE, 1975) tornam-se imunes, sendo que as lesões serão maiores e mais

salientes quanto mais nova for a fruta quando da infecção (KIMATI & GALLI, 1980).

A importância da verrugose da laranja azeda é relativa por afetar plantas cítricas de interesse econômico secundário e nas nossas condições exige cuidados nos viveiros onde se produzem porta-enxertos suscetíveis enquanto que a verrugose da laranja doce no nosso país é considerada como a principal doença do fruto em desenvolvimento (KIMATI & GALLI, 1980).

WHITESIDE (1978), na Flórida, após resultados de testes de patogenicidade, questiona a existência e importância das duas espécies. Este autor utilizou para inoculação 24 diferentes isolados, todos aparentemente de *Elsinoe fawcettii* e, surpreendentemente, apenas 12 deles se mostraram patogênicos à laranja azeda. Foi assumido previamente que *E. fawcettii* era consistentemente patogênico à laranja azeda (JENKINS, 1931 e BITANCOURT & JENKINS, 1936b) e por isso o nome comum dado à doença que este patógeno causava era verrugose da laranja azeda, mas WHITESIDE (1978) em seus estudos de patogenicidade obteve que pelo menos dois biótipos estão presentes na Flórida. Enquanto ambos os biótipos foram patogênicos a pomelo, limão Rugoso e tangor Murcote, apenas um deles foi patogênico a laranja azeda e tangerina "Temple". O último biótipo foi consistentemente patogênico a frutas de laranja doce (Valência) mas nunca causou verru-

gose nas folhas de laranja doce. Os sintomas produzidos sobre frutas de laranja doce na Flórida foram semelhantes àqueles produzidos por *E. australis* na América do Sul. Os trabalhos da Flórida sugerem a possibilidade da espécie capaz de causar verrugose sobre laranja doce na América do Sul ser semelhante à encontrada na Flórida.

Hã, em contraposição, o fato de que verrugose em laranja doce na América do Sul é um dos principais problemas nesta cultura (KIMATI & GALLI, 1980 e FEICHTENBERGER et alii, 1986); na Flórida, entretanto, onde apenas *Elsinoe fawcetti* tem sido relatado, verrugose sō ocasionalmente aparece sobre frutas de laranja doce, apesar da ocorrência comum do biótipo de *E. fawcetti* capaz de infectar laranjas doces (WHITESIDE, 1978, 1984). Paralelamente hã a observação de algumas ocasiões, na Flórida, em que a verrugose incidiu com gravidade sobre laranjeiras doces próximas a plantas muito suscetíveis, que serviram como fonte de inóculo e em condições ambientes de abundante chuva apōs a queda das pétalas (WHITESIDE, 1978, 1984). JENKINS (1933) e BITANCOURT & JENKINS (1936b, 1937a, 1939) em seus trabalhos no Brasil, não fazem referência a condições climáticas ou proximidade a plantas de copas suscetíveis.

Estudando as causas da rara ocorrência de verrugose em pomares de laranja doce na Flórida, WHITESIDE (1988) testou a viabilidade do fungo em lesões que perma-

neciam no pomar de um ano para outro e poderiam constituir-se no inóculo inicial da doença. Observou a existência de lesões apenas em frutas, que são normalmente colhidas antes da florada da primavera seguinte e, mesmo que permanecessem na árvore, os propágulos de suas pústulas perdiam a viabilidade ou pelo menos a capacidade de produção de conídios após aproximadamente 9 meses. O autor, portanto, concluiu que estes fatores devem ser os responsáveis pela interrupção do ciclo de vida do patógeno de um ano para outro. Acrescentou ainda que apesar de acreditar que mais estudos sejam necessários para estabelecer se existe a espécie *E. australis*, mas assumindo que seja diferente de *E. fawcetti*, *E. australis* apresentaria pouco perigo adicional na Flórida pela pobre habilidade de infectar folhas, a não ser que sobreviva por mais tempo nas pústulas da casca das frutas, e mesmo assim seria uma ameaça somente para as variedades de maturação tardia pois na Flórida apenas estas geralmente carregam frutas maduras até depois da florada da primavera seguinte.

Outro ponto favorável à dúvida é relativo aos extraordinariamente severos ataques de verrugose em pomares de laranjas nas regiões de Indian River e Immokalee (WHITE SIDE, 1984). As epidemias na região do Indian River ocorreram de 1966 a 1968 e foram investigadas, na época, por Mortimer Cohen (Centro de Pesquisas da Agricultura, Fort Pierce - Universidade da Flórida), o qual, em vista da pos-

sibilidade desta epidemia atípica ter sido causada por *E. australis*, submeteu uma amostra do material doente à identificação por A.E. Jenkins e A.A. Bitancourt, que foram as primeiras autoridades a distinguir este fungo de *E. fawcetti*. Baseados numa similaridade de sintomas àqueles causados por *E. australis* na América do Sul, estas autoridades tentativamente identificaram a amostra do Indian River como verrugose da laranja doce (National Fungus Collection, Betsville [BPI 91698]). A epidemia de Imokalee ocorreu em 1968 e foi investigada por L.C. Knor, o qual concluiu ser *E. fawcetti* o agente causal da doença (WHITESIDE, 1984).

Existe, portanto, a questão proposta por WHITESIDE (1984), se o patógeno *Elsinoe* que infecta laranjas doces na Flórida é diferente daquele que causa verrugose nas laranjas doces da América do Sul, e mesmo que *E. australis* seja considerado diferente de *E. fawcetti*, ainda permanece a questão se toda verrugose sobre laranja doce na América do Sul é devida a *E. australis*. WHITESIDE (1978) propõe ainda que se volte a referir à doença como verrugose dos citros, por julgar duvidoso referir-se à doença como verrugose da laranja azeda.

Várias características foram descritas na literatura para diferenciar as duas espécies.

A morfologia das pústulas foi utilizada por BITANCOURT & JENKINS (1937a): pústulas causadas por *Elsinoe*

australis são descritas como frequentemente mais circulares, rasas e menos enrugadas que as causadas por *E. fawcetti*, que são mais protuberantes. WHITESIDE (1984), entretanto, discute o fato de que a aparência macroscópica das pústulas de verrugose pode variar consideravelmente, particularmente em relação ao estágio de desenvolvimento da fruta quando esta é infectada e à cultivar atacada: maior hiperplasia resulta de infecção que ocorre logo após a queda das pétalas que de infecção que ocorre mais tarde, durante o período de 3 meses de suscetibilidade da casca da fruta. Também maior hiperplasia ocorre sobre frutas de limão e tangerina "Temple" que sobre pomelo, Murcote ou laranja doce.

BITANCOURT (1934) por sua vez, cita que a aparência das lesões pode ser influenciada em parte pelas características epidemiológicas de cada espécie fúngica. Na verrugose da laranja doce a infecção se processa em duas etapas: as infecções primárias são produzidas nas frutas muito novas por esporos provenientes de raros focos existentes no pomar, nas lesões de frutas temporãs ou deixadas da safra anterior, ou ainda de pequenas lesões em folhas do interior, mais úmido e sombreado, da copa das árvores. Estas lesões são portanto pouco numerosas, porém grandes e salientes devido à hipertrofia dos tecidos subjacentes. A partir destes focos, enorme quantidade de conídios é produzida, originando o grande número de lesões secundárias, menores e mais rasas

pela maior resistência das frutas mais desenvolvidas. No caso da verrugose da laranja azeda, há importantes lesões nos galhos verdes e folhas que proporcionam um potencial de inóculo primário muito alto e conseqüentemente grande número de lesões salientes e hipertrofia de tecidos da planta. Além disto, BITANCOURT & JENKINS (1937a) citam que o arranjameto concêntrico das frutificações no caso da verrugose da laranja azeda é menos evidente que nas da verrugose da laranja doce.

O mais notável sinal da verrugose da laranja azeda é com certeza o desenvolvimento do fungo semelhante a *Cladosporium* na superfície de lesões relativamente jovens e este tipo de crescimento não é observado para o fungo agente causal da verrugose da laranja doce. Este crescimento é ocasionado pela produção de conídios coloridos, representando um estágio conidial mais evanescente comparado ao estágio conidial persistente de *E. australis*. Em *E. australis* os ascomas são globosos ou quase, com o pseudoparênquima bem desenvolvido e com aparente ausência de um epitécio em contraste com os ascomas mais escassos e achatados de *E. fawcetti*. Os ascósporos são também maiores e mais variáveis que aqueles observados para *E. fawcetti*. BITANCOURT & JENKINS (1936b) consideram que estas diferenças asseguram a separação das espécies.

WHITESIDE (1984) questiona se o biótipo de

E. fawcetti, capaz de infectar laranjas doces na Flórida, é realmente distinto de *E. australis*, pois cita que BITANCOURT & JENKINS (1936b) separaram as duas espécies com base na dimensão dos ascosporos e que na prática, entretanto, seria quase impossível confirmar a identidade do fungo com base nesta característica, pois o estágio teleomórfico deste fungo raramente ocorre. O único relato foi feito no Brasil.

Na ausência dos ascomas, outras características podem ser utilizadas para diferenciar as espécies. Segundo WHITESIDE (1984), parece haver apenas uma que poderia ser confiável o suficiente para esta finalidade: o segundo tipo de conídio. Enquanto os conídios hialinos de *E. australis* e *E. fawcetti* são muito semelhantes, *E. fawcetti* tem uma característica no seu estado anamórfico que aparentemente é peculiar a esta espécie: a produção de conídios coloridos em forma de fuso. Estes conídios foram observados em todos os isolados usados em testes de patogenicidade por WHITESIDE (1975, 1978), mas nem sempre estão presentes sobre as lesões e aparentemente são formados apenas quando o estroma das lesões é submetido a certas mudanças não bem definidas nas condições ambientes.

WHITESIDE (1984) compara também a patogenicidade sobre folhas, e cita que *E. australis* tem sido considerado ter pobre habilidade de infecção em folhas, particularmente sobre as de laranja doce. Entretanto, folhas de laran-

ja doce não foram infectadas nem pelo biótipo de *E. fawcetti* capaz de infectar laranjas doces presentes na Flórida.

E. australis foi relatado ser não patogênico sobre laranja azeda por BITANCOURT & JENKINS (1937a), mas um dos biótipos de *E. fawcetti* identificados na Flórida também se comportou dessa forma (WHITESIDE, 1984). Um isolado de *E. fawcetti* não patogênico à laranja azeda foi também relatado em Trinidad (BAKER, 1938).

WHITESIDE (1984) julga parecer impossível responder com certeza a questão se o patógeno *Elsinoe* na Flórida é diferente daquele que causa verrugose sobre laranja doce na América do Sul, pois considera haver insuficiente especificidade entre os dois fungos descritos, *E. australis* e *E. fawcetti*, para confiar no hospedeiro atacado para identificação do patógeno.

ZEIGLER & LOZANO (1983) relatam que, por causa da insuficiência de características morfológicas adequadas para distinguir membros do complexo *Sphaceloma - Elsinoe*, muitos autores tem se baseado em outras características para justificar as distinções taxonômicas. Estas incluem características da colônia sobre meio de ágar, sintomatologia, afinidade filogenética entre hospedeiros e, em uma limitada extensão, gama de hospedeiros. Usualmente, estudos de inoculação cruzada são baseados em testes feitos sobre alguns genótipos, tornando a significância geral da não patogenicida-

de sobre espécies ou gêneros de plantas como um todo difícil de avaliar. Estes autores, trabalhando com espécies de *Elsinoe* e *Sphaceloma* patogênicas sobre mandioca e outras euforbiáceas, consideram que a sintomatologia e patogenicidade são reflexos da interação patógeno-hospedeiro e não são portanto caracteres apropriados para distinguir patógenos taxonomicamente. Relatam que sintomas sobre diferentes hospedeiros tendem a diferir, restringindo a utilidade deste caráter. Acreditam que embora sejam citados na literatura vários relatos da especificidade de hospedeiros, aparentemente nunca foi testada a estabilidade desta por meio de passagens do patógeno através de hospedeiros relacionados. Estes autores obtiveram resultados mostrando que a especificidade de alguns patógenos pode ser muito plástica: um isolado de *Elsinoe brasiliensis* obtido de *Euphorbia brasiliensis*, a cada reisolamento de mandioca, aumentou significativamente sua patogenicidade sobre a mesma, mas diminuiu gradativamente sobre o hospedeiro original de *Euphorbia brasiliensis*. Comparações semelhantes quando feitas com hospedeiros não relacionados não provocaram alteração na virulência do patógeno. Este trabalho pode sugerir uma explicação para um fato ocorrido na citricultura paulista: de 1920 a 1940, a laranja azeda predominou como porta-enxerto, e outros cavalos como: limão Cravo, laranja Caipira e limão Rugoso eram utilizados em menor escala. Foi nesta época que BITANCOURT & JENKINS (1936a) estudaram e identificaram *E. fawcetti* causando ver-

rugose em citros e encontraram a laranja azeda como a espécie mais suscetível a este patógeno. Com a introdução do vírus da tristeza em 1937, as plantas enxertadas sobre laranja azeda foram eliminadas, de forma que, na década de 1940, os outros porta-enxertos e também tangerina Cleópatra foram utilizados para a formação de novos pomares. O limão Cravo se destacou a partir de 1950, até que na década de 1980 chegou a representar 95% dos porta-enxertos (TEÓFILO Sobrinho & FIGUEIREDO, 1984). Atualmente, esta espécie tem sido uma das mais suscetíveis à verrugose em viveiros.

Na Flórida, onde foram encontrados por WHITESIDE (1978) dois biótipos de *E. fawcetti* e apenas um capaz de infectar laranja azeda, TEÓFILO Sobrinho & FIGUEIREDO (1984) citam o uso mais diversificado de porta-enxertos: citrange Carrizo e Troyer (40%), laranja azeda (30%), tangerina Cleópatra (20%) e outros (10%).

Stevens (1920) citado por WINSTON (1923) já naquela época, acreditava que existia uma adaptação do fungo às variedades cítricas pela difundida impressão que por muitos anos esta doença foi confinada à laranja azeda e ao limão Rugoso e mais tarde adaptou-se ao pomelo sendo que depois iria atacar a laranja. São citadas também as hipóteses da gradual perda de imunidade dos hospedeiros e do surgimento de mutação no patógeno, embora WINSTON (1923) não tenha encontrado evidências para confirmar esta teoria. Por outro

Tado, PELTIER & FREDERICH (1924) e WINSTON et alii (1925) estudando a suscetibilidade relativa de variedades e híbridos de citros à verrugose, concluíram que as diferenças no grau de infecção sobre um hospedeiro são grandemente influenciadas pelas condições climáticas, enquanto o hospedeiro está em um estágio suscetível de crescimento, além das diferenças na suscetibilidade inerente do hospedeiro ou na virulência do patógeno.

Ora, BAKER (1938) verificou em Trinidad, que mesmo sendo a laranja azeda e o limão Rugoso muito suscetíveis a *Elsinoe fawcetti*, o pomelo era considerado imune ou altamente resistente. Posteriormente, a verrugose sobre pomelo em Porto Rico e Flórida passou a ser considerada uma das mais sérias doenças da cultura. O autor sugeriu que esta perda de imunidade tivesse sido causada por uma mutação oriunda da verrugose de laranja azeda. Inoculações de laboratório e campo tiveram resultados consistentes: isolados obtidos de laranja azeda e pomelo atacaram apenas seus respectivos hospedeiros e observações de campo rejeitaram a teoria que a doença pudesse ter sido causada por condições climáticas anormais.

Em nossas condições, JENKINS (1933) relatou pela primeira vez a ocorrência de verrugose sobre laranja Baía no Estado de São Paulo, enquanto era ausente em outros estados como Minas Gerais e Bahia, embora, segundo Bondar

(1929) citado por JENKINS (1933) fosse comum uma verrugose sobre outras espécies, sendo as mais atacadas laranja azeda, Seleta, laranja da China (*Citrus sinensis*), limão e pomelo. Foi suposto que o agente da verrugose da laranja doce na Bahia fosse uma forma que ainda não tivesse atacado a laranja Baía.

BITANCOURT (1935) cita como suscetíveis a *E. fawcetti* e também a *E. australis*, tangerina Cravo e tangerinas em geral e, na Argentina, a laranja azeda, mas BITANCOURT & JENKINS (1937a), em testes de inoculação cruzada, obtiveram que cada patógeno causou sintomas típicos nos seus hospedeiros congeniais e nenhuma infecção resultou de inoculações em laranja doce com *E. fawcetti* ou em laranja azeda com *E. australis*.

Estes resultados contrastantes sugerem a necessidade de testar a patogenicidade da atual população das duas espécies do fungo sobre as espécies cítricas de maior expressão e também sobre as diferenciadoras, como descrito na literatura por BITANCOURT & JENKINS (1937a).

BRUN (1971) também ressalta a importância de um melhor conhecimento das espécies de citros atingidas pelas espécies do patógeno, inclusive *Sphaceloma fawcetti scabiosa*, ao qual não há precisão sobre a sensibilidade da laranja azeda.

Estudos iniciados recentemente tem demonstrado grande variabilidade de reações à doença dentro de progênes e variedades de uma mesma espécie cítrica.

INQUE et alii (1985) testando plântulas de vários híbridos de citros, encontrou alta, média e baixa resistência a *E. fawcetti*. Do cruzamento de duas cultivares resistentes a progênie foi sempre resistente, e quando uma cultivar suscetível e uma resistente foram cruzadas a progênie mostrou ampla gama de resistência. Também REDDY et alii (1986) com a finalidade de identificar variedades de limão Rugoso resistentes a *E. fawcetti*, obtiveram reações que variaram desde imune a altamente suscetível. Foram consideradas imunes: "Shomyndong", "Milan", "Khattazamir", "Brazilian Rough lemon" e "Chase Rough lemon".

DEDE & VARMA (1987) na Nigéria, encontraram infecção causada por *E. fawcetti* mais severa em limão Rugoso e outras cultivares de limão, seguidas por mandarin e laranja azeda. Pomelo foi pouco infectado e laranja doce e tangelo permaneceram livres de infecção. Estes autores não especificaram a variedade do limão Rugoso.

Com respeito à morfologia do fungo, o crescimento das colônias do gênero *Elsinoe* sobre meio de cultura de BDA é lento, limitado, compacto e estromático. Após 15 dias atinge 1 cm de diâmetro e proeminência aproximada de 0,5 cm (WINSTON, 1923; WHITESIDE, 1975).

WHITESIDE (1984) considera duvidoso distinguir as duas espécies pela aparência da colônia, pela grande variação na morfologia e cor das colônias sobre meio de ágar que ocorre em *E. australis* (BITANCOURT & JENKINS, 1937a) e também em *E. fawcetti* descrito por WINSTON (1923), que utilizou vários meios de cultura nos testes.

JENKINS (1933) utilizando culturas representativas de *Sphaceloma* da Flórida e a obtida em laranja Baía (doce) no Brasil, comparou colônias em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) e também em diferentes tipos de meios com ágar. Observou que foram claramente distintas embora apresentassem uma semelhança geral: em BDA, o isolado de laranja Baía foi distinto das outras culturas pela coloração da colônia que tornou-se preta com a idade na parte central enquanto os outros isolados permaneceram com coloração clara.

Em outra comparação, BITANCOURT & JENKINS (1937a) verificaram que isolados de *E. australis* e *E. fawcetti* foram novamente separados quando cultivados a temperatura ambiente mas semelhantes quando cultivados em refrigerador.

E. australis apresenta grande variação cultural pela formação de setores nas colônias. Estas saltações originam sua classificação em vários grupos, com diferentes colorações (preta, cinzenta, vermelha, branca), diferentes formas (convoluta e pulvinadas) e diferentes texturas

(aveludado, viscosa ou não). O grupo preto é o mais frequentemente encontrado em São Paulo (BITANCOURT & JENKINS, 1937b).

As culturas de *E. fawcetti* sobre um mesmo meio de cultura foram notadamente uniformes na aparência conforme observado por BITANCOURT & JENKINS (1937a) e apresentaram uma cor clara, viva e geralmente em tom de vinho a vinho-rosado. Em correspondência, as culturas de *E. australis* foram, em geral, quase todas pretas e as regiões de cor clara apresentaram geralmente cor canela amarelada a areia e em um isolado foi vinho-rosado. Portanto, BITANCOURT & JENKINS (1937a) concluíram que comparações culturais paralelas tem mostrado que *E. australis* pode ser distinto culturalmente de *E. fawcetti*.

Culturas de *E. fawcetti* e *E. australis* foram mantidas por um mês nas seguintes temperaturas: 3,5°C; 9,5°C; 15°C; 20°C; 24,5°C; 29°C; 32,5°C e 37°C. Não houve nenhum crescimento a 3,5°C e 37°C. A melhor faixa de temperatura para *E. fawcetti* foi de 20 a 24,5°C, com temperatura ótima provavelmente sendo perto de 21°C. Para *E. australis* o crescimento máximo se deu entre 24,5 e 29°C com o ótimo ao redor de 26°C. Houve portanto uma diferença de aproximadamente 5°C entre as temperaturas ótimas das duas espécies. A 32,5°C, os dois fungos foram facilmente separáveis pelo fato de que a primeira espécie produziu crescimento insignificante e a última bom crescimento: utilizando-se um disco de micélio com

uma média de 1 mm de diâmetro, *E. fawcetti* atingiu diâmetro final de apenas 2 mm e *E. australis*, em média, 10 mm (BITANCOURT & JENKINS, 1937a).

Diferentemente, a temperatura ótima para o crescimento dos isolados de *E. fawcetti* na Flórida não se enquadrou em nenhuma das faixas de temperatura, este diminuiu abaixo de 21°C e acima de 30°C, mas não variou significativamente entre 21, 24, 27 e 30°C (Whiteside, não publicado, citado por WHITESIDE, 1984).

Saccardo (1880, 1884) citado por SUTTON (1973) separou gêneros e espécies de *Coelomycetes* por algumas simples características morfológicas junto com critérios baseados em relações parasita/hospedeiros comprovadas ou pressupostas e desde então a classificação tem permanecido praticamente estática.

Com razão, conhecimentos sobre o gênero *Elsinoe* se apoiam largamente sobre os muitos trabalhos de Jenkins e Bitancourt, e os meios de separar espécies são excessivamente refletidos em favor da especialização sobre o hospedeiro, pela rara presença da fase teleomórfica ou porquê os critérios morfológicos disponíveis são relativamente poucos e a extensão em que outras técnicas, além da microscopia ótica, tem sido usadas com algum sucesso é limitada (SUTTON, 1973, 1980).

Dentro dos critérios morfológicos, o tamanho dos conídios é um caráter importante. O comprimento destes invariavelmente flutua mais que a largura dentro das espécies. Consequentemente, a última é geralmente de mais valor para diferenciação entre taxa. A relação comprimento/largura não tem sido usada extensivamente, mas alguns gêneros, tais como *Stagonospora* e *Rhabdospora*, *Pholocospora* e *Septogloeum* e *Phoma* e *Macrophoma*, são separados basicamente por este meio. O tamanho e a forma do conídio podem ser alterados significativamente variando a natureza do meio artificial sobre o qual os isolados são cultivados (SUTTON, 1973).

Em gêneros onde há poucas características morfológicas satisfatórias disponíveis e muitos taxa especializados com ampla gama de hospedeiros, é necessário estudar o comportamento em cultura e correlacioná-lo com critérios morfológicos estabelecidos (Dennis, 1946 e Boerema, 1969, citados por SUTTON, 1973).

Aproximadamente 40 espécies de *Elsinoe* foram descritas baseadas principalmente em hospedeiros e algumas são morfolologicamente indistintas (Von Arx, 1963; Jenkins e Bitancourt, 1941, 1942 e Boedijn, 1961 citados por SIVANESAN, 1984).

ZEIGLER & LOZANO (1983) trabalhando com verugose em euforbiáceas, encontraram que dimensões de conídios produzidos sobre o mesmo meio não foram significativa-

mente diferentes entre isolados obtidos de *Euphorbia brasiliensis*, *Manihot esculenta*, *M. carthaginensis* e *Jatropha aconitifolia* var. *papaya*. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os isolados sobre *Euphorbia pulcherrima* e *Euphorbia heterophylla*, mas cada um diferiu dos outros quatro. Além disso, *Sphaceloma poinsettiae* e *S. krugii*, encontrados respectivamente sobre as duas últimas euforbiáceas, produziram esporos maiores, pigmentados e em forma de fuso, além dos conídios pequenos e hialinos. Portanto, os autores propuseram uma combinação das espécies *S. poinsettiae* e *S. krugii* serem associadas como *S. poinsettiae* e as espécies do fungo encontradas sobre os 4 primeiros hospedeiros, anteriormente com nomes distintos, serem agrupadas sob o nome *Elsinoe brasiliensis*.

Atualmente, mesmo não sendo a patogenicidade uma característica taxonômica ideal para separar espécies, ela ainda tem sido muito utilizada dentro deste gênero pela grande semelhança morfológica e variabilidade fisiológica das espécies.

EMECHEBE (1980) identificou uma espécie de *Sphaceloma* sobre caupi depois de comprovada sua não patogenicidade sobre outras leguminosas suscetíveis a verrugoses causadas por espécies já descritas.

SRIDHAR & ULLASA (1979) descreveram morfológicamente a fase perfeita de *Elsinoe arxii* mas basearam sua

identificação na patogenicidade sobre *Ocimum basilicum*.

GARDNER & HODGES (1986), descreveram a espécie *Elsinoe vaccinium* baseando-se principalmente no seu único hospedeiro *Vaccinium reticulatum*.

2.2. Metodologias de Isolamento, Esporulação e Inoculação

Quanto ao isolamento do patógeno, vários métodos foram empregados por BITANCOURT & JENKINS (1937b), mas a maior parte deles foi feita de raspagens das lesões. Estas foram colocadas em uma placa de Petri e o conteúdo de um tubo de cultura, contendo batata-dextrose-água ou glicerina-água, foi despejado sobre elas. Para alguns dos isolados de *E. australis*, seções de frutificações conidiais foram transportadas para a borda de água inclinado. O desenvolvimento do fungo pôde ser observado desde o início sob um aumento comparativamente alto em microscópio estereoscópico. Em outro método de isolamento, uma suspensão aquosa de conídios foi posta sobre uma lâmina de vidro, deixada secar e então um único conídio foi transferido para meio de cultura com uma microagulha. Esta última técnica foi também realizada com ascósporos (BITANCOURT & JENKINS, 1939) e conídios coloridos (JENKINS, 1931).

WHITESIDE (1978) considera difícil o isola-

mento do fungo das lesões por causa de seu crescimento muito lento e confinamento à porção externa da casca, coberta de erupções e pesadamente contaminada por outros organismos e o descreve detalhadamente: pústulas de verrugose foram esfregadas com álcool 95% para remover pelo menos alguns dos organismos contaminantes. Finas seções tangenciais do tecido cheio de crostas foram cortadas e depositadas em uma placa de Petri estéril. As seções foram esmagadas com uma espátula curva e os fragmentos resultantes foram dispersos em agar-água fundido, em temperatura próxima à da solidificação, que foi despejado dentro da placa. Este procedimento tinha a intenção de produzir pedaços que fossem tão pequenos que pelo menos alguns deles pudessem conter o patógeno sozinho. Depois de 3 a 4 dias a 25°C, as margens dos fragmentos foram observadas com aumento de 100 vezes para a presença do crescimento característico da hifa de *E. fawcetti*. Porções de tal crescimento foram transferidas para cultura e armazenadas em BDA. Posteriormente, WHITESIDE (1986) utilizou um meio semiseletivo para o isolamento de *E. fawcetti*, o qual continha BDA, estreptomicina, tetraciclina e dodine. Dodine foi o único material encontrado que suprimiu leveduras e *Cladosporium* spp suficientemente para permitir o uso de BDA, onde o fungo forma uma colônia característica. Alguns fungos não foram satisfatoriamente suprimidos por dodine incluindo *Colletotrichum gloeosporioides* e espécies de *Fusarium*, *Curvularia* e *Choanephora*.

Com relação à formação conidial, BITANCOURT & JENKINS (1937a) os produziram a partir de pequenas massas de culturas em BDA transplantadas para um filme de malte-
-água sobre uma lâmina, a cultura tendo sido mantida por 24 horas em uma placa de Petri forrada com papel de filtro umedecido. Numerosos conídios germinados ou colônias jovens estavam presentes nas culturas de *E. australis* após vários dias. Em culturas semelhantes sobre BDA, as células dos conídios estavam grandemente entumescidas e preenchidas com microconídios medindo 1 - 3 por 0,5 μ m.

JENKINS (1933) faz referência a formação conidial a partir de pequenas massas de cultura, aproximadamente 22 horas após transplantada para meio de farinha de milho sobre lâminas de microscópio. Estas lâminas permaneceram dentro de placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido. Comparando os isolados da Flórida com os brasileiros, obtidos de laranja doce, observou que os conídios da cultura do Brasil foram do mesmo tamanho ou apenas levemente menores que os da Flórida, mas nesta última cultura eles foram mais abundantes. Em outro teste, conídios foram produzidos em maior quantidade em ambos os conjuntos de culturas, mas na cultura da Flórida tinham já entumescido ou germinado enquanto que na do Brasil não foi observada diferenciação. Os mesmos resultados foram obtidos quando o meio de água foi substituído por água.

Portanto, JENKINS (1933) e BITANCOURT & JENKINS (1937a) apenas produziram poucos conídios sobre lâminas de microscópio com a finalidade principal de estudar a taxonomia, sem se ater ao objetivo de incrementar a produção de conídios para uso em inoculações.

WHITESIDE (1975) cita que colônias de *Elsinoe fawcetti* não esporularam sobre BDA, mas após fragmentar o compacto e estromático crescimento em um almofariz e transferir os fragmentos para um filme de água destilada, alguns conídios hialinos foram produzidos. Foi então desenvolvido o seguinte método para a produção de conídios em meio artificial: uma porção do centro de uma colônia com 4 a 6 semanas (WHITESIDE, 1975) ou com 3 a 4 semanas (WHITESIDE, 1978) foi extraída assepticamente e fragmentada em pequenos pedaços em uma placa de Petri. Dez mililitros de um meio líquido semelhante ao meio de Fries modificado (LUKE & WHEELER, 1955) foram despejados na placa. As secreções viscosas do fungo logo fixaram a maioria dos fragmentos de hifa ao fundo da placa. Após 3 dias a 25°C, o meio e fragmentos de hifa não aderidos foram decantados e as colônias fixadas foram lavadas 3 vezes com água destilada esterilizada e foi então adicionada água até que as microcolônias ficassem apenas cobertas. Em 5 horas a 25°C, em média 94% das microcolônias estavam esporulando. Após 8 a 10 horas, as microcolônias bem como os conídios produzidos e também presos ao fundo da placa foram destacados com um pincel de pêlo de camelo e sus-

pensos em água. A produção de conídios pelas microcolônias e fragmentos de micélio continuou mesmo após a inoculação sobre folhas e frutos e o número de conídios também foi aumentado por brotamento.

E. australis apenas foi relatado capaz de produzir conídios por brotamento a partir de ascosporos imersos em água (BITANCOURT & JENKINS, 1939).

WHITESIDE (1988) porém, cita que pelo método de produção de conídios de *E. fawcetti* por ele referido anteriormente, conídios foram raramente produzidos no substrato então utilizado: água destilada e que a esporulação foi aumentada com o uso de água esterilizada oriunda de um lago próximo cujo pH era 7,2 - 7,4.

PANINGBATAN (1987) estudou a esporulação de *Sphaceloma batatas*. O método de repicagem que envolve a transferência de uma certa quantidade de fragmentos de hifa do patógeno suspensos em água aumentou a produção de conídios 6 vezes em relação ao de transferência de um bloco de ágar com a cultura do fungo.

Quanto à patogenicidade, WHITESIDE (1978) relata que, inicialmente, a patogenicidade de diferentes isolados de *E. fawcetti* foi testada usando colônias fragmentadas derivadas de culturas em BDA como descritas por WINSTON (1923) e BITANCOURT & JENKINS (1937a) mas os resultados eram

inconsistentes e geralmente negativos mesmo na cultivar "Temple" de tangerina que é altamente suscetível. Posteriormente, verificou que infecção do tecido hospedeiro suscetível poderia ser assegurada apenas quando o inóculo continha abundante quantidade de conídios.

Segundo DINGRA & SINCLAIR (1985) testes de patogenicidade em folhas destacadas de plantas são de grande utilidade, tanto para avaliação de resistência da planta como para estudos de raças do patógeno.

TUITE (1969) cita as vantagens do uso de cultura de folhas destacadas: economia de espaço, inóculo e plantas, melhor controle de luz, temperatura e umidade, facilidade de observação e menor chance de contaminação, além da alta correlação encontrada entre experimentos com folhas destacadas e não destacadas.

Variedades de trigo mostraram boa correlação entre resultados de experimentos de campo e de folhas destacadas em casa de vegetação para resistência horizontal à ferrugem (WILCOXSON et alii, 1974). Estes autores concluíram ser o método da folha destacada útil para seleção preliminar de variedades.

KRUPINSKY (1987) avaliou isolados de *Pyrenophora tritici repentis* com vários níveis de virulência em testes de folhas destacadas. Posteriores inoculações com plantas

inteiras em casa de vegetação confirmaram os resultados. O uso da folha destacada foi uma técnica efetiva além de apresentar a vantagem de ser mais rápido.

Testando clones de alfafa para resistência a *Phoma herbarum* var. *medicaginis*, WARD (1959) obteve resultados semelhantes em experimentos de inoculação no campo, em casa de vegetação e em folhas destacadas inoculadas no laboratório. Além de ser um método rápido e preciso, o uso de folhas destacadas proporcionou vantagens de economia de custo, tempo e espaço.

O método da folha destacada foi utilizado por RIBEIRO et alii (1976) para testar a patogenicidade de isolados de *Cercospora* spp. em amendoim: folhas novas foram colocadas com a face inferior voltada para cima em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido. O pecíolo foi envolvido com algodão úmido. A inoculação foi feita colocando-se gotas da suspensão de esporos sobre a superfície da folha e os sintomas observados após 15 dias.

CURRAH (1984) inoculou *Botrytis squamosa* em segmentos foliares ou discos de folhas adultas. O inóculo constou de gotas de suspensão de esporos com concentração de 1×10^6 a 5×10^6 esporos/ml. Foi avaliada a resistência de variedades de cebola e o teste também foi usado para determinar a resistência de folhas com diferentes idades, varia-

bilidade dentro de cultivares e inóculo necessário para compensar as mudanças sazonais na textura da folha.

FAWCETTI (1921) comparou a patogenicidade de *E. fawcetti* em várias temperaturas sobre plântulas de laranja azeda e folhas jovens destacadas. As plantas foram mantidas em vasos e as folhas destacadas colocadas em placas de Petri sobre água destilada. A temperatura máxima na qual houve infecção em folhas destacadas foi maior que em folhas não destacadas da planta. Nas plântulas a infecção ocorreu de 16 a 23°C e em folhas destacadas de 16 a 27,5°C. Estes resultados, portanto, indicam a possibilidade do uso de folhas destacadas de plantas cítricas em testes de patogenicidade, aliada à vantagem da maior faixa de temperatura em que a inoculação é viável.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento

Frutos e folhas com lesões de verrugose foram friccionados superficialmente com álcool 95%. Finas secções tangenciais da casca foram cortadas e maceradas em um almofariz esterilizado. Os fragmentos resultantes foram distribuídos em placas de Petri esterilizadas, às quais foi adicionado meio de cultura de ágar-água (ágar - 16 g, água destilada - q.s.p. - 1000 ml) em temperatura próxima à da solidificação (WHITESIDE, 1975). As placas foram incubadas sob condições de câmara ambiente (Biotronette Mark III, Lab-line Instruments) com luz contínua e temperatura de 25°C. A luminosidade nesta câmara foi fornecida por 2 lâmpadas fluorescentes, luz do dia de 40 watts colocadas a uma altura de aproximadamente 30 cm. Após 3 dias de incubação, os fragmentos que ainda não apresentavam crescimento visível, ou com crescimento menor do que 1 mm, foram transferidos para outra placa com meio de ágar-água. O fungo foi reconhecido pela sua coloração púrpura e crescimento lento. O micélio que se desenvolveu foi repicado para meio de cultura de BDA (extrato de 200 g de batata, dextrose - 20 g, ágar - 16 g, água

destilada - q.s.p. - 1000 ml) utilizando o desenvolvimento de apenas uma das microcolônias, onde foi confirmado seu crescimento estromático compacto.

O fungo foi isolado de frutos e folhas de plantas cítricas de diversas variedades procedentes de locais variados (Tabela 7).

3.2. Preservação do Fungo

Pequenas porções da borda de colônias em placas de Petri foram transferidas para tubos com meio de BDA inclinado, incubados sob luz contínua e temperatura de 25°C durante um mês. Após esse período, os tubos foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos sob refrigeração a 5°C, por um período de tempo de até um ano antes de serem novamente repicados.

3.3. Metodologia para Indução de Esporulação

Colônias miceliais armazenadas a 5°C foram maceradas em almofariz esterilizado, adicionando-se posteriormente 16 ml de água destilada esterilizada. A suspensão obtida foi transferida para meio de BDA em placas de Petri na razão de 1 ml/placa e distribuída por inclinação e agitação manual da placa. As placas foram incubadas a 25°C sob regime

de luz contínua em câmara ambiente Biotronette Mark III.

3.3.1. Comparação de períodos de crescimento em BDA

Após 7 dias de crescimento das colônias do fundo repicadas por suspensão de fragmentos de hifas, dois discos de micélio de 0,9 cm de diâmetro foram retirados de cada uma das placas, fragmentadas separadamente em almofariz esterilizado e adicionados de 8 ml de solução de Fries modificada (WHITESIDE, 1975); $(\text{NH}_4) \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ - 5 g NH_4NO_3 - 1 g, K_2HPO_4 - 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g, CaCl_2 - 0,1 g, NaCl - 0,1 g, saca-rose - 20 g e água destilada - q.s.p. - 1000 ml. Cada suspensão de micélio foi despejada em uma placa de Petri esterilizada e incubada por 4 dias a 25°C e luz contínua. Após este período, o micélio aderido ao fundo das placas foi lavado três vezes com água destilada esterilizada e às placas originadas de um dos discos de micélio referidos foram acrescentados 8 ml de água destilada esterilizada (WHITESIDE, 1975); à outra metade adicionou-se 8 ml de uma suspensão de fubá (fubá - 60 g e água destilada - q.s.p. - 1000 ml), que foi obtida por filtração através de papel de filtro com auxílio de sucção em bomba-vácuo e posteriormente autoclavada a 120°C por 20 minutos. Novamente as placas foram incubadas nas mesmas condições e após 8 horas os conídios obtidos foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Para destacar os conídios do fundo da placa utilizou-se um pincel macio, deixando em suspensão também as microcolônias do fungo. Durante

a contagem as demais placas eram mantidas sob refrigeração para evitar alteração no número de conídios produzidos. Os mesmos procedimentos foram repetidos após 10, 20 e 30 dias de crescimento no meio da cultura. Foram utilizados 3 isolados, dois de *E. australis* e um de *E. fawcettii*, com 3 repetições, sendo cada placa uma repetição.

3.3.2. Comparação de períodos de crescimento em solução de Fries

Os fungos foram cultivados em BDA por 7 dias, conforme descrito anteriormente, transferidos para solução de Fries seguindo a metodologia citada e utilizando-se discos de micélio com diâmetros de 0,9, 1,2 e 1,5 cm retirados da mesma placa. Após 3 dias de incubação sob condições controladas de 25°C e luz contínua (WHITESIDE, 1975) o micélio aderido às placas foi lavado com água destilada esterilizada e recebeu 8 ml de suspensão de fubá. Depois de 8 horas de incubação foi feita a contagem dos conídios produzidos. O mesmo se repetiu após 4 e 5 dias de crescimento em solução de Fries. Utilizou-se um isolado de *Elsinoe australis* e um de *E. fawcettii* com 3 repetições.

3.3.3. Comparação de tamanhos de discos de micélio

3.3.3.1. 8 tamanhos de disco de micélio de isolados de *Elsinoe australis* e *E. fawcetti*

A partir de culturas em meio de BDA com 7 dias foram obtidos, de cada placa, discos de micélio com os seguintes diâmetros: 0,4, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5, 1,8, 2,1 e 2,4 cm, os quais foram fragmentados separadamente e transferidos para solução de Fries em placas de Petri. Depois de 4 dias, sob luz contínua e 25°C, o micélio foi lavado e sobre ele despejados 8 ml de suspensão de fubã e as placas foram novamente incubadas por 8 horas, após o que fez-se a contagem dos conídios produzidos. Utilizou-se um isolado de cada espécie. Foram feitas 3 repetições.

3.3.3.2. 3 tamanhos de disco de micélio de isolados de *E. australis*

Culturas em meio de BDA por 7 dias foram utilizadas para se retirar de cada placa discos de micélio com diâmetros de 0,4, 0,9 e 1,4 cm, os quais foram fragmentados, acrescidos de solução de Fries e transferidos para placas. Após 4 dias de incubação em câmara ambiente a 25°C sob luz contínua, o micélio foi lavado e recebeu 8 ml de suspensão de fubã. As placas retornaram à câmara ambiente por 8 horas

e os conídios produzidos foram contados. Utilizou-se 7 isolados com três repetições.

3.3.3.3. 3 tamanhos de micélio de isolados de *E. fawcetti*

Os mesmos procedimentos do item anterior foram seguidos utilizando-se quatro isolados de *E. fawcetti*.

3.3.4. Comparação de substratos líquidos para produção de conídios

Vinte e quatro isolados foram cultivados por 7 dias a 25°C e luz contínua em placas de BDA. De cada uma delas foram retirados dois discos de micélio com 0,9 cm de diâmetro, os quais foram fragmentados e cultivados por quatro dias em solução de Fries seguindo a metodologia anteriormente citada. Após a lavagem do micélio, às placas provenientes de um dos discos foram adicionados 8 ml de água e à outra metade 8 ml de suspensão de fubã. As placas foram retornadas à câmara ambiente por 8 horas, após o que fez-se a contagem dos conídios produzidos. Foram utilizados 16 isolados de *E. australis* e 8 de *E. fawcetti*, com 3 repetições.

3.4. Caracterização Morfológica

3.4.1. Coloração das colônias

Os 39 isolados de *Elsinoe* foram cultivados em tubos contendo meio de BDA inclinado, utilizando-se o método de repicagem através de disco de micélio. Os tubos foram incubados a 25°C no escuro por 30 dias, sendo observado o aspecto e coloração das colônias. Para a repicagem evitou-se utilizar micélio de setores com aspecto variável, que algumas vezes se formaram nas culturas originais.

3.4.2. Dimensionamento microscópico dos conídios

A partir de 20 isolados armazenados a 5°C por um período de 6 a 12 meses foi realizado o dimensionamento microscópico de 50 conídios/isolado.

Os conídios foram obtidos da seguinte forma: os isolados foram cultivados em BDA por 7 dias a 25°C e luz contínua, tendo sido o método de repicagem através de suspensão micelial. Foi retirado de cada placa um disco de micélio com 0,4 cm de diâmetro, o qual foi fragmentado e cultivado em solução de Fries por 4 dias; o micélio que se desenvolveu foi lavado com água destilada esterilizada e a ele adicionados 8 ml de suspensão de fubã. Depois de 5 horas, os conídios formados foram coletados e receberam corante de

lactofenol (cristais de fenol - 20 g, ácido lático - 20 g, glicerol - 40 g, "cotton blue" - 1 g, água destilada - q.s.p. - 20 ml). Fazendo-se uso da ocular micrométrica (Filar Micrometer Eyepiece da Bausch & Lomb) previamente calibrada e da lente objetiva que proporcionava um aumento de 100 vezes, foram medidos o comprimento e a largura dos conídios. Foi obtida também a relação comprimento/largura de cada conídio.

3.5. Caracterização Fisiológica

3.5.1. Crescimento a 32°C

Cinco isolados de *E. australis* e 5 de *E. fawcetti* foram cultivados a 32°C, na ausência de luz por 45 dias, a partir de discos de micélio colocados no centro do meio de cultura. Após esse período, foi medido o diâmetro das colônias. Os discos de micélio utilizados foram de 0,6 cm de diâmetro retirados de culturas miceliais em BDA com 7 dias, obtidas por suspensão de micélio. Foram feitas 5 repetições.

3.5.2. Esporulação

Isolados de *Elsinoe* foram repicados para BDA em placas pelo método de suspensão de micélio e cultivados por 7 dias a 25°C e luz contínua. Dois discos de micélio com

0,9 cm de diâmetro foram retirados de cada uma das placas, fragmentados separadamente e cultivados em solução de Fries nas mesmas condições de incubação. Após 4 dias o micélio foi lavado três vezes com água destilada esterilizada. As placas que receberam um dos discos foram adicionados 8 ml de água e a outra metade adicionou-se 8 ml de suspensão de fubã. Os conídios formados foram contados após 8 horas de incubação. Utilizou-se 24 isolados, sendo 16 de *E. australis* e 8 de *E. fawcetti* com três repetições.

3.6. Caracterização Patogênica

Foram utilizadas folhas jovens de plantas cítricas nos testes de patogenicidade. Estas foram obtidas através de podas regulares em ramos de mudas de plantas cultivadas em casa de vegetação. Utilizou-se plantas de limões Cravo, Rugoso da Flórida e Siciliano, laranja Azeda São Paulo, pomelo 'Marsh Seedless', laranjas Baía e Baianinha. Folhas tenras com 2 a 3 cm de comprimento foram retiradas de brotações cujas folhas do ápice ainda se encontravam fechadas, no final do período diurno (TUIE, 1969).

As folhas foram lavadas em água corrente, tiveram o pecíolo envolvido com algodão umedecido e foram colocadas dentro de placas de plástico sobre uma camada de algodão e três folhas de papel de filtro umedecidas, com a

face inferior voltada para cima, em número de 5 por placa. As placas foram vedadas com folhas plásticas.

Para cada teste variedade-hospedeiro utilizou-se duas placas, totalizando 10 folhas.

3.6.1. Obtenção do inóculo

Os isolados de *Elsinoe*, repicados por suspensão de micélio, foram cultivados em placas de Petri por 7 dias em condições de câmara ambiente (25°C e luz contínua). Após este período discos de micélio com 0,4 cm de diâmetro foram retirados, fragmentados e cultivados em solução de Fries nas mesmas condições. Após 4 dias, o micélio foi lavado e recebeu suspensão de fubã. As placas retornaram à câmara ambiente por 8 horas.

Os conídios produzidos nesse período foram soltos do fundo da placa por agitação manual da mesma, para evitar que o micélio, mais firmemente aderido, estivesse presente na suspensão de inóculo. Foi feita contagem em câmara de Neubauer e a concentração da suspensão ajustada para 10^6 conídios/ml.

Para os isolados que não atingiram esta concentração de conídios na placa original foi feita centrifugação da suspensão por 10 minutos a 10.000 rpm, desprezando

o excesso do sobrenadante.

3.6.2. Inoculação

A inoculação foi feita utilizando-se um micropipetador. Uma gota de 10 μ l foi colocada sobre a face inferior de cada folha. Utilizou-se como testemunha folhas inoculadas com água destilada e também limão Cravo inoculado com o isolado 13, que foi tomado como padrão. As folhas foram incubadas a 22-23°C, no escuro, por 18 horas (BAKER, 1938). Após esse período as placas foram abertas e deixadas à luz contínua e 24°C por aproximadamente 3 horas, até que as gotas de inóculo se evaporassem. Novamente fechadas, as placas foram mantidas neste ambiente sob câmara úmida até que pudessem ser observados os sintomas. As avaliações foram feitas após 1 e 2 semanas.

4. RESULTADOS

4.1. Metodologia para Esporulação

4.1.1. Comparação de períodos de crescimento em BDA

A esporulação apresentou, em geral, uma tendência a diminuir com a idade da cultura em BDA. Os isolados 1 e 13 apresentaram a melhor produção de conídios em suspensão de fubá após o período de 7 dias de crescimento em BDA. O isolado 6 não apresentou esporulação satisfatória. A produção de conídios em água (WHITESIDE, 1975) apenas foi observada para o isolado 13 de *E. fawcetti* e foi muito pequena ou nula para os isolados 1 e 6 de *E. australis* (Tabela 1).

4.1.2. Comparação de períodos de crescimento em solução de Fries

A esporulação dos isolados de *E. australis* e *E. fawcetti* foi influenciada pelo período de crescimento em solução de Fries e pelo tamanho do disco de micélio utilizado para esse fim. Os tratamentos que propiciaram menor de-

Tabela 1. Efeito da idade da cultura em BDA e de 2 substratos de transferência de fragmentos miceliais sobre a esporulação de 2 isolados de *E. australis* e 1 de *E. fauceetti**

Idade da cultura em BDA (dias)	Nº de conídios ($\times 8.10^5$)/placa ¹ formados em água ou fubã ² pelos isolados ³					
	1		6		13	
	água	fubã	água	fubã	água	fubã
7	0,57	26,47 a	0,04	0,86 a	5,16	103,5 a
10	0,47	22,30 a	0,00	1,93 a	8,15	51,17 b
20	0,00	3,43 b	0,02	0,48 a	0,28	36,25 b
30	0,01	5,12 b	0,06	0,24 a	1,47	38,90 b

¹ média de 3 repetições; médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% (Tukey dos dados transformados em $\sqrt{x}$).

² substrato líquido obtido pela suspensão de 60 g de fubã/1 de água.

³ isolados 1 e 6 de *E. australis* e 13 de *E. fauceetti*.

*Obs.: o método de indução de esporulação baseou-se na transferência de fragmentos de discos miceliais de 0,9 cm de diâmetro de colônias produzidas em BDA para solução de Fries por 4 dias e depois para substratos líquidos onde permaneceram por 8 horas.

desenvolvimento micelial (períodos e discos menores), em geral, favoreceram a esporulação (Tabela 2).

O período de 4 dias com menor disco foi o melhor tratamento pois além de boa esporulação permitiu maior aderência das microcolônias ao fundo da placa que o período de 3 dias (WHITESIDE, 1978) aderência esta suficiente para que as microcolônias não entrassem em suspensão quando da coleta dos conídios.

4.1.3. Comparação de tamanhos de disco de micélio

4.1.3.1. Comparação de oito tamanhos de disco de micélio

Os discos de micélio de menor tamanho favoreceram a esporulação dos isolados de *E. australis* e *E. fawcetti*. Neste experimento, a melhor esporulação de *E. australis* ocorreu quando se utilizou discos de micélio com diâmetro entre 0,4 e 1,2 cm e para *E. fawcetti* entre 0,4 e 1,5 cm (Tabela 3).

4.1.3.2. Comparação de 3 tamanhos de disco de micélio de isolados de *E. australis*

Isolados de *E. australis* apresentaram esporu-

Tabela 2. Efeito de períodos de cultivo em solução de Fries e de 3 tamanhos de disco de micélio sobre a esporulação de 1 isolado de *E. australis* e 1 de *E. fawcetti**

Diâmetro do disco de micélio (cm)	Nº de conídios ($\times 8.10^5$)/placa ¹									
	Isolado 4 ²					Isolado 13 ³				
	período (dias) ⁴					período (dias) ⁴				
	3	4	5	médias	3	4	5	médias	3	4
0,9	0,78	1,18	0,24	0,73 a	28,67	64,67	71,13	54,82 a		
1,2	1,23	0,13	0,14	0,50 ab	33,42	43,92	39,50	39,11 ab		
1,5	0,41	0,06	0,03	0,17 b	34,50	34,92	17,83	29,08 b		
Médias	0,81 A	0,46 AB	0,14 B		32,20 A	47,84 A	42,82 A			

¹ médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e pela mesma letra maiúscula dentro do mesmo isolado não diferem estatisticamente ao nível de 5% (Tukey dos dados transformados em $\sqrt{x}$).

^{2,3} isolados de *E. australis* e *E. fawcetti*, respectivamente.

⁴ tempo que os fragmentos miceliais foram cultivados em 8 ml de solução de Fries.

* Obs.: o método de esporulação baseou-se na transferência de fragmentos de discos de micélio de colônias produzidas em BDA por 7 dias para solução de Fries e depois para um substrato líquido, obtido pela suspensão de 60 g de fubá/l de água, por 8 horas.

Tabela 3. Efeito de 8 tamanhos de disco de micélio para cultivo em solução de Fries sobre a esporulação de 1 isolado de *E. australis* e 1 de *E. fawcetti**

Diâmetro do disco de micélio (cm)	Nº de conídios ($\times 8.10^5$)/placa ¹	
	Isolado 4 ²	Isolado 11 ³
0,4	0,52 abc	42,61 ab
0,6	0,64 ab	51,11 ab
0,9	1,17 a	77,08 a
1,2	0,58 ab	45,19 ab
1,5	0,23 bc	59,79 ab
1,8	0,19 bc	28,85 bc
2,1	0,07 bc	9,63 cd
2,4	0,02 c	4,02 d

¹ média de 3 repetições; médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% (Tukey dos dados transformados em $\sqrt{x}$).

^{2,3} isolados de *E. australis* e *E. fawcetti*, respectivamente.

*Obs.: o método de esporulação baseou-se na transferência de fragmentos de discos de micélio de colônias produzidas em BDA por 7 dias para solução de Fries por 4 dias e depois para um substrato líquido, obtido pela suspensão de 60 g de fubã/l de água, por 8 horas.

lação variável, a utilização de discos de micélio com diâmetro de 0,4 cm induziu esporulação semelhante ou melhor que a dos outros tamanhos de disco de micélio (Tabela 4).

4.1.3.3. Comparação de 3 tamanhos de disco de micélio de isolados de *E. fawcetti*

Os isolados de *E. fawcetti* apresentaram boa esporulação, e esta foi aumentada pelo uso dos menores discos de micélio, conforme a Tabela 5.

4.1.4. Comparação de substratos para produção de conídios

Os isolados de *E. australis* esporularam apenas em suspensão de fubã e a produção de conídios de *E. fawcetti* aumentou quando a água, utilizada na metodologia convencional (WHITESIDE, 1978) foi substituída por suspensão de fubã (Tabela 6). Obs.: Após testar, para esporulação, vários meios de cultura sólidos à superfície dos quais se adicionou 8 ml de água, o fungo esporulou ao ser utilizado o meio de fubã (fubã - 60 g, agar - 16 g e água destilada - q.s.p. - 1000 ml). A partir deste resultado foi utilizada a suspensão de fubã.

4.2. Caracterização Morfológica

4.2.1. Coloração da colônia

Os 39 isolados de *Elsinoe* cultivados a 25°C e

Tabela 4. Efeito de 3 tamanhos de disco de micélio para cultivo em solução de Fries sobre a esporulação de isolados de *E. australis**

Diâmetro do disco de micélio (cm)	Nº de conídios ($\times 8.10^5$)/placa ¹ dos isolados						
	3	4	7	12	16	17	42
0,4	2,93 a	8,44 a	2,43 a	3,18 a	0,55 a	0,67 a	6,58 a
0,9	0,28 b	2,13 b	1,19 a	3,15 a	0,65 a	0,72 a	5,07 a
1,5	0,28 b	0,35 b	0,38 a	0,35 a	0,02 a	0,07 a	3,57 a
							Média
							3,54
							1,88
							0,72

¹ média de 3 repetições; médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% (Tukey dos dados transformados em $\sqrt{x}$).

* o método baseou-se na transferência de fragmentos de discos de micélio de colônias produzidas em BDA para solução de Fries por 4 dias e depois substituída por substrato líquido, obtido pela suspensão de 60 g de fubá/1 de água, onde permaneceram por 8 horas.

Tabela 5. Efeito de 3 tamanhos de disco de micélio para cultivo em solução de Fries sobre a esporulação de isolados de *E. faecetti**

Diâmetro do disco de micélio (cm)	Nº de conídios ($\times 8.10^5$)/placa ¹ dos isolados			
	11	13	15	25
0,4	52,98	63,75	76,04	92,08
				71,21 a
0,9	62,75	41,42	67,71	80,63
				63,13 a
1,5	42,96	35,67	34,79	59,38
				43,20 b

¹ médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% (Tukey dos dados transformados em $\sqrt{X}$).

* O método de esporulação baseou-se na transferência de fragmentos de discos de micélio de colônias produzidas em BDA por 7 dias para 8 ml de solução de Fries por 4 dias e depois substituída por 8 ml de um substrato líquido obtido pela suspensão de 60 g de fubá/l de água, onde permaneceram por 8 horas.

Tabela 6. Esporulação de isolados de *Elsinoe australis* e *E. fawcetti* em dois substratos líquidos

Isolados	Nº conídios ($\times 8.10^5$)/placa ¹ formados em	
	fubá ²	água
<i>E. australis</i>		
3 - laranja Lima	0,89 c	0,02
4 - tangor Murcote	8,05 c	0,00
5 - tangerina Ponkan	0,29 c	0,00
6 - limão Galego	0,97 c	0,00
7 - laranja Baianinha	2,07 c	0,01
8 - laranja Baía	1,40 c	0,00
9 - mexerica	4,83 c	0,03
10 - laranja Seleta	2,23 c	0,00
12 - laranja Caipira	8,17 c	0,03
16 - laranja Lima	7,00 c	0,00
17 - laranja Baianinha	0,30 c	0,00
22 - laranja Pera	8,00 c	0,00
28 - laranja Baía	3,50 c	0,00
29 - laranja Pera Natal	5,42 c	0,00
34 - laranja Pera	0,59 c	0,00
35 - laranja Pera	8,35 c	0,00
<i>E. fawcetti</i>		
11 - limão Siciliano	51,50 A b	12,58 B
13 - limão Cravo	149,67 Aa	17,25 B
15 - limão Cravo	46,25 A b	10,50 B
18 - limão Cravo	64,17 A b	12,07 B
21 - limão Cravo	84,33 A b	7,42 B
23 - limão Cravo	87,83 Aab	6,83 B
25 - limão	54,83 A b	8,25 B
33 - limão Rugoso da Flórida	67,17 A b	11,00 B

¹ médias de 3 repetições; médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna e pela mesma letra maiúscula em cada linha não diferem estatisticamente ao nível de 5% (Tukey dos dados transformados em $\sqrt{x}$).

² substrato líquido obtido pela suspensão filtrada de 60 g de fubá/l de água.

* O método de esporulação baseou-se na transferência de fragmentos de discos de micélio de colônias produzidas em BDA por 7 dias para 8 ml de solução de Fries por 4 dias e depois substituída por 8 ml de substratos líquidos onde permaneceram por 8 horas.

na ausência de luz apresentaram menor produção do pigmento avermelhado sobre as colônias, facilitando a distinção entre as espécies. O período de 30 dias não permitiu a formação de micélio superficial lanoso branco, que é uma característica comum das duas espécies com o envelhecimento das colônias.

Elsinoe fawcetti apresentou coloração amarelo claro e *E. australis* coloração escura a preta pelo menos no centro das colônias, o que permitiu a identificação das duas espécies do fungo, como pode ser visto na Figura 1.

Pôde-se observar também que ambas as espécies tiveram a capacidade de produção de setores, embora com mais frequência em *E. australis*.

A Tabela 7 relaciona as espécies de *Elsinoe* e seus respectivos hospedeiros identificados de acordo com a coloração da colônia.

4.2.2. Dimensionamento microscópico dos conídios

Os conídios de *E. fawcetti* apresentaram comprimento de 3,9 a 7,7 μm e largura de 2,1 a 4,5 μm , em média 5,8 x 2,8 μm e uma relação comprimento/largura média de 2,08. Isolados de *E. australis* produziram conídios medindo 4,3 a 8,7 μm por 1,9 a 3,4 μm , com uma média de 6,0 x 2,4 μm e relação comprimento/largura média de 2,52.

Figura 1. Aspecto das colônias de *E. fawcetti* e de *E. australis* em BDA, a 25°C, no escuro, aos 30 dias de idade. A, B, C e D correspondem respectivamente aos isolados 11, 15, 25 e 33 de *E. fawcetti* e E, F, G e H aos isolados 4, 6, 17 e 42 de *E. australis*.

A distinção das espécies pôde ser auxiliada pelo teste "t" de Student para contraste entre as médias de comprimento, largura e relação comprimento/largura dos conídios dos grupos de isolados de uma espécie em relação à outra; ocorrendo, nos três casos, diferença significativa com uma confiança de 99,999%. Com respeito às distribuições de frequência do comprimento, largura e relação comprimento/

Tabela 7. Relação de espécies de *Elsinoe* obtidas de várias regiões.

Isolado	Variedade de Citros	Órgão	Procedência	Data	Espécie
1	laranja Pera	fruta madura	Piracicaba (SP)	02/03/86	<i>E. australis</i>
3	laranja Lima	fruta madura	Piracicaba (SP)	02/03/86	<i>E. australis</i>
4	tangor Murcote	fruta madura	Piracicaba (SP)	02/03/86	<i>E. australis</i>
5	tangerina Ponkan	fruta madura	Piracicaba (SP)	02/03/86	<i>E. australis</i>
6	limão Galego	fruta madura	Piracicaba (SP)	02/03/86	<i>E. australis</i>
7	laranja Baianinha	fruta quase madura	Itu (SP)	12/04/86	<i>E. australis</i>
8	laranja Baía	fruta quase madura	Itu (SP)	12/04/86	<i>E. australis</i>
9	tangerina Cravo	fruta madura	Itu (SP)	12/04/86	<i>E. australis</i>
10	laranja Seleta	fruta madura	Itu (SP)	12/04/86	<i>E. australis</i>
11	limão Siciliano	fruta verde	Itu (SP)	12/04/86	<i>E. fawcetti</i>
12	laranja Caipira	fruta verde	Itu (SP)	12/04/86	<i>E. australis</i>
13	limão Cravo	folha	Botucatu (SP)	13/04/86	<i>E. fawcetti</i>
14	tangerina Ponkan	fruta verde	Botucatu (SP)	13/04/86	<i>E. australis</i>
15	limão Cravo	folha	Piracicaba (SP)	13/04/86	<i>E. fawcetti</i>
16	laranja Lima	fruta madura	Marília (SP)	18/04/86	<i>E. australis</i>
17	laranja Baianinha	fruta madura	Marília (SP)	18/04/86	<i>E. australis</i>
18	limão Cravo	folha	Bandeirantes (PR)	09/05/86	<i>E. fawcetti</i>
19	limão Cravo	fruta verde	Itumbiara (GO)	30/04/86	<i>E. fawcetti</i>
21	limão Cravo	fruta verde	Carbonita (MG)	14/08/86	<i>E. fawcetti</i>
22	laranja Pera	fruta madura	Conchas (SP)	14/08/86	<i>E. australis</i>
23	limão Cravo	fruta madura	Franca (SP)	14/08/86	<i>E. fawcetti</i>
24	laranja	fruta verde	Marília (SP)	14/08/86	<i>E. australis</i>
25	limão	folha	Uberlândia (MG)	04/09/86	<i>E. fawcetti</i>
26	laranja Seleta	fruta madura	Anhembi (SP)	10/11/86	<i>E. australis</i>
27	laranja Valencia	fruta madura	Anhembi (SP)	10/11/86	<i>E. australis</i>
28	laranja Baiana	fruta madura	Anhembi (SP)	10/11/86	<i>E. australis</i>
29	laranja Pera Natal	fruta madura	Anhembi (SP)	10/11/86	<i>E. australis</i>
30	tangor Murcote	fruta madura	Anhembi (SP)	10/11/86	<i>E. australis</i>
31	laranja Piralima	fruta madura	Anhembi (SP)	10/11/86	<i>E. australis</i>
32	mexerica do Rio	fruta madura	Anhembi (SP)	10/11/86	<i>E. australis</i>
33	limão Rugoso da Flórida	folha	Cordeirópolis (SP)	10/08/87	<i>E. fawcetti</i>
34	laranja Pera	fruta madura	Porto Feliz (SP)	14/09/87	<i>E. australis</i>
35	laranja Pera	fruta madura	Porto Feliz (SP)	14/09/87	<i>E. australis</i>
36	tangerina Satsuma	fruta verde	Presidente Prudente (SP)	21/01/88	<i>E. australis</i>
38	tangerina Cravo	fruta verde	Presidente Prudente (SP)	21/01/88	<i>E. australis</i>
40	mexerica do Rio	fruta verde	Presidente Prudente (SP)	21/01/88	<i>E. australis</i>
42	laranja Azeda São Paulo	fruta madura	Cordeirópolis (SP)	01/02/88	<i>E. australis</i>
44	laranja Hamlin	fruta madura	Cordeirópolis (SP)	01/02/88	<i>E. australis</i>
45	tangerina Clementina	fruta madura	Cordeirópolis (SP)	01/02/88	<i>E. australis</i>

/largura dos conídios (Tabelas 8, 9 e 10), a última demonstrou mais claramente a diferença entre espécies, pois pelo menos 60% dos 50 conídios de cada isolado de *E. australis* apresentaram valor próximo a 2,5, o mesmo acontecendo com *E. fawcetti*, com valores próximos de 2,0.

4.3. Caracterização Fisiológica

4.3.1. Crescimento a 32°C

Os isolados de *E. australis* apresentaram maior crescimento da colônia que os de *E. fawcetti* (Tabela 11 e Figura 2). Os isolados 17 e 42 de *E. australis* apresentaram alteração da forma de crescimento no final do período de cultivo tornando as margens das colônias mais rasas e extensas.

Através do teste "t" de Student para contrastes, o diâmetro médio final das colônias dos isolados de *E. australis* foi maior que o de *E. fawcetti* com uma confiança de 99,999%.

4.3.2. Esporulação

Os isolados de *E. fawcetti* apresentaram esporulação significativamente maior que os de *E. australis* tan-

Tabela 8. Médias e distribuição de frequência do comprimento dos conídios de isolados de *Elsinoe*.

Isolados	Número de conídios com comprimento (μm) dentro dos intervalos com média m^1 de											Média ²	Variância	
	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0			
<i>E. australis</i>														
1 - laranja Pera		1	1	17	18 ³	8	4	1				6,04 ³	abcde	0,40
3 - laranja Lima		1	2	7	13	12	10	4	1			6,35	a	0,50
4 - tangor Murcote			2	13	14	16	2	2	0	1		6,18	abc	0,41
5 - tangerina Ponkan		2	9	8	12	14	4	1				5,93	bcdef	0,52
6 - limão Galego			3	13	11	6	12	2	2	0	1	6,34	a	0,77
8 - laranja Baía			1	10	15	14	8	1	1			6,22	ab	0,35
12 - laranja Caipira			7	9	20	9	4	1				5,97	bcdef	0,35
16 - laranja Lima			12	18	12	7	1					5,65	fg	0,26
28 - laranja Baía			2	14	20	10	3	0	0	1		6,04	abcde	0,32
35 - laranja Pera		1	3	13	16	8	8	1				6,03	abcde	0,38
42 - laranja Azeda São Paulo		2	15	17	8	5	3					5,56	g	0,40
<i>E. fawcetti</i>														
11 - limão Siciliano	2	0	9	13	21	2	2	1				5,64	fg	0,40
13 - limão Cravo		1	10	13	18	7	1					5,72	efg	0,25
15 - limão Cravo			2	14	16	11	5	2				6,11	abcd	0,32
18 - limão Cravo			1	14	19	7	7	2				6,10	abcd	0,35
19 - limão Cravo			5	22	20	3						5,69	efg	0,13
21 - limão Cravo			7	16	17	8	2					5,84	cdefg	0,25
23 - limão Cravo	2	1	5	13	18	7	3	1				5,81	defg	0,40
25 - limão		3	10	15	15	5	2					5,64	fg	0,39
33 - limão Rugoso da Flórida	1	6	9	16	11	6	1					5,55	g	0,39

¹ m representa o intervalo $m \pm 0,2$.

² média de 50 repetições; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

³ número em negrito indica que o intervalo contém a média do isolado.

Tabela 9. Média e distribuição de frequência da largura (μm) dos conídios de isolados de *Elsinoe*.

Isolados	Número de conídios com largura (µm) dentro dos intervalos com média m ¹ de						Média ²	Variância	
	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5			
<i>E. australis</i>									
1 - laranja Pera	12	31 ³	7				2,45	hi	0,07
3 - laranja Lima	2	31	17				2,65	def	0,06
4 - tangor Murcote	8	37	4	1			2,49	gh	0,06
5 - tangerina Ponkan	11	32	7				2,45	hi	0,06
6 - limão Galego	17	25	8				2,42	hi	0,08
8 - laranja Baía	6	37	7				2,52	fgh	0,03
12 - laranja Caipira	7	41	2				2,48	gh	0,03
16 - laranja Lima	28	20	2				2,27	hi	0,05
28 - laranja Baía	23	27					2,31	ij	0,05
35 - laranja Pera	16	33	1				2,38	hij	0,03
42 - laranja Azeda São Paulo	47	3					2,08	k	0,02
<i>E. fauvelii</i>									
11 - limão Siciliano		18	31	1			2,83	b	0,06
13 - limão Cravo	3	25	21	1			2,67	cde	0,07
15 - limão Cravo		20	23	7			2,89	b	0,10
18 - limão Cravo		12	38				2,81	bc	0,03
19 - limão Cravo		13	36	1			2,80	bcd	0,05
21 - limão Cravo	1	15	30	4			2,83	b	0,08
23 - limão Cravo	3	10	21	13	1	2	3,05	a	0,26
25 - limão	2	30	15	3			2,62	efg	0,07
33 - limão Rugoso da Flórida		20	29	1			2,79	bcd	0,05

¹ m representa o intervalo $m \pm 0,2$.

² média de 50 repetições; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

³ número em negrito significa que o intervalo contém a média do isolado.

Tabela 10. Média e distribuição de frequência da relação comprimento/largura dos conídios dos isolados de *Ellisioe*.

Isolados	Número de conídios com relação comprimento /largura (μm) dentro dos intervalos com média m^1 de						Média ²	Variância
	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5		
<i>E. australis</i>								
1 - laranja Pera			7	35 ³	7	1	2,48 c	0,06
3 - laranja Lima			11	34	5		2,40 c	0,06
4 - tangor Murcote			10	30	10		2,50 bc	0,06
5 - tangerina Ponkan			13	30	7		2,43 c	0,06
6 - limão Galego			3	33	11	3	2,62 ab	0,08
8 - laranja Baía			7	38	5		2,47 c	0,05
12 - laranja Caipira			11	37	2		2,42 c	0,05
16 - laranja Lima			5	40	5		2,50 bc	0,05
28 - laranja Baía			2	37	11		2,63 ab	0,07
35 - laranja Pera			5	38	6	1	2,54 abc	0,08
42 - laranja Azeda São Paulo			1	33	16		2,68 a	0,11
<i>E. faucei</i>								
11 - limão Siciliano	1	6	36	6	1		2,01 ef	0,08
13 - limão Cravo		3	32	15			2,16 d	0,07
15 - limão Cravo		2	30	18			2,14 de	0,06
18 - limão Cravo			36	14			2,17 d	0,03
19 - limão Cravo			45	5			2,05 def	0,04
21 - limão Cravo		2	37	11			2,08 def	0,04
23 - limão Cravo	1	11	33	5			1,94 f	0,08
25 - limão		2	32	15	1		2,16 d	0,05
33 - limão Rugoso da Flórida		6	36	8			1,99 ef	0,06

¹ m representa o intervalo $[m - 0,25, m + 0,25)$

² média de 50 repetições; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

³ número em negrito indica que o intervalo contém a média do isolado.

Tabela 11. Diâmetro das colônias dos isolados de *Elsinoe* em BDA, a 32°C, na ausência de luz, aos 45 dias de idade*

Isolados	Diâmetro das colônias ¹
<i>E. australis</i>	
1 - laranja Pera	1,83 b
4 - tangor Murcote	1,96 ab
12 - laranja Caipira	1,84 b
17 - laranja Baianinha	2,11 a
42 - laranja Azeda São Paulo	2,14 a
Média	1,98
<i>E. fawcetti</i>	
11 - limão Siciliano	1,35 c
13 - limão Cravo	1,47 c
15 - limão Cravo	1,47 c
21 - limão Cravo	1,40 c
33 - limão Rugoso da Flórida	1,49 c
Média	1,44

¹ média de 5 repetições; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

*Obs.: colônias obtidas a partir de um disco de micélio de 0,6 cm de diâmetro retirado de colônias em BDA aos 7 dias de idade obtidas por suspensão de micélio.

Figura 2. Comparação do crescimento das colônias de isolados de *Elsinoe australis* e *E. fawcetti* em BDA, a 32°C aos 45 dias de idade.

to em água, onde o último raramente produziu alguns conídios, como em suspensão de fubá (Tabela 6).

4.4. Caracterização Patogênica

Os 22 isolados testados puderam ser caracterizados pelos testes de patogenicidade (Tabela 12). Em folhas de limão Cravo, os isolados de *E. fawcetti* sempre causaram lesões típicas da doença e os de *E. australis* não produziram sintomas. O mesmo ocorreu sobre limão Rugoso da Flórida e limão Siciliano.

E. australis sobre laranja Azeda São Paulo, laranja doce (representada pelas variedades Baía e Baianinha) e pomelo causou sintomas principalmente do tipo B (Figura 3), sendo que em Baía e Baianinha apenas sintomas do tipo B foram observados. A maioria dos sintomas causados por *E. fawcetti* sobre estas mesmas espécies cítricas foi do tipo C. Isolados de *E. australis* não causaram sintomas do tipo A e os de *E. fawcetti* não causaram os do tipo B.

Tabela 12. Teste de patogenicidade de *Elsinoe* spp em *Citrus* spp pelo método de inoculação em folhas destacadas

Isolados	Sintomas* em						
	limão Cravo	limão Rugoso da Flórida	limão Siciliano	laranja Azeda São Paulo	laranja Baianinha	laranja Baía	pomelo
<i>E. australis</i>							
1 - laranja Pera	as	as	-	B	B	-	B e C
3 - laranja Lima	as	as	as	-	B	B	B
4 - tangor Murcote	as	-	as	B e C	B	-	B
6 - limão Galego	as	as	as	B e D	B	B	B
7 - laranja Baianinha	as	-	-	B	B	B	B
8 - laranja Baía	as	-	as	B	B	-	-
9 - tangerina Cravo	as	-	as	-	-	B	B
12 - laranja Caipira	as	as	as	B e C	B	B	B e C
16 - laranja Lima	as	as	as	D	-	B	B
22 - laranja Pera	as	-	-	B	-	B	B
29 - laranja Pera Natal	as	-	as	B	B	-	C e D
35 - laranja Pera	as	as	as	B e C	-	-	B
42 - laranja Azeda São Paulo	as	-	as	B	B	-	B
<i>E. fauxetti</i>							
11 - limão Siciliano	A	A	A	D	D	-	D
13 - limão Cravo	A	A	A	C	D	D	C
15 - limão Cravo	A	A	-	C	-	D	C
18 - limão Cravo	A	-	A	C e D	C	-	D
19 - limão Cravo	A	-	A	C	C	-	C
21 - limão Cravo	A	A	A	C	C	C	C
23 - limão Cravo	A	A	A	D	C	-	C
25 - limão	A	A	A	C	C	-	C
33 - limão Rugoso da Flórida	A	A	A	C	-	C	C
Testemunha	as	as	as	as	as	as	as

* A: lesões típicas, coalescidas, salientes; B: saliência ou depressão do tecido foliar com pequena lesão no centro; C: pequenas lesões espalhadas; D: lesões incipientes; as: ausência de sintomas e -: teste não realizado.

Figura 3. Tipos de lesões: A (lesões típicas, coalescidas, salientes), B (saliência ou depressão do tecido foliar com pequena lesão no centro), C (pequenas lesões espalhadas) e D (lesões incipientes).

5. DISCUSSÃO

A técnica de isolamento do patógeno utilizada neste trabalho foi aprimorada a partir dos métodos de BITANCOURT & JENKINS (1937a) e WHITESIDE (1975). Não necessitou do conhecimento prévio do início do crescimento das hifas do fungo, como feita pelos autores citados, e possibilitou o isolamento a partir de lesões velhas e pesadamente contaminadas. O método que faz uso de fungicidas semiselectivos citado por WHITESIDE (1986) não foi utilizado pois além de encarecer o processo, o autor cita que não suprimiu satisfatoriamente certos fungos entre os quais *Colletotrichum gloeosporioides*, o qual foi o principal problema para o isolamento nas nossas condições.

A esporulação de *E. australis* somente foi conseguida pela modificação do método convencional para *Elsinoe fawcetti*, descrito por WHITESIDE (1975), substituindo o substrato água por suspensão de fubã. Essa modificação também melhorou a esporulação de *E. fawcetti*.

Utilizando-se suspensão de fragmentos de micélio para repicagem houve crescimento e amadurecimento das hifas do fungo em 7 dias em vez das 4 semanas necessárias pe-

lo método convencional de colocação de um disco de micélio no centro da placa. Esta técnica também facilitou a quantificação do micélio utilizado para produção de conídios, favorecendo a esporulação.

A caracterização de espécies, como regra geral, se apóia em diferenças morfológicas. Por ser bastante semelhante a morfologia das espécies deste gênero, outras diferenças tais como na patogenicidade e características fisiológicas foram muito úteis para a separação das espécies neste trabalho.

Os conídios hialinos de *Elsinoe fawcetti* são descritos com as dimensões de 5 - 10 x 2 - 5 μm e de *Elsinoe australis*, 4 - 6 x 2 - 4 μm (SIVANESAN & CRITCHETT, 1974a,b; SIVANESAN, 1984).

As dimensões dos conídios obtidas neste trabalho foram de 3,9 - 7,7 x 2,1 - 4,5 μm para *E. fawcetti* e de 4,3 - 8,7 x 1,9 - 3,4 μm para *E. australis*, dimensões estas aproximadas às da literatura, entretanto não idênticas. Estas variações observadas podem ser devidas ao método de obtenção de conídios. ZEIGLER & LOZANO (1983) ressaltam a importância da padronização do método de obtenção de conídios em um mesmo meio de cultura para evitar alterações da forma e tamanho. SIVANESAN & CRITCHETT (1974a,b), entretanto, não citaram a forma de obtenção dos conídios.

Na literatura não há referências sobre a relação comprimento/largura (c/l) das espécies de *Elsinoe*. Esta relação, por variar menos que o comprimento ou a largura, é importante na diferenciação de taxa (SUTTON, 1973). Neste trabalho, obteve-se uma relação c/l média de aproximadamente 2,0 para cada um dos 9 isolados de *E. fawcetti* e por volta de 2,5 para os 11 isolados de *E. australis*, o que auxiliou na diferenciação das espécies.

Não foram obtidos isolados cujos conídios tivessem septos ou dimensões como as referidas para *Sphaceloma fawcetti scabiosa* 8 - 16 x 2 - 6 μ m (SIVANESAN & CRITCHETT, 1974c). Isto já era esperado pela distribuição geográfica do patógeno restrita principalmente ao continente australiano (BRUN, 1971), embora ROSSETTI (1980) tenha feito referência ao patógeno sobre tangerinas.

Com relação às características das colônias, WHITESIDE (1984) considerou duvidoso distinguir as duas espécies pela aparência da colônia, embora tenha se baseado apenas em dados da literatura. Por outro lado, BITANCOURT & JENKINS (1937) trabalhando com duas espécies de fungo, concluíram que estas poderiam ser separadas através de comparações culturais. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que *Elsinoe australis* foi distinto de *Elsinoe fawcetti*, havendo pouca variação entre os isolados de cada espécie. A coloração preta foi característica de *E. australis*.

e mostrou-se também bastante estável, confirmando observações de BITANCOURT & JENKINS (1936b) ao passo que isolados de *E. fawcetti* cuja coloração foi clara, nunca produziram setores da cor preta.

Quanto à influência da temperatura no crescimento das colônias, os resultados obtidos estão de acordo com os de BITANCOURT & JENKINS (1937a) pois, os isolados de *E. australis* a temperaturas altas cresceram comparativamente mais que os de *E. fawcetti*.

Os dados dos experimentos sobre esporulação também indicaram diferenças entre isolados das duas espécies, sendo que *E. fawcetti* sempre produziu conídios em maior quantidade que *E. australis*. Como não há trabalhos prévios sobre essa comparação, apenas pode-se citar que WHITESIDE (1975), na Flórida, obteve boa produção de conídios de *E. fawcetti in vitro*, e JENKINS (1933) estudando o modo de formação conidial de isolados da Florida e brasileiros, ambos obtidos de laranja doce, observou que os conídios foram produzidos em maior quantidade pelos isolados americanos. Estas observações vão de encontro aos resultados aqui obtidos. Esta característica, porém, nem sempre assegura a distinção das espécies pois WHITESIDE (1975) observou, durante seus experimentos, que alguns isolados de *E. fawcetti* perderam a capacidade de esporulação e também em 1988 citou que, pela mesma metodologia para esporulação por ele utilizada em

1978, conídios raramente foram produzidos.

Após muitos estudos no Brasil, BITANCOURT & JENKINS (1937a) relacionaram simplifadamente a identificação do patógeno como *Elsinoe australis* quando sobre laranja doce e *E. fawcetti* quando em laranja azeda e limão. Entretanto, WHITESIDE (1984) encontrou na Flórida um biótipo de *E. fawcetti* capaz de infectar laranjas doces. Por este fato, o último autor sugeriu a possibilidade do patógeno que causa verrugose em laranjas doces na América do Sul ser apenas um biótipo de *E. fawcetti* e não outra espécie.

No presente trabalho pôde ser constatado que não apenas as características patogênicas diferenciam as espécies de *Elsinoe*. Foram correlacionadas com a patogenicidade, outras diferenças como na coloração da colônia e no seu crescimento a temperaturas mais elevadas. Estas características foram previamente descritas por BITANCOURT & JENKINS (1937a) como diferenciadoras de isolados dos quais foi encontrada a fase perfeita do fungo, justificando a segura correlação destas características fisiológicas e morfológicas com a identificação da espécie.

WHITESIDE (1984) levantou ainda a questão, no caso de existir a espécie de *E. australis*, se toda verrugose sobre laranja doce na América do Sul é realmente devida a *E. australis* ou se o biótipo de *E. fawcetti* capaz de infectar laranjas doces ocorre na América do Sul.

Foram feitos 39 isolamentos a partir de frutas e folhas cítricas obtidas de diversas localidades dos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Goiás. Trinta deles foram isolados de frutas de laranja doce, tangerina, tangor Murcote, lima ácida e laranja azeda, os quais estavam ausentes em folhas e os nove restantes obtidos de folhas e frutas de limões. Todos os 30 isolados apresentaram em cultura a coloração preta, característica de *E. australis* e os nove isolados de limões tiveram cor amarelo claro. Portanto acredita-se que seja realmente *E. australis* o agente causal de verrugose em laranjas doces no Brasil e se existir nas nossas condições algum biótipo de *E. fawcetti* em laranjas, ele não foi detectado.

Com relação à patogenicidade, a qual tem sido a característica principal para identificação de espécies do gênero *Elsinoe*, WHITESIDE (1984) após observar na Flórida, *E. fawcetti* sobre laranja doce, acredita haver insuficiente especificidade de hospedeiros entre as duas espécies de fungos para identificar o patógeno baseado apenas no hospedeiro atacado. Com efeito, são citados alguns hospedeiros comuns aos dois fungos como tangerina Cravo no Brasil e também laranja azeda na Argentina (BITANCOURT, 1936a). Mas, por outro lado, BITANCOURT & JENKINS (1937a) não conseguiram infecção em testes de inoculação cruzada com isolados brasileiros obtidos de laranja doce e laranja azeda, mas estes causaram

sintomas típicos nos seus hospedeiros congeniais. Uma referência sobre perda de resistência foi feita por BAKER (1938) em Trinidad, o qual encontrou que o pomelo, anteriormente considerado imune, tornou-se muito suscetível. Também neste trabalho foi obtido um isolado de *E. australis* sobre laranja azeda a qual era anteriormente relatada como imune a esta espécie no Brasil.

Os testes de patogenicidade realizados no presente trabalho em folhas destacadas demonstraram que, nestas condições, os isolados de *E. fawcettii* sempre produziram lesões típicas sobre folhas de limão Cravo, limão Rugoso e limão Siciliano e lesões muito leves ou mesmo incipientes sobre folhas de laranja doce, laranja azeda e pomelo. Os isolados de *E. australis* não causaram sintomas sobre folhas de limão, mas pequenas lesões em forma de funil sobre folhas de laranja doce, azeda e pomelo. Foi observado, portanto, que os isolados testados neste experimento apresentaram especificidade de hospedeiros, embora o fato do patógeno, nas condições do teste, ter causado sintomas leves sobre plantas não hospedeiras possa ser um indício de que os limites da capacidade de causar doença talvez não sejam muito rígidos.

As pequenas diferenças de reação de uma mesma variedade de citros causadas por um isolado ou entre isolados da mesma espécie podem ter sido causadas por alteração no número de conídios por brotamento após a inoculação, di-

ferências pequenas na idade das folhas utilizadas no teste e ainda alterações na textura da folha devido a mudanças sazonais, como já observado por CURRAH (1984) em seus experimentos com outras espécies de fungos.

Em contrapartida, WHITESIDE (1978) encontrou algumas divergências nos resultados de testes de patogenicidade com *E. fawcettii* pois um dos biótipos do fungo, na Flórida, foi patogênico a brotos de limão Rugoso, brotos e frutas de pomelo e frutas de Murcote, enquanto que o outro biótipo o foi a estas variedades e também a brotos de laranja azeda, frutas de tangerina Temple e frutas de laranja doce Valência. Nenhum deles causou sintomas em folhas de laranja doce.

Apesar da possibilidade de não haver perfeita correlação de intensidade de sintomas entre os testes de patogenicidade em folhas destacadas com aqueles realizados com folhas não destacadas, várias observações podem ser feitas com relação à distinção pela patogenicidade. Comparando-se apenas os sintomas em folhas, enquanto *Elsinoe australis* nunca causou lesões em limão Rugoso, o biótipo de *Elsinoe fawcettii* na Flórida capaz de infectar laranjas doces foi patogênico ao limão Rugoso.

E. fawcettii em folhas destacadas, causou lesões típicas em limão Cravo e Rugoso e provocou apenas sintomas leves em laranja doce, azeda e pomelo. Nenhum dos bió-

tipos da Flórida correspondeu a estes resultados, pois um deles causou lesões em folhas de pomelo e não de laranja doce ou azeda e o segundo foi patogênico em folhas de pomelo e laranja azeda e não de laranja doce, mas apenas às frutas desta última variedade. Também não houve correspondência com o *Sphaceloma fawcettii* (JENKINS, 1931) ou *E. fawcettii* (BITANCOURT & JENKINS, 1937a), o qual foi descrito como patogênico principalmente sobre laranja azeda e também limão Cravo, Rugoso e pomelo, mas não laranja doce.

Estes resultados, juntamente com os testes de patogenicidade feitos por BITANCOURT e JENKINS (1937a) onde *E. fawcettii* era considerado bastante virulento sobre laranja azeda no Brasil, comparados à recente dificuldade de observação deste em laranja azeda, e *E. australis* não causava sintomas em laranja azeda, comparado à constatação na mesma época, deste último patógeno sobre laranja azeda na Argentina (BITANCOURT, 1936b) e ainda à perda de resistência do pomelo em Trinidad observada por BAKER (1938), aliados à regionalização e crescente uso de determinadas variedades de plantas cítricas, reforçam a possibilidade do fungo sofrer variações ou mutações na patogenicidade com relativa facilidade, adaptando-se às variedades locais existentes, como já se referia BAKER (1938) e mais recentemente ZEIGLER & LOZANO (1983) embora trabalhando com outras espécies de *Elsinoe*.

Por *E. fawcettii* sempre ser patogênico ao limão

Cravo e limão Rugoso (JENKINS, 1931; BITANCOURT e JENKINS, 1937a; WHITESIDE, 1978), e nem sempre a laranja azeda (WHITESIDE, 1978), somado aos resultados dos testes de patogenicidade deste trabalho e às recentes evidências, nas nossas condições, da importância de um aparentemente novo biótipo de *E. fawcettii*, ausente em laranja azeda, sugere-se que o nome da doença causada atualmente por esta espécie no Brasil, em vez de verrugose da laranja azeda, passe a ser verrugose dos limões. Com relação a *E. australis*, pela sua constatação em laranja azeda e pela grande importância das laranjas entre os citros, acredita-se ser conveniente que o nome da doença passe a ser verrugose das laranjas.

Por este trabalho foram confirmadas e também identificadas diversas características inerentes a cada uma das espécies. Através destas características foi possível a distinção das duas espécies do fungo. Apenas duas delas: a cor das colônias cultivadas a 25°C no escuro e o teste de patogenicidade em limão Cravo se mostraram confiáveis para serem usados individualmente na caracterização das espécies. Estas características foram suficientes para a identificação de um isolado independentemente dos demais. As outras diferenças, como na morfologia de conídios, taxa de esporulação e crescimento de colônias a 32°C, são características quantitativas e portanto mais sujeitas a pequenas variações; e por terem apresentado limites de separação bastante próximos são úteis apenas na comparação de isolados e servem como

auxiliares na identificação das espécies.

6. CONCLUSÕES

1. *Elsinoe australis* e *E. fawcetti* podem ser distinguidos pela cor das colônias cultivadas no escuro a 25⁰C e pela inoculação em folhas de limão Cravo. As diferenças na morfologia dos conídios, capacidade de produção dos mesmos e taxa de crescimento da colônia a temperatura de 32⁰C colaboram para a caracterização das espécies.
2. *Elsinoe australis* foi encontrado associado a laranjas, tangerinas, lima ácida e tangor Murcote, enquanto que *E. fawcetti* a limões. Nenhum isolado de *E. fawcetti* foi encontrado em laranja doce.
3. Esporulação de *E. australis* só foi conseguida pela modificação do método convencional para *E. fawcetti*; substituindo substrato água por suspensão de fubã. Essa modificação melhora também a esporulação de *E. fawcetti*.
4. Apenas *E. fawcetti* causou lesões típicas de verrugose, sobre seus hospedeiros congeniais, em testes de inoculação de folhas destacadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO, A.A. Perspectivas da citricultura. *Laranja*, Cordeirópolis, 8: 365-377, 1987.
- BAKER, R.E.D. Citrus scab disease on grapefruit in Trinidad. *Tropical Agriculture*, Trinidad, 15(4): 77-79, 1938.
- BITANCOURT, A.A. *As manchas das laranjas*. São Paulo, 1934. 135p. (Instituto Biológico de Defesa Agrícola e Animal. Folheto, 53).
- BITANCOURT, A.A. A história da verrugose. *O Biológico*, São Paulo, 1(11): 391-397, 1935.
- BITANCOURT, A.A. & JENKINS, A.E. *Elsinoe fawcetti*, the perfect stage of the citrus scab fungus. *Phytopathology*, St. Paul, 26: 394-396, 1936a.
- BITANCOURT, A.A. & JENKINS, A.E. Perfect stage of the sweet orange fruit scab fungus. *Mycologia*, New York, 28(5): 489-492, 1936b.

- BITANCOURT, A.A. & JENKINS, A.E. Sweet orange fruit scab caused by *Elsinoe australis*. *Journal of Agricultural Research*, Washington, **54**(1): 1-18, 1937a.
- BITANCOURT, A.A. & JENKINS, A.E. Variações de *Elsinoe australis* Bitancourt e Jenkins. *Rodriguêsia*, São Paulo, 2, num. esp.: 315-317, 1937b.
- BITANCOURT, A.A. & JENKINS, A.E. Ciclo evolutivo de *Elsinoe australis* Bitancourt e Jenkins, agente da verrugose da laranja doce. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, **10**(7): 128-146, 1939.
- BRUN, J. Les scab des Agrumes. *Fruits d'outre mer*, **26**(11): 759-767, 1971.
- BUGNICOURT, F. & MARTY, J. *Champignons parasites des plantes cultivées en Nouvelle Calédonie*. Nouméa, Institut Français d'Océanie: 20p., 1961. Apud *Review of Plant Pathology*, Kew, **41**: 85, 1962 (Résumé).
- CHIAVEGATO, L.G. Novas descobertas sobre a disseminação da leprose. *Toda fruta*, São Paulo, **2**(12): 19, 1987.
- COBB, N.A. Grey scab of lemon. *Agricultural Gazette of New South Wales*, **6**: 865, 1895.

- CURRAH, L. & MAUDE, R.B. Laboratory tests for leaf resistance to *Botrytis squamosa* in onions. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 105: 277-283, 1984.
- DEDE, A.P.O. & VARMA, A. Citrus scab disease in Nigéria. *Journal of Horticultural Science*, London, 62(1): 111-116, 1987.
- DINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Inoculations of detached plant parts. In: _____. *Basic Plant Pathology Methods*, Boca Raton, CRC Press, 1985. p.161-163.
- EMECHEBE, A.M. Scab disease of cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by a species of the fungus *Sphaceloma*. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 96(1): 11-16, 1980.
- FAWCETT, H.S. Some relations of temperature to growth and infection in the citrus-scab fungus *Cladosporium citri*. *Journal of Agricultural Research*, Washington, 21(4): 243-253, 1921.
- FAWCETT, H.S. & BITANCOURT, A.A. Observações sobre as doenças dos citrus no Paraguai. *Biológico*, São Paulo, 6(10): 289-296, 1940.
- FEICHTENBERGER, E.; ESKES, A.B.; PRATES, H.S.; SABATINI, V. Resultados de experimentos recentes sobre o controle de verrugose e melanose dos citros. *Laranja*, Cordeirópolis,

7: 173-208, 1986.

GARDNER, D.E. & HUDGES Jr., C.S. Hawaiian forest fungi VII.

A new species of *Elsinoe* on native vaccinium. *Mycologia*, New York, 78(3): 506-508, 1986.

INOUE, K.; IGUCHI, I.; HARA, S.; TAKEDA, Y. Resistance of citrus nucellar seedlings and seedlings of citrus crosses to scab (*Elsinoe fawcetti* Bitanc. e Jenkins). *Bulletin of the Shizuoka Prefectural Citrus Experiment Station*, Shimizu-shi, 21, 27-33, 1985.

JENKINS, A.E. Development of the citrus-scab organism, *Sphaceloma fawcetti*. *Journal of Agricultural Research*, Washington, 42(9): 545-558, 1931.

JENKINS, A.E. A *Sphaceloma* attacking navel orange from Brasil. *Phytopathology*, St. Paul, 23: 538-545, 1933.

JENKINS, A.E. Australian citrus scab caused by *Sphaceloma fawcetti scabiosa*. *Phytopathology*, St. Paul, 26: 195-197, 1936.

JENKINS, A.E. & BITANCOURT, A.A. History of *Elsinoe fawcetti*, the causal fungus of citrus scab. *Phytopathology*, St. Paul, 27: 954-955, 1937.

- JENKINS, A.E. & BITANCOURT, A.A. Ilustrações das doenças causadas por *Elsinoe* e *Sphaceloma* conhecidas na América do Sul até janeiro de 1936. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, **10**: 31-60, 1939.
- JOTANI, Y. On the scab of the 'Kindzu' or 'Golden bean' orange plant. *J. Jap. Bot.*, **32**(3): 92-95, 1957. Apud *Review of Plant Pathology*, Kew, **37**: 165, 1958. (Resumo).
- KIMATI, H. & GALLI, F. Doenças dos citros - *Citrus* spp. In: GALLI, F., coord. *Manual de Fitopatologia*. 4 ed., São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1980, v.2, p.213-235.
- KUCHAREK, T. & WITESIDE, J. Citrus scab. Dean. *Institute of Food and Agricultural Science*, s.d. 3p. (Plant Pathology Fact Sheet, 28).
- KRUPINSKY, J.M. Pathogenicity on wheat of *Pyrenophora tritici repentis* isolated from *Bromus inermis*. *Phytopathology*, St. Paul, **77**(5): 760-765, 1987.
- LIST of Intercepted Plant Pests, 1954, S.R.A. Bur. Ent., Washington, 61p., 1955. Apud *Review of Plant Pathology*, Kew, **35**: 544, 1956. (Resumo).
- LUKE, H.H. & WHEELER, H.E. Toxin production by *Helminthosporium victoriae*. *Phytopathology*, St. Paul, **45**(8): 453-458, 1955.

- MCCLEERY, F.C. Lemon scab and its control. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 41(1): 27-30, 1930.
- OXENHAM, B.L. Citrus diseases in Queensland. 1. *Queensland Agricultural Journal*, 87(2): 71-77, 1961.
- PANINGBATAN, R.A. Infectivity and *in vitro* production of sweet potato scab fungus (*Sphaceloma batatas* Saw.) inoculum. *Annals of Tropical Research*, Baybay, 9(1): 24-33, 1987.
- PELTIER, G.L. & FREDERICH, W.J. Relation of environmental factors to citrus scab caused by *Cladosporium citri* Massee. *Journal of Agricultural Research*, Washington, 28(3): 241-254, 1924.
- PELTIER, G.L. & FREDERICH, W.J. Relative susceptibility of citrus fruits and hybrids to *Cladosporium citri* Massee. *Journal of Agricultural Research*, Washington, 24(2): 955-959, 1923.
- REDDY, M.R.S.; NAIDU, P.H.; REDDY, G.S. Screening Rough lemon and Rangpur lime strains for resistance to citrus scab. *Current Science*, Bangalore, 55(3): 152-153, 1986.
- RIBEIRO, I.J.A.; MORAES, S.A.; PARADELA Filho, O.; SUGIMORI, M.H.; SOAVE, J. Testes de patogenicidade de isolados de *Cercospora arachidicola* Hori, *Cercospora personata* (B

- e C) Ell. e Ev. e *Puccinia arachidis* Speg em folhas destacadas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, 9: 20, 1976. (Resumo).
- ROSSETTI, V.V. Doenças dos citros. In: RODRIGUES, O. e VIÉGAS, F. coord. *Citricultura Brasileira*, Campinas, Fundação Cargill, 1980, v.2., p.517-563.
- SIVANESAN, A. Myriangiales. In: _____. *The Bitunicate Ascomycetes and their Anamorphs*, Vaduz, J. Cramer, 1984, p.329-338.
- SIVANESAN, A. & CRITCHETT, C. *Elsinoe australis*, CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, Kew, 440, 2p. 1974a.
- SIVANESAN, A. & CRITCHETT, C. *Elsinoe fawcetti*, CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, Kew, 438, 2p. 1974b.
- SIVANESAN, A. & CRITCHETT, C. *Sphaceloma fawcetti* var. *scabiosa*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, Kew, 437, 2p., 1974c.
- SRIDHAR, T.S. & ULLASA, B.A. Scab of *Ocimum basilicum* a new disease caused by *Elsinoe arxii* sp. nov. from Bangalore. *Current Science*, India, 48(19): 868-869, 1979.

- SUTTON, B.C. Coelomycetes. In: AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K. e SUSSMAN, A.S. In: The Fungi. New York, Academic Press, 1973. v. IV A, 621p.
- SUTTON, B.C. *The Coelomycetes* - Fungi Imperfect with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1980. 695p.
- TAVARES, A. Aspectos gerais sobre a exportação de frutas para o hemisfério Norte. *Laranja*, Cordeirópolis, 8: 345-364, 1987.
- TEÓFILO Sobrinho, J. & FIGUEIREDO, J.O. Diversificação do uso de porta-enxertos na citricultura paulista. *Laranja*, Cordeirópolis, 5: 403-417, 1984.
- TUITE, J. *Plant Pathological Methods*; Fungi and Bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1969. 239p.
- WARD, C.H. The detached-leaf technique for testing alfalfa clones for resistance to black stem. *Phytopathology*, St. Paul, 49(10): 690-696, 1959.
- WHITESIDE, J.O. Biological characteristics of *Elsinoe fawcettii* pertaining to the epidemiology of sour orange scab. *Phytopathology*, St. Paul, 65(10): 1170-1175, 1975.

- WHITESIDE, J.O. Pathogenicity of two biotypes of *Elsinoe fawcettii* to sweet orange and some other cultivars. *Phytopathology*, St. Paul, 68(8): 1128-1131, 1978.
- WHITESIDE, J.O. Infection of sweet orange fruit in Florida by a common biotype of *Elsinoe fawcettii*. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, Lake Alfred, 1(2): 343-346, 1984.
- WHITESIDE, J.O. Semiselective media for the isolation of *Elsinoe fawcettii* from citrus scab pustules. *Plant Disease*, Washington, 70(3): 204-206, 1986.
- WHITESIDE, J.O. Factors contributing to the rare occurrence of scab on sweet orange in Florida. *Plant Disease*, Washington, 72(7): 626-628, 1988.
- WILCOXSON, R.D.; ATIF, A.H.; SKOVMAND, B. Slow rusting of wheat varieties in the field correlated with stem rust severity on detached leaves in the greenhouse. *Plant Disease Reporter*, Washington, 58(12): 1085-1087, 1974.
- WINSTON, J.R. *Citrus scab: its cause and control*, Washington, USDA, 1923. 38p. (United States Department of Agriculture. Bulletin, 1118).
- ZANIN, A.J. A necessidade de controle dos ácaros. *Correio Agrícola*, São Paulo, 2: 2-5, 1988.

ZEIGLER, R.S. & LOZANO, J.C. The relationship of some *Elsinoe* and *Sphaceloma* species pathogenic on cassava and other *Euphorbiaceae* in Central and South America. *Phytopathology*, St. Paul, 73(2): 293-300, 1983.