

**QUEDA PREMATURA DOS FRUTOS CÍTRICOS:
CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL,
Colletotrichum gloeosporioides PENZ. [SENSU ARX, 1957], E
CONTROLE DA DOENÇA**

**ANTONIO DE GOES
Engenheiro Agrônomo**

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

**Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Agronomia, Área de concentração:
Fitopatologia.**

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1995**

Dados internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Divisão de Biblioteca e Documentação - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Goes, Antonio de

Queda prematura dos frutos cítricos: caracterização do agente causal, Colletotrichum gloeosporioides PENZ. [SENSU ARX, 1957], e controle da doença. Piracicaba, 1995.
143p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Fruta cítrica - Doença 2. Fungo fitopatogênico 3. Queda prematura de frutos cítricos - Controle I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.3

**À minha esposa,
Marilene.
Aos nossos filhos,
Milena ,
Gustavo e
Liz,**

DEDICO

**Aos meus pais, Egydio, “in memorian”, e Lazineha,
pelos nobres ensinamentos.**

**À colega e amiga Lianna, “in memorian”, pelo
exemplo de companheirismo e dedicação**

Àqueles que não tiveram oportunidade.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, pela amizade, incentivo permanente, orientação dedicada e pelo exemplo de figura humana.
- À Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro-PESAGRO-RIO, pela oportunidade.
- À USP por todas as facilidades concedidas.
- Aos Prof. do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pelos ensinamentos, colaboração e amizade.
- Ao Prof. Dr. L.W. Timmer, da University of Florida, Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, pela cessão dos isolados.
- Às empresas Irmãos Roque Ltda. e Sete Lagoas, pela cessão de áreas e apoio na implantação e condução dos experimentos.
- À Erna E. Bach, pesquisadora do Instituto Biológico de São Paulo, pela colaboração nos trabalhos de eletroforese.
- Ao Prof. Carlos Tadeu dos Santos Dias, da UNESP/Botucatu, pelo auxílio na realização nas análises estatísticas.

- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, especialmente à Fernanda e Rodolfo, pelo convívio, apoio e amizade.

- Aos amigos Julio César, Pimentel e Prof. Hasime Tokeshi pela amizade e sugestões.

- Aos colegas do Curso de pós-graduação em Fitopatologia da ESALQ/USP, em especial à Kátia, José Renato, Everaldo, Marcos Galli, Zilton, Edson Furtado, Marise e Rosa Maria, pelo convívio, apoio e amizade.

- À Maria Célia Rodrigues pela digitação deste e outros trabalhos pertinentes e, também, pela amizade.

- Destaco também a convivência amiga dos colegas Evelyn, Gisèle, Raquel e Paulo Chagas, cuja companhia e amizade tornaram esta tarefa consideravelmente menos árdua e mais reconfortante.

- A todos aqueles que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Histórico da doença.....	3
2.2. Taxonomia e nomenclatura do gênero <i>Colletotrichum</i>	5
2.3. Diversidade genética do patógeno.....	8
2.4. Caracterização taxonômica de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> associado a plantas cítricas.....	10
2.4.1. Caracterização morfológica.....	10
2.4.2. Caracterização eletroforética.....	11
2.5. Controle da doença.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Obtenção e conservação dos isolados.....	16
3.2. Experimentos realizados.....	19
3.2.1. Caracterização patogênica de vários isolados de <i>C. gloeosporioides</i> , em flores de laranja ‘Pera’ em casa de vegetação.....	19
3.2.1.1. Avaliação da capacidade patogênica de vários isolados de <i>C. gloeosporioides</i> em flores de laranja ‘Pera’ em casa-de-vegetação.....	19

3.2.1.2. Avaliação comparativa de níveis de severidade da QPFC na retenção de frutos de laranja ‘Valência’	22
3.2.2. Caracterização morfológica de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	23
3.2.2.1. Caracterização morfológica dos conídios.....	23
3.2.2.2. Caracterização morfológica dos apressórios.....	25
3.2.3. Caracterização eletroforética de diferentes isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	27
3.2.4. Efeito da temperatura no crescimento micelial de diversos isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	33
3.2.5. Efeito de fungicidas na sensibilidade de <i>C. gloeosporioides</i> sob condições <i>in vitro</i>	34
3.2.5.1. Efeito de doses crescentes de benomyl no crescimento micelial e esporulação de diversos isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	34
3.2.5.2. Efeito da utilização de benomyl em condições de campo, na sensibilidade de populações residuais de <i>C. gloeosporioides</i>	37
3.2.5.3. Efeito de doses crescentes de fungicidas pertencentes a diferentes grupos químicos no crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i>	38
3.2.6. Efeito de fungicidas no controle de <i>C. gloeosporioides</i> sob condições de campo.....	39
3.2.6.1. Efeito de fungicida pertencentes a diferentes grupos químicos no controle de <i>C. gloeosporioides</i>	39
3.2.6.2. Efeito de benomyl associado a diferentes fertilizantes no controle de <i>C. gloeosporioides</i>	43

3.2.6.3. Efeito de benomyl associado a óleo mineral e espalhantes adesivos, no controle de <i>C. gloeosporioides</i>	
4. RESULTADOS.....	47
4.1. Caracterização patogênica de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	47
4.1.1. Caracterização patogênica de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	47
4.1.2. Avaliação comparativa de diferentes níveis de severidade da QPFC na retenção de cálices e de frutos de laranja ‘Valência’.....	50
4.2. Caracterização morfológica de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	53
4.2.1. Características morfológicas de conídios e apressórios de isolado de <i>C. gloeosporioides</i>	53
4.3. Caracterização eletroforética de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	58
4.4. Efeito da temperatura no crescimento micelial de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	61
4.5. Controle de <i>C. gloeosporioides</i>	69
4.5.1. Sensibilidade de <i>C. gloeosporioides</i> in vitro.....	69
4.5.1.1. Avaliação do efeito de diferentes concentrações de benomyl no crescimento micelial de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG.....	69
4.5.1.2. Efeito de benomyl em doses crescentes na inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	74
4.5.1.3. Efeito de benomyl na esporulação de isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	76

4.5.1.4. Efeito de doses crescentes de benomyl no crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i> obtidos de pomares com históricos diferentes quanto à utilização daquele fungicida.....	78
4.5.1.5. Eficiência de fungicidas pertencentes a diferentes grupos químicos na inibição de <i>C. gloeosporioides</i>	80
4.5.2. Efeito de diversos fungicidas no controle de <i>C. gloeosporioides</i> em pomares.....	88
4.5.2.1. Efeito de diversos fungicidas no controle de <i>C. gloeosporioides</i> em plantas de laranja 'Folha Murcha'	88
4.5.2.2. Efeito de benomyl associado a diversos fertilizantes no controle de <i>C. gloeosporioides</i>	90
4.5.2.3. Efeito de benomyl aplicado isoladamente ou associado a óleo mineral e espalhantes adesivos no controle de <i>C. gloeosporioides</i>	93
5. DISCUSSÃO.....	96
5.1 Caracterização patogênica e morfológica de isolados <i>C. gloeosporioides</i> ...	96
5.2. Caracterização eletroforética e respostas à temperatura.....	103
5.3. Controle de <i>C. gloeosporioides</i>	106
6 CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Diagrama dos perfis eletroforéticos de esterase e mobilidade relativa (R _m) de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes aos grupos SGO (LA2, LA3, LA5, LA7, LA8), KLA (LI23, LI24) e FGG (SE26, SE29, SE30).....	59
Figura 2 - Diagrama densitométrico (540 nm) do padrão de esterase dos isolados pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG.....	62
Figura 3 - Crescimento micelial de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes ao grupo SGO sob diferentes temperaturas.....	65
Figura 4 - Crescimento micelial de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes ao grupo KLA sob diferentes temperaturas.....	66
Figura 5 - Crescimento micelial de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes ao grupo FGG sob diferentes temperaturas.....	67
Figura 6 - Comparação do crescimento micelial de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG, sob diferentes temperaturas.....	68
Figura 7 - Crescimento micelial de quatro isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes ao grupo SGO em diferentes doses de benomyl.....	72

Figura 8 - Crescimento micelial de dois isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes ao grupo KLA em diferentes doses de benomyl.....	73
Figura 9 - Efeito de doses crescentes de chlorothalonil na inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes ao grupo SGO.....	84
Figura 10 - Efeito de doses crescentes de folpet na inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes ao grupo SGO.....	85
Figura 11 - Efeito de doses crescentes de mancozeb na inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes ao grupo SGO.....	86

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Designação, procedência e características de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> utilizados na experimentação.....	18
Tabela 2 - Formulação e grupo químico de fungicidas avaliados quanto à inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	38
Tabela 3 - Características técnicas e doses de fungicidas avaliados no controle de <i>C. gloeosporioides</i> em condições de campo.....	40
Tabela 4 - Tratamentos e respectivas doses de benomyl fertilizantes utilizados em experimento sobre controle de <i>C. gloeosporioides</i>	44
Tabela 5 - Composição em i.a. e doses de fungicida, óleo mineral e espalhantes adesivos avaliados no controle de <i>C. gloeosporioides</i>	45
Tabela 6 - Características químicas do óleo mineral e espalhantes adesivos utilizado utilizado em experimento de controle de <i>C. gloeosporioides</i>	46
Tabela 7 - Patogenicidade de doze isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG em flores de laranja ‘Pêra’ sob condições de casa-de-vegetação.....	48

Tabela 8 -	Retenção de cálices e de frutos de laranja ‘Valência’ em função de diferentes níveis de severidade da QPFC em botões florais e em flores abertas sob condições de infecção natural.....	52
Tabela 9 -	Comprimento, largura e relação comprimento/largura de conídios de vários isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes aos grupos SGO, KLA, FGG.....	54
Tabela10 -	Comprimento, largura, relação comprimento/largura e formato predominante de apressórios de isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes aos grupos SGO, KLA, FGG.....	57
Tabela 11-	Tamanho de colônias (mm) de sete isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG, em diferentes temperaturas, após 120 h de incubação.....	63
Tabela 12 -	Efeito de diferentes doses de benomyl no tamanho de colônias de oito isolados de <i>C. gloeosporioides</i> pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG, após 72 h de incubação.....	70
Tabela 13 -	Inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i> sob diferentes concentrações de benomyl após 72 h de incubação.....	75
Tabela 14 -	Efeito de doses de benomyl na esporulação de dez isolados de <i>C. gloeosporioides</i> após 102 h de incubação.....	77

Tabela 15 - Efeito de doses de benomyl na inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i> obtidos de pomares com históricos diferentes quanto à utilização daquele fungicida.....	79
Tabela 16 - Inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i> a diferentes doses de seis fungicidas após 96 h de incubação.....	81
Tabela 17 - ED ₅₀ de seis fungicidas testados para a inibição do crescimento micelial de três isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	87
Tabela 18 - Efeito de vários fungicidas no número médio de frutos efetivos (NMFE) e na produção de laranja 'Folha Murcha', afetada pela QPFC, em condições de campo.....	89
Tabela 19 - Efeito de benomyl aplicado isoladamente ou associado a diferentes fertilizantes no número médio de frutos efetivos (NMFE) e na produção de laranja 'Folha Murcha', afetada pela QPFC, em condições de campo.....	91
Tabela 20 - Efeito de benomyl aplicado isoladamente ou associado a óleo mineral ou espalhante adesivo no número médio de frutos efetivos (NMFE) e na produção de laranja 'Folha Murcha', afetada pela QPFC, em condições de campo.....	94

**QUEDA PREMATURA DOS FRUTOS CÍTRICOS:
CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL,
Colletotrichum gloeosporioides PENZ. [SENSU ARX, 1957], E
CONTROLE DA DOENÇA**

Autor: Antonio de Goes

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Características culturais, morfológicas e patogênicas de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, de plantas cítricas de várias regiões do Brasil, permitiram incluí-los nos grupos SGO (“slow-growing orange”), KLA (“key lime anthracnose”) e FGG (“fast-growing gray”), anteriormente descritos. Isolados dos grupos SGO e KLA apresentam conídios e apressórios menores do que os do grupo FGG. Os apressórios são predominantemente clavados, em SGO, arredondados em KLA e lobulados em FGG. Somente isolados dos grupos SGO e KLA reproduziram sintomas típicos da queda prematura dos frutos cítricos (QPFC) em plantas de laranja ‘Pêra’, floridas, em casa-de-vegetação.

Além desses resultados, análises do padrão de bandas de esterase permitiram distinguir os três grupos: o grupo SGO apresenta uma banda específica, de RM 3,9 - 4,1 e o grupo FGG, outra de RM 4,2 - 4,7. Determinações do ótimo de

temperatura para crescimento micelial, em BDA, mostraram que isolados dos grupos SGO e KLA são favorecidos por temperaturas de 22 a 25°C e os do FGG por 25 a 28°C. Análises da sensibilidade dos isolados a benomyl evidenciaram que os do grupo FGG são altamente sensíveis, mostrando-se inibidos a 1 µg/ml, enquanto os dos grupos SGO e KLA continuam a se desenvolver, ainda que contidamente, mesmo em altas concentrações do princípio ativo em meio de cultura.

Através de experimentos realizados em condições de campo foi verificado que a QPFC pode ser eficazmente controlada através da aplicação de benomyl, carbendazim ou tiofanato metílico em dois estádios de florescimento: “cabeça de fósforo” e “cotonete”. A associação de benomyl com adubos foliares ou espalhantes adesivos não alterou a eficiência que foi, inclusive, melhorada com o emprego de nitrato de potássio e Aterbane BR^R. Outros fungicidas que também se mostraram eficientes em testes *in vitro* e em condições de campo foram prochloraz e tebuconazole.

**CITRUS POSTBLOOM FRUIT DROP:
CHARACTERIZATION OF THE CAUSAL AGENT,
Colletotrichum gloeosporioides PENZ. [SENSU ARX, 1957],
AND DISEASE CONTROL**

Author: ANTONIO DE GOES

Adviser: PROF. DR. HIROSHI KIMATI

SUMMARY

Cultural, morphological and pathogenic characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from citrus plants from various regions of Brazil permitted them to be included in previously described groups, which are SGO (slow-growing orange), KLA (key lime anthracnose) and FGG (fast-growing gray). Isolates of groups SGO and KLA show are smaller conidia and appressoria than those of group FGG. The appressoria are predominantly clavate in group SGO, rounded in KLA and lobulate in FGG. Only isolates of groups SGO and KLA reproduced typical symptoms of the postbloom fruit drop (PFD) in blossomed plants of 'Pêra' orange (*Citrus sinensis*) in greenhouse.

Analysis of the esterase band patterns of the isolates permitted the distinction among groups: SGO shows a specific band of Rm 3.9-4.1 whereas FGG shows another one, of Rm 4.2-4.7. Optimum temperatures for mycelial growth in PDA

were 22-25 °C for isolates of groups SGO and KLA, and 25-28 °C for those of group FGG.

Sensitivity analysis of isolates showed that those of groups FGG are highly sensitive to benomyl, being inhibited at 1 µg/ml, whereas those of groups SGO and KLA are able to grow to some extent, even at high concentrations of the active ingredient in the culture medium.

Field trials indicated that PFD can be efficiently controlled through the application of benomyl, carbendazim or methyl thiophanate in two flowering stages: pinhead to round bud and elongating bud. The association of benomyl with foliar fertilization or adjuvants did not reduce its efficiency, which was actually improved when potassium nitrate and Aterbane BR^R were used. Prochloraz and tebuconazole also proved efficient against the pathogen in tests conducted both *in vitro* and in the field.

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência da queda prematura dos frutos cítricos, QPFC, até recentes anos restringia-se a Belize, América Central e, passado alguns anos, era assinalada em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais úmidas das Américas (TIMMER et al., 1994). No Brasil, esta doença ocorre praticamente em todas as regiões produtoras de citros, com prejuízos, em algumas áreas, de mais de 80% da produção. Para o estado de São Paulo, a incidência da doença na florada de primavera de 1993 e do início de 1994, foi de cerca de 35 - 40%, em pomares de 'Natal', 'Valência' e 'Pêra Rio', com mais de sete anos. A estimativa de quebra de produção para aquele período foi de 10 - 15%, para a 'Pêra Rio' e, de 18 - 20% para as demais variedades (PRATES et al., 1995).

A QPFC atinge, praticamente, todas as variedades de laranjas doces e limas-ácidas e se caracteriza pela presença de botões florais de coloração marrom ou de lesões de coloração pêssego ou alaranjada sobre as pétalas de flores abertas. Os botões florais, quando severamente afetados, caem, enquanto as pétalas infectadas rapidamente tornam-se marrons e ressecadas, mantendo-se freqüentemente aderidas, por várias semanas, sobre os frutinhos eventualmente formados (FAGAN, 1979). Os frutos originados de flores infectadas tornam-se descoloridos, mudando de sua cor verde normal para verde-oliva ou marrom claro. Sua abscisão dá-se, normalmente, 1 a 4 semanas após,

permanecendo o cálice e o disco floral aderidos, o que distingue a doença da queda fisiológica normal.

Freqüentemente, várias formas de *Colletotrichum gloeosporioides* têm sido isoladas de plantas cítricas e, desde os estudos taxonômicos realizados por ARX (1957), todas aquelas formas encontram-se inseridas em uma única espécie, não obstante a sua diversidade genética. As conclusões de ARX (1957) foram, no entanto, refutadas por SUTTON (1962, 1966) o qual, após estudos realizados em várias espécies, assinalou que aquelas descrições foram feitas, de certa forma, arbitrariamente, porque não se basearam em um adequado exame ou citação do material tipo e, também, não foram estabelecidas em função da biologia das espécies analisadas.

No Brasil, embora várias formas de *C. gloeosporioides* tenham também sido freqüentemente verificadas em associação com plantas cítricas, os trabalhos conduzidos até o momento têm-se restringido, apenas, a ressaltar a constatação, importância e, eventualmente, o controle das doenças ocasionadas por aquelas linhagens. Assim, em razão dessas limitações, propõe-se, como objetivo do presente trabalho, a realização de estudos morfológicos e patogênicos daquelas várias formas de *C. gloeosporioides*. Acresce-se a isto, avaliação de fungicidas *in vitro* e em condições de campo, com vistas à busca de novas alternativas de controle da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da doença

O primeiro relato sobre o envolvimento de fungos do gênero *Colletotrichum* Corda associado a plantas cítricas data de 1886, segundo Underwood¹, (citado por BURGER, 1921), em pomares cítricos da Flórida, Estados Unidos. Posteriormente, em 1904, Rolfs², também citado por aquele autor, descreveu de forma detalhada, sintomas e características morfológicas daquele fungo, supostamente admitido como *Colletotrichum*, em várias espécies cítricas, na Flórida. Entretanto, não obstante a descrição detalhada feita por Rolfs, a taxonomia daquele fungo foi refutada por CLAUSEN (1912), que o designou *Gloeosporium limetticolum* em razão da ausência de setas, que o distinguíam, portanto, de *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Segundo CLAUSEN (1912), Rolfs havia confundido, descrevendo uma única espécie quando, na realidade, haviam duas.

Nos anos subseqüentes, independente de controvérsias existentes quanto à taxonomia de *C. gloeosporioides* e *G. limetticolum*, ambos passaram a ser citados com

¹ Underwood, L.M. Diseases of the orange in Flórida. *Journal of Mycology*, 7(2):27-36, 1891.

² Rolfs, P.H. Wither-tip, and other diseases of citrus trees and fruits caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. U.S. Dept. Agr. Bur. Plant Indus. Bull. 52, 20p. 1904.

freqüência, em associação a plantas cítricas (FULTON, 1925; FAWCETT, 1936), embora a atividade parasítica deste estivesse sempre ressaltada em detrimento das características de invasor secundário de *C. gloeosporioides*. Esta situação se manteve de certa forma inalterada até a década de 50 quando foi noticiada, pela primeira vez, a ocorrência da doença “queda prematura dos frutos cítricos”.

A queda prematura dos frutos cítricos, QPFC, foi verificada pela primeira vez em 1956/57 em Belize, América Central, infectando principalmente laranjeiras ‘Valência’ (FAGAN, 1972). Posteriormente, várias publicações se sucederam reportando sua presença naquela região, inclusive ocasionando prejuízos progressivamente mais significativos (FAGAN, 1971). Embora a doença tenha adquirido importância cada vez mais relevante, a caracterização e descrição do agente causal deu-se, efetivamente, por FAGAN em 1979. Atualmente, ocorre praticamente em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo já assinalada na Argentina (SCHWARZ et al., 1978); Brasil (PORTO et al., 1979), Colômbia e Panamá (FAGAN, 1979), República Dominicana (DENHAM, 1979), Trinidad (FAGAN, 1984), México (OROZCO SANTOS & GONZALES GARZA, 1986), Estados Unidos (McMILLAN Jr. & TIMMER, 1989), Costa Rica e Jamaica (TIMMER et al., 1994).

No Brasil, os primeiros relatos sobre sua ocorrência foram feitos por DORNELLES (1977) e PORTO et al. (1979), no Rio Grande do Sul. Neste mesmo período, perdas significativas foram também noticiadas na safra de 1977/78 em muitos pomares do estado de São Paulo, principalmente nas regiões de Limeira, Araraquara, Taquaritinga e Cândido Rodrigues (FEICHTENBERGER, 1991) e também no estado de

Sergipe (SOUZA FILHO et al., 1979). Atualmente a doença ocorre praticamente em todos os municípios do estado de São Paulo e nos demais estados produtores de citros incluindo-se Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Amazonas, com níveis de prejuízos variáveis.

Embora seja reconhecida a importância dessa doença, os estudos realizados no Brasil têm sido muito restritos e, na maioria das vezes, limitaram-se a evidenciar sua ocorrência e ressaltar sua importância, tornando-se imprescindível a realização de estudos complementares que contemplem especialmente aspectos etiológicos e de controle do agente causal.

2.2. Taxonomia e nomenclatura do gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* foi descrito por Corda³, em 1831-1832, tendo como espécie tipo o fungo *C. lineolum* Corda (ARX, 1957) o qual, devido à produção de conídios em acérvulos fora incluído por Saccardo⁴, em 1884, na ordem Melanconiales (ALEXOPOULOS, 1979). Segundo ARX (1957), Saccardo acreditava que aquele fungo era a forma jovem de *Vermicularia*. Posteriormente, muitas outras espécies foram definidas e, devido à semelhança das características morfológicas, foram também incluídas naquela espécie.

Nos anos seguintes, muitos problemas relacionados à distinção entre *Vermicularia* Tode ex Fries e *Colletotrichum* foram apontados na literatura (WILSON,

³ Corda, A.C. Sturm's Deutschlands Kryptogamen Flora, Nürnberg, vol.3, 1831-1832.

⁴ Saccardo, P.A. Sylloge fungorum, vol.III, 1894.

1914; DICKSON, 1925). Segundo DUKE (1928), ambos os gêneros eram congêneres e, por isso, deveria ser mantido o nome *Colletotrichum*. No entanto, Wollenwebber & Hochapfel (1949)⁵, (citados por ARX, 1957), mantiveram os dois gêneros, sendo que aqueles que possuíam conídios recurvados foram incluídos em *Vermicularia* e os de conídios retos, em *Colletotrichum*. Entretanto, de acordo com ARX (1957), o procedimento foi realizado arbitrariamente, uma vez que a espécie tipo de ambos apresentava conídios recurvados.

O gênero *Gloeosporium* Desm. & Mont. foi descrito pela primeira vez em 1849, sendo *G. castagnei* Desm. & Mont. reconhecida como espécie tipo e caracterizava-se, primordialmente, pela ausência de setas (BAXTER et al., 1985) enquanto as demais características eram semelhantes às do gênero *Colletotrichum*. Entretanto, a produção de setas por aquele fungo em determinados substratos trouxe, segundo aqueles pesquisadores, mais complicações para a distinção dos gêneros *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloeosporium*. Com isso, até 1957, a bibliografia já acumulava vários registros onde eram destacados a impossibilidade da separação entre *Colletotrichum* e *Vermicularia* (WILSON, 1914; DICKSON, 1925; DUKE, 1928) e *Colletotrichum* e *Gloeosporium* (TAUBENHAUS, 1911; SMALL, 1926; BAKER et al., 1940; TIFFANY & GILMAN, 1954).

No intuito de superar as dificuldades e divergências quanto à taxonomia do gênero *Colletotrichum* e afins, foram conseguidos avanços significativos por ARX (1957), o qual, mediante estudos de características morfológicas e especializações nos

⁵ Wollenwebber, H.W. & Hochapfel, H. Beiträge zur Kenntnis parasitärer und saprophytischer Pilze, Vi, C.14, 181-268, 1949.

hospedeiros, reduziu as várias centenas de *taxa* descritas, para apenas 13 espécies aceitas. Igualmente, as 288 espécies de *Gloeosporium* inicialmente descritas foram revisadas e incluídas naquelas 13 espécies de *Colletotrichum*, uma vez que muitas espécies citadas nos gêneros *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloeosporium* pertenciam ao mesmo gênero. A proposição de DUKE (1928) tornou-se referendada, mantendo-se o nome *Colletotrichum*, não obstante a prioridade do nome *Vermicularia*. Dada a heterogeneidade morfológica, o gênero *Gloeosporium* foi rejeitado.

Estudos taxonômicos complementares utilizando critérios convencionais como forma e tamanho de conídios, características de colônias, presença de escleródios, morfologia do apressório e especificidade ao hospedeiro, foram também realizados por SUTTON (1980), que manteve 15 das 23 *taxa* citadas por ARX (1957), excluindo-se 8 espécies anteriormente listadas e incluindo 7 espécies não mencionadas anteriormente, mantendo-se a rejeição ao gênero *Gloeosporium*. Atualmente se “aceita” a existência de 39 *taxa* (SUTTON, 1992).

Independente das alterações até agora ocorridas, *Glomerella cingulata* Stonem. Spauld & Schrenk tem-se mantida como o estágio teleomórfico dos diversos estados conidiais de *Colletotrichum*. Porém, mediante aplicação de técnicas experimentais tem-se verificado que este estágio contempla, na verdade, mais de uma espécie (SHERRIF et al., 1994), existindo também biótipos com elevado nível de especialização fisiológica (HAYDEN et al., 1994).

2.3. Diversidade genética do patógeno

Os fungos do gênero *Colletotrichum* produzem, de um modo geral, sintomas conhecidos como antracnose em frutos, ramos, caules e folhas de um grande número de plantas hospedeiras (ARX, 1957). São verificados também, seca de ponteiros, podridão de raízes, manchas foliares e necrose em flores e em “seedlings”. Considerado um fungo cosmopolita, atinge dezenas de famílias e centenas de espécies de plantas, compreendendo, dentre outras, fruteiras tropicais e subtropicais (SIMMONDS, 1965; KAJIWATA, 1986; ALVAREZ & NISHIJIMA, 1987; DARVAS & KOTZE, 1987; CAPPELLINI et al., 1988; DODD et al., 1989; JEFFRIES et al., 1990; McMILLAN Jr. & NARAYANAN, 1990; LUTCHMEAH & SANTCHURN, 1991; ADIKARAN et al., 1992; HOSSAIN & MEAH, 1992).

Em plantas cítricas, o fungo *Colletotrichum* ocasiona infecções em folhas, em ramos e em frutos em pré e pós-colheita (BURGER, 1921; FULTON, 1925; FAWCETT, 1936; SMOOTH & MELVIN, 1967; SMOOTH & MELVIN, 1972; BROWN, 1975; ULASSA & RAWAL, 1988; BABU & REDDY, 1989; RAMANJULU & REDDY, 1989_{a,b}; SINGH, 1989; NAQVI, 1993) e também em flores e frutos jovens, causando perdas significativas de produção (FAGAN, 1979; PORTO et al., 1979; McMILLAN Jr. & TIMMER, 1989).

Diversos estudos têm sido publicados sobre o polimorfismo de *C. gloeosporioides* associado a plantas cítricas. BURGER (1921), através do estudo de 46 culturas de *C. gloeosporioides* oriundas da Califórnia, Texas, Flórida e Alabama,

verificou a ocorrência de cinco grupos de linhagens, diferenciados por características culturais dos isolados e também pela dimensão dos conídios.

FAGAN (1980), estudando a patogenicidade, a taxa de crescimento sob diferentes temperaturas e as características culturais de diversos isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cálices, pétalas infectadas e acérvulos produzidos em folhas de plantas cítricas, constatou a ocorrência de três diferentes formas daquele fungo, sendo as duas primeiras não patogênicas às flores das plantas inoculadas, e, a outra, isolada de órgãos florais com sintomas da QPFC, patogenicamente positiva. Estudos similares foram também conduzidos por AGOSTINI et al. (1992) que descreveram a existência de três linhagens, designadas FGG (fast-growing gray), SGO (slow-growing orange) e KLA (key lime anthracnose). De acordo com aqueles pesquisadores, sintomas típicos da QPFC em flores de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e de 'lima da Pérsia' (*C. limettioides* Tanaka) foram obtidos mediante a inoculação dos isolados do tipo SGO e KLA. Outros trabalhos que também demonstraram a existência do polimorfismo no patossistema *C. gloeosporioides*-cítricos são as publicações de SONODA & PELOSI (1988) e LIYANAGE et al. (1992, 1993). De acordo com FAGAN (1980), foi evidenciado, também, que todas as linhagens estudadas apresentaram um ótimo crescimento em temperaturas na faixa de 23 a 27°C, embora os isolados do tipo FGG tenham crescido melhor a 31°C do que os isolados SGO e KLA.

2.4. Caracterização taxonômica de *Colletotrichum gloeosporioides* associado a plantas cítricas

2.4.1. Caracterização morfológica

De acordo com ARX (1957), a caracterização dos fungos mediante emprego de caracteres morfológicos foi efetivamente iniciada a partir do trabalho conduzido por Hammarlund⁶ (1945). A partir de então, os fungos deixaram de ser classificados segundo as plantas hospedeiras e substratos e a utilização da morfologia como caráter distintivo tornou-se uma prática rotineira na sua classificação.

Embora sejam reconhecidas as limitações no uso dos caracteres morfológicos para a sistemática e identificação de *taxa* abaixo do nível de espécies, especialmente no complexo *C. gloeosporioides*, eles se constituem na base para a separação de espécies ou grupos. Nesses casos, são empregados critérios convencionais que compreendem formato e tamanho dos conídios, presença e morfologia das setas e presença e características de escleródios e apressórios, combinados com a expressão de sintomas no hospedeiro (SUTTON, 1992).

Existem diversas citações referentes à utilização das características morfológicas visando a classificação de *Colletotrichum* a nível de espécies, grupos ou formas, envolvendo diversos hospedeiros (ARX, 1957; SIMMONDS, 1965; MORDUE, 1971; SUTTON, 1980; KIM et al., 1986; SMITH & BLACK, 1990; THIND &

⁶ Hammarlund, C. Beiträge zur Revision einiger imperfecten Mehltau-Arten. *Erysiphe polyphaga* nov. sp. *Bot. Notiser*, p.101-108, 1945.

JHOOTY, 1990; DAVIS et al., 1992; SUTTON, 1992; MUGNAI et al., 1993). Para o caso do complexo *C. gloeosporioides* associado a plantas cítricas, estudos morfológicos semelhantes foram feitos envolvendo isolados obtidos em Belize, América Central (FAGAN, 1980), e na Flórida, Estados Unidos (AGOSTINI et al., 1992).

No Brasil, não obstante a importância representada pela QPFC, os estudos referentes a interação *C. gloeosporioides*-cítricos têm sido feitos de forma genérica, restringindo-se à ocorrência, importância e controle da doença (DONADIO et al., 1975; DORNELLES, 1977; PORTO et al., 1979; SOUZA FILHO et al., 1979; PORTO, 1981_{a,b}; PRATES, 1991; FEICHTENBERGER, 1994), com exceção apenas ao trabalho publicado por ROSSETTI et al. (1981), embora a abordagem do mesmo não tenha sido o estudo de heterogeneidade e caracterização de populações daquele fungo. Não há, portanto, na literatura, nenhum trabalho que contemple o estudo da morfologia envolvendo diferentes linhagens ou formas dentro do complexo *C. gloeosporioides*, em cítricos, no Brasil.

2.4.2. Caracterização eletroforética

O uso da eletroforese como critério taxonômico foi intensificado após o trabalho de CHANG et al. (1962), que demonstraram sua utilidade na separação de proteínas solúveis extraídas de várias espécies de *Neurospora* e, também, a partir do estudo de proteínas de oito diferentes espécies de *Pythium*, através da eletroforese em gel de amido, onde CLARE (1963) verificou que espécies diferentes produziam padrões

diferentes, enquanto que culturas de uma mesma espécie produziam padrões eletroforéticos semelhantes ou com pequenas variações.

CLARE & ZENTMEYER (1966), através de análise eletroforética, constataram diferenças na atividade enzimática de peroxidase entre *Phytophthora cinnamomi* Lands, *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian e *P. palmivora* Butler. No caso de *Cylindrocladium* Morgan, padrões distintos de proteínas e de isoesterases foram observados em oito espécies daquele fungo, através de eletroforese de proteínas intramiceliais em gel de poliacrilamida (MOREIRA & ALFENAS, 1985). Subseqüentemente, devido à viabilidade demonstrada pelo uso da eletroforese de proteínas e isoenzimas como critério complementar à taxonomia e estudos da biologia de populações, vários trabalhos foram desenvolvidos contemplando diversas espécies de fungos, dentre as quais se incluem *Puccinia* spp (BURDON & ROELFS, 1985), *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis (NEWMAN & OWEN, 1985), *Sclerotinia* spp (TARIQ et al., 1985), *Uromyces phaseoli* (Reb.) Wint. var. *typica* Arth. (KIM et al., 1985; LU & GROTH, 1987; LINDE et al., 1990), *Phytophthora megasperma* Dreschsler (HANSEN et al., 1986), *Pyricularia oryzae* Cavara (PARK et al., 1986), *Microcyclus ulei* (P.Henn.) Arx (JUNQUEIRA et al., 1987), *Chaetomium* spp (SZECSI & TOTH, 1987); *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. (ROIG et al., 1990), *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout (FANCELLI, 1991; PETRUNAK & CHRIST, 1992), *A. alternata* (Fr.) Keissler (PETRUNAK & CHRIST, 1992), *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs (BACH, 1991) e *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. (FIGUEIREDO et al., 1993).

Não obstante a existência de numerosos trabalhos onde se evidencia a aplicação da técnica da eletroforese como estudo adicional à classificação de expressivo número de espécies de fungos, verifica-se que em relação a *C. gloeosporioides* estes são ainda muito limitados, restringindo-se a poucos casos como os de LENNÉ & BURDON (1990) para o patossistema *C. gloeosporioides*-estilozantes (*Stylosanthes guianensis*) e PEREIRA (1995) para *C. gloeosporioides*-pimentão (*Capsicum annum* L.) e *C. gloeosporioides*-jiló (*Solanum gilo* Radd.). Para o caso específico do complexo *C. gloeosporioides* associado a plantas cítricas encontra-se, citado na literatura, apenas o trabalho de LIYANAGE et al. (1993), onde mediante estudo de duas populações de *C. gloeosporioides*, foi detectado a presença de esterases com atividades enzimáticas distintas, associadas àquelas populações. Entretanto, as comparações foram feitas apenas entre as populações FGG (fast-growing gray) e SGO (slow-growing orange), não sendo incluídos isolados correspondentes a KLA (key lime anthracnose). Torna-se oportuno, portanto, um estudo comparativo abordando as três populações com o objetivo de oferecer maiores subsídios ao conhecimento da diversidade genética desse fungo.

2.5. Controle da doença

O controle da doença baseia-se, especialmente, na proteção das inflorescências mediante pulverização com produtos químicos. De acordo com FAGAN

(1972) e Wade⁷ (1972) (citado por DENHAM, 1979), benomyl, thiabendazole e captafol foram os primeiros fungicidas citados como eficientes no controle do fungo.

Nos anos subseqüentes, aplicados isoladamente ou em combinações variadas, benomyl e captafol foram os tratamentos que mostraram ser mais efetivos (PORTO et al., 1979; SOUZA FILHO et al., 1979; PORTO, 1981_{a,b}; ROSSETTI et al., 1981; FAGAN, 1984; McMILLAN Jr., 1991; MELO & MORAIS, 1991; TIMMER & ZITKO, 1991) embora outros fungicidas como thiabendazole e chlorothalonil tenham também sido citados para o controle do agente causal (DENHAM, 1989).

As grandes dificuldades para o controle da doença residem no longo período de exposição das flores, tornando necessário maior número de pulverizações (DENHAM, 1979, 1989), e devido o período crítico de infecção ser relativamente curto (DENHAM & WALLER, 1981), dificultando o planejamento da aplicação dos fungicidas. Além disso, diversas espécies de plantas cítricas representadas pelos limões verdadeiros, limas ácidas e laranja 'Pêra', emitem vários surtos de floração contribuindo para o aumento exponencial do inóculo (FEICHTENBERGER, 1991).

A doença se desenvolve em alta severidade quando períodos longos de chuva ou umidade elevada ocorrem por ocasião do pico de florescimento (DENHAM & WALLER, 1981). Por outro lado, tem-se verificado que em épocas e locais onde a incidência da doença tem sido baixa, uma simples aplicação de benomyl ou captafol na metade do florescimento ou, duas aplicações, sendo uma no início e a outra na metade daquele estágio, tem-se obtido significativa redução no nível da doença e,

⁷ Wade, N.E. Fungicide experiment report. Citrus Company of Belize Ltd., Stann Creek Valley, Belize. 1972.

conseqüentemente, aumento na retenção de frutos (TIMMER & ZITKO, 1992). No entanto, quando a incidência da doença foi alta, apenas um esquema de pulverização semanal pode proporcionar um controle satisfatório, demonstrando que o número de pulverizações, mais do que o fator época, aparenta ser o determinante primário do grau de controle. Além disso, não obstante a existência de vários trabalhos reportando sobre o controle da doença, tem-se observado que a eficiência de um programa não é constante todos os anos, independente das combinações (PORTO, 1981_a).

Embora captafol tenha se mostrado mais efetivo do que o benomyl no controle da QPFC (FAGAN, 1984), devido à suspensão da comercialização desse produto no Brasil, benomyl tem-se constituído no único fungicida utilizado para o controle do fungo. Torna-se imprescindível, portanto, a busca de novas alternativas de controle da doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos do presente trabalho foram conduzidos em laboratório e casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba e em pomares cítricos de propriedade particular no município de Mogi-Guaçu/SP.

3.1. Obtenção e conservação dos isolados

Os isolados de *C. gloeosporioides* utilizados foram obtidos de folhas e pétalas de laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) e lima ácida ‘Tahiti’ (*C. latifolia* Tanaka), lima ‘da Pérsia’ (*C. limettioides* Tanaka) e também de folhas, flores e frutos de limão ‘Galego’ (*C. aurantifolia* Christm.).

Para isolamento, pequenos fragmentos de tecidos foram cortados na zona de transição entre sadia e doente e posteriormente imersos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante três minutos, seguido de duas lavagens consecutivas em água destilada estéril. Após secagem em papel de filtro, os fragmentos foram implantados na superfície de meio ágar-água (AA), contido em placa de Petri. Após quatro dias de incubação a 22°C e fotoperíodo de 12 h, as colônias com características típicas de *C.*

gloeosporioides foram repicadas para placas contendo meio BDA e novamente incubadas como anteriormente. Sete dias após, procedeu-se à identificação do fungo, usando-se como critério as características descritas por ARX (1957) e SUTTON (1982).

Após a identificação do fungo, determinou-se tentativamente o relacionamento ecológico e cultural dos isolados obtidos. Para isso, todos os isolados obtidos foram agrupados levando-se em consideração os seguintes critérios: a) espécie de planta hospedeira; b) tipos de sintomas produzidos; c) órgãos da planta dos quais se procederam os isolamentos; d) crescimento micelial em BDA após 96 h de incubação a 24°C no escuro e e) morfologia das colônias. Estes isolados puderam ser delimitados em três grupos (SGO, KLA, FGG) os quais, coincidentemente, foram obtidos respectivamente de pétalas com sintomas típicos da QPFC, de folhas e frutos de limão ‘Galego’ e de tecidos senescentes de citros (Tabela 1).

As culturas estoques foram mantidas em diferentes formas, sendo: em tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado; em frascos de vidro de acordo com o método Castellani (FIGUEIREDO, 1967) e em ramos lignificados de lima ácida ‘Tahiti’, de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento, previamente autoclavados por vinte minutos em dois dias consecutivos. Para os três métodos, inicialmente procedeu-se à deposição de discos de 4 mm de diâmetro contendo meio de cultura e micélio, seguido de incubação a 22°C, no escuro, durante cinco dias. Posteriormente, todas as culturas foram armazenadas em câmara fria a 8°C ± 1°C, no escuro.

Tabela 1 - Designação, procedência e características de isolados de *C. gloeosporioides* utilizados na experimentação.

Isolado	Procedência	Hospedeiro	Local de isolamento	Tipo de crescimento	Coloração da colônia	Grupo
LA1	Itaboraí-RJ	<i>Citrus sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA2	Conchal-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA3	M.Guaçu-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA4	Pirassununga-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA5	Olímpia-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA6	Araraquara-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA7	Colina-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA8	Severinia-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA9	Leme-SP	<i>C. limettioides</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA10	Itaboraí-RJ	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	branca	SGO
LA11	Conchal-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	branca acinzentada	SGO
LA12	Severinia-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA13	M.Guaçu-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA14	Limeira-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA17	Cordeirópolis-SP	<i>C. sinensis</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LA18	Valença-RJ	<i>C. latifolia</i>	pétalas	lento	cinza clara	SGO
LI19	Itapetininga-SP	<i>C. aurantifolia</i>	folhas	lento	branca alaranjada	KLA
LI20	Piracicaba-SP	<i>C. aurantifolia</i>	pétalas	lento	branca alaranjada	KLA
LI21	Piracicaba-SP	<i>C. aurantifolia</i>	folhas	lento	cinza a laranja profundo	KLA
LI22	Campinas-SP	<i>C. aurantifolia</i>	frutos	lento	cinza a laranja profundo	KLA
LI23	Flórida-EUA	<i>C. aurantifolia</i>	frutos	lento	branca a laranja profundo	KLA
LI24	Flórida-EUA	<i>C. aurantifolia</i>	frutos	lento	branca a laranja profundo	KLA
LI25	Piracicaba-SP	<i>C. aurantifolia</i>	frutos	lento	branca a laranja profundo	KLA
SE26	Flórida-EUA	<i>C. sinensis</i>	folhas senescentes	rápido	cinza clara a escura	FGG
SE27	Tambau-SP	<i>C. sinensis</i>	folhas senescentes	rápido	cinza escura	FGG
SE28	Itaboraí-RJ	<i>C. sinensis</i>	folhas senescentes	rápido	cinza escura	FGG
SE29	B.Mendes-BA	<i>C. sinensis</i>	folhas senescentes	rápido	cinza escura	FGG
SE30	Januária-MG	<i>C. sinensis</i>	folhas senescentes	rápido	cinza escura	FGG
SE31	Limeira-SP	<i>C. sinensis</i>	flores senescentes	rápido	cinza escura	FGG

3.2. Experimentos realizados

3.2.1. Caracterização patogênica de *C. gloeosporioides*

3.2.1.1. Avaliação da capacidade patogênica de vários isolados de *C. gloeosporioides* em flores de laranja ‘Pêra’ em casa-de-vegetação.

Os testes de patogenicidade foram realizados em flores de plantas de laranja ‘Pêra’ com 36 meses de idade, enxertadas em limoeiro ‘Cravo’. Estas plantas foram inicialmente produzidas em locais sem antecedentes da QPFC e a seguir transplantadas em baldes plásticos com capacidade para 25 l de solo e mantidas em casa-de-vegetação. Periodicamente, foi realizada adubação em cobertura e irrigação executada sempre que necessária.

Por ocasião da inoculação, as plantas exibiam diferentes estádios de florescimento, variando desde primórdios florais a flores abertas. Para inoculação foram selecionados apenas botões florais esbranquiçados e em expansão e flores recentemente abertas. Os botões florais apresentavam comprimento superior a 6 mm e, juntamente com as flores, foram individualmente marcados para avaliações futuras.

No teste de patogenicidade foram selecionados isolados representativos aos três grupos discriminados na Tabela 1. Dentre estes incluíram-se os seguintes

isolados: LA2, LA3, LA6, LA7, LA13, LA14 (SGO); LI21, LI22, LI23 (KLA) e SE29, SE30 e SE31 (FGG).

Para obtenção de suspensão conidial, foram adicionados 10 ml de água destilada estéril sobre a superfície da cultura crescida em placas de Petri durante 7 a 10 dias a 24°C, no escuro, cujos conídios foram removidos mediante a fricção de um pincel de cerdas finas. A suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze esterilizada e a seguir procedeu-se sua calibração através de hemacitômetro tipo Neubauer. A concentração da suspensão foi ajustada para aproximadamente 1×10^5 conídios/ml. Cada concentração foi aferida contando-se o número de conídios em 16 campos da lâmina, sendo essa leitura realizada quatro vezes, obtendo-se a média.

A inoculação consistiu na pulverização das inflorescências até o ponto de escorrimento utilizando frascos plásticos do tipo “laquê”, com capacidade para 145 ml. Após a inoculação, as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação à temperatura próxima de 23°C. Para formação de câmara úmida, os ramos contendo as flores inoculadas foram cobertos, durante 48 horas, com saco plástico transparente, previamente aspergidos de água em seu interior. Para cada isolado foram utilizados três plantas diferentes, sendo o teste repetido duas vezes. Nas flores correspondentes à testemunha procedeu-se apenas pulverização com água destilada estéril.

Devido ao florescimento não ter sido completamente uniforme, todos os isolados não puderam ser avaliados simultaneamente. No entanto, todas as condições de padronização da metodologia foram mantidas no transcorrer das etapas de experimentação.

As avaliações foram realizadas no sétimo dia após a inoculação, quando se efetuou a contagem total de flores com sintomas típicos da QPFC. As flores que exibiam no mínimo uma lesão típica da doença em qualquer uma das pétalas, foram consideradas infectadas. Esta patogenicidade foi confirmada através de reisolamento de fungo. Os dados obtidos foram expressos em percentagem de flores infectadas. Cerca de 90 dias após a queda total das pétalas procedeu-se à contagem do número de cálices retidos, cujos valores obtidos foram comparados ao número de flores inoculadas e estabelecida a relação percentual, empregando-se a seguinte fórmula (Fórmula 1):

$$\text{Cálice retido (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ cálices retidos}}{N^{\circ} \text{ de botões ou flores marcadas}} \times 100$$

Determinou-se também o número médio de frutos efetivos (NMFE), empregando-se a seguinte fórmula (Fórmula 2):

$$\text{NMFE} = \left(\frac{A}{A + B} \right)$$

A = número de frutos vingados e B = número de cálices retidos e\ou frutos amarelecidos devido à doença.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído de 14 tratamentos (isolados) e 3 repetições.

3.2.1.2. Avaliação comparativa de níveis de severidade da QPFC na retenção de frutos de laranja ‘Valência’

Em plantas de laranja ‘Valência’ enxertadas em tangerina Cleópatra (*C. reshni* Tanaka) com oito anos de idade e apresentando diferentes estádios de florescimento, procedeu-se à avaliação da influência do nível de severidade da QPFC em flores infectadas na retenção dos frutos. Para isso, foram considerados dois estádios da florescimento: botões florais e flores abertas. Os tratamentos corresponderam a seis diferentes categorias, sendo: 0) botões florais fechados, brancos e em expansão, com comprimento aproximadamente igual ou superior a 8 mm e sem sintomas aparentes da QPFC; 1) idem anterior, com sintomas leves (lesão pequena, menor ou igual a 4 mm de comprimento e aparentemente restrita a uma pétala); 2) idem anterior com sintomas severos (lesão atingindo mais de 50% do comprimento do botão floral ou lesões de tamanhos variados sobre uma ou várias pétalas simultaneamente); 0) flores abertas, pétalas bem desenvolvidas e sem sintomas; 1) idem anterior, com sintomas leves (lesão pequena, menor ou igual a 4 mm de comprimento e restrita a uma pétala) e 2) idem anterior, com sintomas severos (lesão única, porém de comprimento superior a 50% do comprimento da pétala, ou lesões de tamanhos variados sobre uma ou várias pétalas simultaneamente). Preferencialmente, foram selecionados botões ou flores localizadas na extremidade terminal dos ramos.

A avaliação foi realizada 92 dias após a marcação dos botões e flores, quantificando-se o número de frutos efetivos e cálices retidos. Os dados obtidos foram

expressos em percentagem de cálices e frutos retidos. Para determinação da percentagem de cálice retido empregou-se a Fórmula 1, citada no item 3.2.1.1., enquanto que para a percentagem de frutos retidos utilizou-se a seguinte fórmula (Fórmula 3):

$$\text{N}^\circ \text{ de frutos retidos (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ frutos retidos}}{\text{N}^\circ \text{ de botões ou flores marcadas}} \times 100$$

3.2.2. Caracterização morfológica de isolados de *C. gloeosporioides*

3.2.2.1. Caracterização morfológica dos conídios

Para caracterização morfológica foram utilizadas culturas monospóricas crescidas em meio BDA durante 7 a 10 dias, a 22°C e fotoperíodo de 12 h. A suspensão conidial foi obtida em água destilada estéril, previamente filtrada em camada dupla de gaze esterilizada para eliminar fragmentos de micélio e resíduos de meio de cultura eventualmente existentes. Para cada isolado foram montadas duas lâminas semi-permanentes, fixadas com uma gota de corante azul de algodão/lactofenol. A composição do corante foi a seguinte: 10 g de cristais de fenol, 10 ml de glicerina, 10 ml de ácido láctico, 0,05 g de azul de algodão e 10 ml de água destilada (RAWLINGS, 1933).

Os isolados avaliados foram os seguintes: LA1, LA2, LA3, LA4, LA5, LA6, LA7, LA8, LA9, LA10 (SGO), LI19, LI20, LI21, LI22, LI23 (KLA), SE26, SE27, SE29 e SE30 (FGG) e encontram-se discriminados na Tabela 1.

As determinações consistiram na medição do comprimento e largura dos conídios através de um Filar Micrometer Eyepiece Bausch e Lomb, previamente calibrado para objetiva de 40 x. Para cada lâmina montada foram avaliados 15 conídios, totalizando, portanto, 30 mensurações. O tamanho da amostra foi determinado mediante a aplicação da seguinte fórmula (Fórmula 4):

$$n = ((t_{\alpha/2} \cdot S) e_o)^2 \text{ onde,}$$

n = tamanho da amostra;

$t_{\alpha/2}$ = dado obtido na tabela t de Student (distribuição de probabilidade t ao nível α de significância);

S = desvio padrão da amostra (obtido de amostra piloto);

$e_o = (u - x)$, onde u significa o valor médio da amostra e x significa a média da amostra piloto; o valor de e_o admitido foi 2,5.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, sendo a análise realizada em duas etapas. Na primeira etapa, a análise foi individualizada, onde cada isolado representou um tratamento. Na segunda, levou-se em consideração as características culturais dos isolados. Para isso, os isolados foram agrupados de acordo com seus grupos correspondentes (SGO, KLA e FGG), sendo a análise realizada no

conjunto. Além do comprimento (CC) e largura dos conídios (LC), determinou-se também a relação CC/LC.

3.2.2.2. Caracterização morfológica dos apressórios

Para a diferenciação dos apressórios, preparou-se suspensão conidial em água destilada esterilizada conforme metodologia descrita no item 3.2.1.1. Posteriormente, através de hemacitômetro a suspensão foi calibrada para obtenção de concentração contendo aproximadamente 1×10^5 conídios/ml. Foram empregados os mesmos isolados utilizados no item 3.2.2.1.

Para os isolados pertencentes aos grupos SGO e FGG, a diferenciação dos apressórios foi realizada na superfície de discos de folhas de laranja 'Pêra' previamente lavadas em água corrente e secas no ambiente. Estas folhas foram selecionadas quanto à sua integridade, uniformidade e tamanho, além de apresentarem maturidade fisiológica intermediária. Para cada isolado foram utilizados três discos de 10 mm de diâmetro, obtidos na região mediana das folhas e, a seguir, foram justapostos na superfície do meio de cultura contido em placas de Petri. O meio utilizado foi o de ágar-água (AA), vertendo-se aproximadamente 20 ml de meio por placa. Em cada placa foram colocados oito discos os quais permaneceram com a parte abaxial voltada para cima. Através de uma micropipeta depositou-se uma gota de 0,010 ml de suspensão conidial para cada um dos discos e as placas foram vedadas com filme de pvc transparente e mantidas no escuro a 22°C, durante 48 horas.

Posteriormente, os discos foram retirados das placas e colocados sobre folhas de papel de filtro para a secagem natural das gotas, e a seguir, sobre os discos depositou-se um filme de mistura 1:1 (v/v) de esmalte incolor e acetona. Após secagem natural, com o auxílio de uma pinça, procedeu-se à remoção da película formada (FITZELL et al., 1984). Esta película foi subdividida e montada em lâminas. Para melhor conservação e visualização das estruturas depositou-se uma gota de azul de algodão/lactofenol sobre estas lâminas montadas.

Para os isolados pertencentes ao grupo KLA, todas as atividades desenvolvidas foram semelhantes àquelas empregadas para os isolados dos grupos SGO e FGG, com exceção apenas à obtenção dos apressórios. Neste caso, os apressórios foram diferenciados em folhas de 15 a 20 dias de idade, obtidas de brotações de limoeiro 'Galego' e colocadas sobre suportes de vidro montados no interior de caixas plásticas transparentes (gerbox). Para garantir alta umidade no ambiente colocou-se, no fundo das caixas, duas folhas de papel borrão previamente umedecidas em água estéril e prendeu-se um chumaço de algodão na extremidade do pecíolo. Em cada caixa foram colocadas duas folhas, cujas partes abaxiais ficaram voltadas para cima. A seguir, com as caixas abertas procedeu-se a pulverização de suspensão conidial sobre as folhas. A aplicação foi realizada através de um atomizador De Vilbis nº 15, cujo volume foi o suficiente para atingir o ponto de escorrimento. Posteriormente, todas as caixas foram tampadas e vedadas com filme de pvc transparente.

A metodologia para incubação, preparo e remoção da película contendo apressórios diferenciados foi semelhante àquela utilizada para os isolados pertencentes

aos grupos SGO e FGG. Porém, o tempo de incubação foi de 72 h e as folhas foram cortadas em tiras antes de se proceder a retirada da película.

Para cada isolado foram avaliados aleatoriamente 25 apressórios, cujo tamanho da amostra foi definido conforme item 3.2.2.1 (Fórmula 4). O comprimento do apressório foi medido a partir do septo localizado na base truncada até o ápice mais distante, e a largura, em ângulo reto ao eixo do comprimento através da parte mais distante do apressório, incluindo os lóbulos. As mensurações foram feitas mediante uso de um Fillar Micrometer Eyepiece Bausch e Lomb, previamente calibrado para objetiva de 40 x.

O delineamento experimental e demais procedimentos para análise de variância foram semelhantes àqueles utilizados para avaliações da morfologia de conídios, descritos no item 3.2.2.1. As variáveis analisadas foram: comprimento do apressório (CA), largura do apressório (LA) e a relação CA/LA. Adicionalmente foi também avaliado o formato dos apressórios.

3.2.3. Caracterização eletroforética de diferentes isolados de *C. gloeosporioides*

3.2.3.1. Cultivo dos isolados de *C. gloeosporioides*

Para extração de proteínas e subsequente estudo do perfil eletroforético foram empregados os isolados LA2, LA3, LA5, LA7, LA8 (SGO), LI23, LI24 (KLA),

SE26, SE29 e SE30 (FGG), cultivados em erlenmeyer de 125 ml contendo 30 ml de meio líquido batata-dextrose (BD). Para cada isolado foram utilizados três erlenmeyers contendo 30 ml de meio previamente autoclavados. Em cada um deles foram repicados três discos contendo meio de cultura e micélio. Cada disco tinha 4 mm de diâmetro e foram obtidos na periferia de colônias com 7 dias de idade, crescidas em BDA a 22°C. A seguir procedeu-se incubação a 24°C durante 10 dias, no escuro.

Após a incubação, o micélio produzido em cada frasco foi coletado separadamente e filtrado à vácuo em funil Buchner e papel de filtro Whatman nº 1, previamente pesado. A seguir, o micélio foi lavado em água destilada estéril, por três vezes, para remoção dos resíduos de meio de cultura eventualmente existentes e, posteriormente, secado à temperatura ambiente e pesado, obtendo-se o peso fresco (PF). Para obtenção do peso seco (PS), uma fração da amostra correspondente ao PF foi colocada em vidros pequenos de penicilina, já previamente secos a 80°C/24 h e tarados, e transferida para estufa a 80°C. A cada intervalo de 1 h procedeu-se a sua pesagem até a obtenção de peso constante (GARRAWAY & EVANS, 1984). Mediante avaliações sucessivas verificou-se que 1 g de PF correspondia a 370 mg de PS.

3.2.3.2. Extração de proteínas

Para extração de proteínas, amostras de 473 mg de peso seco do micélio de todos os isolados avaliados foram triturados manualmente em almofariz, em banho de gelo, acrescido de 1 ml de tampão Tris-glicina 0,125 M pH 8,2 + 10% de sacarose + 300

mg de polivinilpirolidona (PVP). Após a trituração, as amostras foram mantidas a 4°C durante 4 h e posteriormente centrifugados a 16.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante coletado constituiu o extrato proteico.

3.2.3.3. Quantificação de proteínas nas amostras

A concentração de proteínas nos extratos foi determinada através do método de Lowry o qual consiste, inicialmente, no preparo de vários reagentes. O reagente B₁, foi constituído de 1% de sulfato de cobre pentahidratado em água destilada, o B₂, de tartarato de sódio a 2% em água destilada e o A, de 2% de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 N. A solução reagente C foi preparada misturando-se 0,5 ml da solução dos reagentes B₁ e B₂ em 49 ml do reagente A, obtendo-se, portanto, 50 ml de solução.

Posteriormente, colocou-se 1 ml da solução reagente C para cada 0,2 ml da amostra dos extratos proteicos, procedendo-se a sua agitação suave durante 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, em cada uma dessas amostras foi adicionado 0,1 ml do reagente Folin Ciocatteau 2N (Quell - Ind. Quím. São Paulo, SP), previamente diluído em água destilada 1:1 (v/v). Essas amostras foram posteriormente agitadas vigorosamente durante 30 minutos, à temperatura ambiente e, a seguir, procedeu-se à determinação das respectivas absorbâncias em espectrofotômetro (UV - VIS Varion Techtron 635), no comprimento de onda de 500 nm.

A concentração de proteínas em cada amostra foi expressa em μg de soroalbumina bovina (Sigma Chem. Co.) por ml (Eq mg SAB/ml) e foi determinada através de curvas padronizadas obtidas por diferentes concentrações SAB e absorvância de 500 nm.

3.2.3.4. Preparo do gel de poliacrilamida

Inicialmente, promoveu-se a dissolução de acrilamida (AA) e de metileno - bis acrilamida (BIS) em tampão Tris-glicina 0,125M pH 8,2, acrescentando-se, a seguir, 0,1 ml de tetrametildiamina (TEMED) e 2,8 ml de persulfato de amônio a 2%. Posteriormente, com o auxílio de uma seringa de 25 ml essa solução foi imediatamente injetada entre duas placas (18 x 15 cm), sendo uma de vidro e a outra de polietileno. Essas placas foram separadas entre si por um espaçador de polietileno de 2 mm de espessura e a seguir presas por presilhas. O espaçador continha incluso, na parte superior, um pente para 12 amostras.

Após a polimerização completa do gel, o espaçador foi retirado e a placa de polietileno removida cuidadosamente, permanecendo o gel na placa de vidro. Esta placa foi transferida para uma cuba de sistema horizontal contendo tampão Tris-glicina 0,125M pH 8,2, fazendo-se uma ponte iônica do gel com a solução, através de papel de filtro Whatman nº 3.

3.2.3.5. Aplicação das amostras e corrida eletroforética

Em cada cavidade do gel formada pelo pente, foi aplicado 22 µl do extrato contendo aproximadamente 116 µg em equivalente de SAB. A corrida foi realizada em aparelho horizontal (Permatron), mantendo-se corrente constante de 5 mA até o corante sair da cavidade, passando posteriormente para 10 mA até o final da corrida.

O corante marcador utilizado foi o azul de bromofenol a 0,25% em tampão Tris-glicina 0,125 M pH 8,2 + sacarose a 10%.

A corrida eletroforética foi realizada à temperatura de 10°C (± 1°C). Para cada amostra, a corrida foi repetida três vezes.

3.2.3.6. Coloração do gel

Após a corrida eletroforética, o gel foi retirado da placa e imerso imediatamente em solução corante para esterase. Para obtenção desta solução dissolveu-se 50 mg de “Fast red TR” em 100 ml de tampão fosfato 0,1 M e pH 6,5 acrescido de 2 ml de solução 1% de α- nafil acetato em solução aquosa de acetona a 50%. O gel foi mantido nesta solução, à temperatura ambiente, até o aparecimento das bandas e, depois, fixado em ácido acético a 7% conforme técnica empregada por JVO et al. (1973), modificada por BACH (1989).

3.2.3.7. Preservação do gel

Após a coloração e fixação, o gel foi imerso em solução de metanol, ácido acético e água na proporção 50:75:100, contendo 10% de glicerina (v/v) durante uma hora. Duas folhas de papel celofane (25 x 30 cm) foram também mergulhadas nesta solução até a sua completa embebição. A seguir, recobriu-se uma placa de vidro (18 x 15 cm) com uma das folhas de papel celofane, tendo-se o cuidado de dobrar as suas bordas laterais para baixo e evitar que ficasse bolha de ar sob o papel. O gel foi colocado sobre esta placa e, adotando-se os mesmos procedimentos anteriores, com a segunda folha de papel recobriu-se o gel, deixando secar à temperatura ambiente. Após a secagem, o gel foi retirado da placa de vidro e o excesso de papel, recortado.

3.2.3.8. Análise do perfil eletroforético

A análise dos perfis foi realizada com base no número, posição e intensidade das bandas. A análise e interpretação dos resultados foram realizados mediante observação direta dos géis, através do diagrama eletroforético, e por análise densitométrica realizada em densitômetro (Desagra), utilizando-se filtro de 540 nm.

3.2.4. Efeito da temperatura no crescimento micelial de diversos isolados de *C. gloeosporioides*.

Para avaliação do efeito da temperatura no desenvolvimento micelial foram avaliados sete isolados de *C. gloeosporioides*, sendo: LA2, LA3, LA7 (SGO), LI19, LI23 (KLA), SE27 e SE31 (FGG). Esses isolados apresentavam características culturais que representavam satisfatoriamente os três grupos analisados (Tabela 1).

No centro de placas de Petri com BDA foram colocados discos de 4 mm de diâmetro obtidos da periferia de colônias de *C. gloeosporioides* com sete dias de idade a 22°C e fotoperíodo de 12 h, seguido de incubação, no escuro, a 15, 20, 25, 30 e 32°C.

O delineamento experimental foi o de blocos inteiramente casualizados, com esquema fatorial 5 x 7 e quatro repetições. Cada parcela experimental foi representada por uma placa de Petri e o experimento foi repetido duas vezes. A avaliação foi realizada após 120 h de incubação medindo-se o tamanho das colônias do fungo em dois sentidos perpendiculares entre si.

A temperatura ótima para o crescimento micelial dos isolados foi estimada através de regressão não linear, usando-se a função beta (Equação 1), de acordo com HAU & KRANZ (1990). A equação é a seguinte:

$$N = b_1 (T - b_2)^{b_4} (b_3 - T)^{b_5} \text{ onde;}$$

N = tamanho das colônias (mm);

$b_1 - b_5$ = parâmetros estimados para as temperaturas da regressão não linear;

T = temperatura

3.2.5. Efeito de fungicidas na sensibilidade de *C. gloeosporioides* sob condições *in vitro*

3.2.5.1. Efeito de doses crescentes de benomyl no crescimento micelial e esporulação de diversos isolados de *C. gloeosporioides*

O objetivo do experimento foi o de determinar a sensibilidade qualitativa e quantitativa de populações de *C. gloeosporioides* a doses crescentes de benomyl sob condições *in vitro*. Para isso, o experimento foi dividido em três etapas, sendo:

Etapa 1 - Determinação da sensibilidade de oito isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes a três grupos morfológicos, às seguintes doses de benomyl: 0, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ do i.a. Os grupos e respectivos isolados foram os seguintes: SGO (LA2, LA4, LA9 e LA12), KLA (LI19 e LI25) e FGG (SE28 e SE31). Nesta etapa foi determinado o percentual de inibição do crescimento micelial após 72 h de incubação.

Etapa 2 - Determinação da sensibilidade de três isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes ao grupo SGO às seguintes doses de benomyl: 0, 100, 200, 250, 500, 1000 e 2500 ug/ml de i.a. Os isolados avaliados foram: LA2, LA3 e LA6. Após 72 h de incubação determinou-se o percentual de inibição do crescimento micelial.

Etapa 3 - Determinação do efeito de benomyl na esporulação de dez isolados de *C. gloeosporioides*. O fungicida foi avaliado nas seguintes concentrações: 0, 10 e 100 µg/ml do i.a. Os grupos e respectivos isolados avaliados foram: SGO (LA2, LA3, LA4, LA6, LA9, LA11, LA12, LA14, LA17) e KLA (LI22). A avaliação consistiu na contagem do número de conídios produzidos após 102 h de incubação.

A metodologia constou na transferência para o centro de placas de BDA + fungicida, de disco de 4 mm de diâmetro obtido na periferia de colônias de *C. gloeosporioides* desenvolvidas durante 7 dias a 22°C e fotoperíodo de 12 h. Após a repicagem procedeu-se à incubação nas mesmas condições anteriormente citadas.

Para o preparo do meio de cultura com o fungicida adotou-se a técnica descrita por EDGINTON et al. (1971), modificada por MENTEN et al. (1976), a qual consistiu em dissolver o fungicida em 5 ml de acetona e completar o volume com água destilada estéril até 100 ml. A partir desta solução estoque, procedeu-se à diluição em série de tal maneira que, cada 1 ml dessa quando adicionada em 99 ml de meio BDA fundente (45 - 50°C), se obtivesse a concentração desejada.

A avaliação constou na medição do crescimento linear das colônias do fungo, em dois sentidos perpendiculares entre si, determinando-se a percentagem de redução do crescimento micelial através da seguinte fórmula (Fórmula 5):

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratamento}}{\text{crescimento da testemunha}} \times 100$$

Para a determinação do efeito das doses de benomyl na esporulação, obteve-se previamente uma suspensão conidial mediante a deposição de 10 ml de água estéril acrescida de Tween 20 (1 gota/100 ml de água), sobre a superfície contendo o crescimento micelial, seguido de fricção das colônias com pincel de cerdas finas. Após a remoção dos conídios, procedeu-se filtragem em camada dupla de gaze esterilizada. Esta suspensão após homogeneização foi transferida para frascos de vidro com capacidade para 20 ml, sendo adicionado quatro gotas de lactofenol.

A contagem dos conídios foi realizada através de hemacitômetro e para cada repetição foram efetuadas quatro leituras, avaliando-se 16 campos da lâmina para cada uma delas. Os resultados foram expressos em número de conídios produzidos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com esquema fatorial de acordo com o ensaio correspondente, e com quatro repetições. Na avaliação sobre a influência de benomyl na esporulação foram utilizados apenas três repetições. Para todos os ensaios, cada tratamento foi representado por uma placa de Petri.

3.2.5.2. Efeito da utilização de benomyl, em condições de campo, na sensibilidade de populações residuais de *C. gloeosporioides*

O objetivo do experimento foi o de determinar a influência de doses crescentes de benomyl no crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de pomares com históricos variados sobre a utilização daquele fungicida.

Todos os três isolados utilizados pertenciam ao grupo SGO e caracterizavam-se por apresentar antecedentes distintos quanto a sua exposição a benomyl. Os isolados utilizados foram: LA10, LA14 e LA18.

O isolado LA10 foi obtido de plantas cujos registros indicavam o uso sistemático de benomyl nos últimos oito anos, inclusive nos últimos 90 dias antes da sua obtenção. O isolado LA14 foi obtido de plantas cujos registros não constavam a utilização de benomyl ou qualquer outro fungicida benzimidazol nos últimos 25 anos. Finalmente, o isolado LA18 foi obtido de plantas, com 4 anos de idade, que haviam recebido apenas uma aplicação de benomyl aproximadamente 90 dias antes do isolamento. Além disso, este pomar encontrava-se isolado e localizado distante da região citrícola.

As doses de benomyl avaliadas foram: 0, 1, 10, 100, 250 e 500 µg/ml do i.a.

A metodologia para preparo do meio de cultura com fungicida, repicagem e incubação foi semelhante àquela descrita no item 3.2.5.1.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi representada por uma placa de Petri.

A metodologia de avaliação foi semelhante à empregada no item 3.2.5.1., e os resultados foram expressos em percentagem de inibição do crescimento micelial, comparado com a testemunha (Fórmula 5).

3.2.5.3. Efeito de doses crescentes de fungicidas pertencentes a diferentes grupos químicos no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*

O experimento constou da avaliação dos isolados LA2, LA3 e LA7 (SGO) em relação aos fungicidas benomyl, chlorothalonil, folpet, mancozeb, prochloraz e tebuconazole (Tabela 2), nas seguintes concentrações: 0, 1, 10, 100 e 200 µg/ml.

Tabela 2- Formulação e grupo químico de fungicidas avaliados quanto à inibição do crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides*.

Fungicidas	Formulação	Grupo químico
Benomyl	pó-molhável	benzimidazol
Chorothonil	pó-molhável	ftalonitrila
Folpet	pó-molhável	ftalimida
Mancozeb	pó-molhável	carbamato
Prochloraz	concentrado emulsionável	imidazol
Tebuconazole	pó-molhável	triazol

A metodologia para preparo do meio de cultura com fungicida, repicagem, incubação e avaliação foi semelhante àquela descrita no item 3.2.5.1. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição do crescimento micelial, comparada com a testemunha (Fórmula 5).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial $(6 \times 5) \times 3$, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi representada por uma placa de Petri.

3.2.6. Efeito de fungicidas no controle de *C. gloeosporioides* sob condições de campo

3.2.6.1. Efeito de fungicidas pertencentes a diferentes grupos químicos no controle de *C. gloeosporioides*.

Os tratamentos, características técnicas e doses dos respectivos fungicidas avaliados são apresentados na Tabela 3. Todos os produtos de formulação pó-molhável foram previamente dissolvidos em água, sendo a suspensão posteriormente adicionada aos tanques de pulverização.

3.2.6.1.1. Local de execução do experimento

Todos os experimentos foram implantados em pomar pertencente a propriedade particular localizada no município de Mogi-Guaçu/SP, com antecedentes

comprovados por elevados níveis da QPFC nos anos anteriores. O pomar era constituído de laranja ‘Folha Murcha’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck) com 15 anos de idade, enxertada em limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), de tamanho uniforme e com boas características vegetativas. O espaçamento de plantio era de 8 x 5 m.

Tabela 3 - Características técnicas e doses de fungicidas avaliados no controle de *C. gloeosporioides* em condições de campo.

Tratamentos	Formulação	Grupo Químico	Dose em i.a.(g ou ml/100 l de água)
1. Benomyl	pó-molhável	benzimidazol	50
2. Carbendazim	suspensão concentrada	benzimidazol	75
3. Tiofanato metílico	pó-molhável	benzimidazol	49
4. Prochloraz	concentrado emulsionável	imidazol	67,50
5. Tebuconazole*	pó-molhável	triazol	18,75
6. Mancozeb	pó-molhável	carbamato	160
7. Anilazine	flowable	triazinas	96
8. Testemunha	-	-	-

* - Tratamento acrescido de isotridecanol poliglicoleter (espalhante adesivo) na dose de 49,5 ml de i.a./100 l de água.

3.2.6.1.2. Método de aplicação

Em todos os experimentos, os produtos foram aplicados sob a forma de pulverização empregando-se turbopulverizador (Jacto mod. Arbus 2000 Valência) com

pressão constante de 250 lb/pol² e dotado de 25 bicos. Usou-se bicos dos tipos J5-2 (Jacto) os quais contribuíram para uma boa penetração e cobertura uniforme de pulverização. O equipamento foi tracionado por trator, usando-se 2ª reduzida e 1700 rpm. O volume de calda aplicada foi calibrado para atingir o início do ponto de escorrimento, gastando-se em média 10 l/planta.

3.2.6.1.3. Estádio de florescimento pulverizado

As pulverizações foram realizadas em dois estádios de florescimento designados “cabeça de fósforo” e “cotonete”. O estádio “cabeça de fósforo” caracterizava-se pela predominância de botões florais verdes a verde-esbranquiçados, arredondados e com comprimento em torno de 4 a 6 mm. No estádio “cotonete” predominavam botões florais brancos, fechados, alongados ou em expansão, com comprimento superior a 6 mm. As pulverizações foram realizadas em 17 e 24/09/93.

3.2.6.1.4. Delineamento experimental

Usou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso com quatro repetições. Cada bloco foi constituído por uma linha de plantas, as quais foram utilizadas alternadamente para a obtenção das bordaduras. Cada parcela experimental foi constituída por dez plantas úteis que foram também delimitadas por plantas bordaduras na sua extremidade.

3.2.6.1.5. Metodologia de avaliação

Por ocasião da primeira pulverização foram selecionados e marcados 50 ramos por parcela. Estes ramos encontravam-se casualmente distribuídos entre as plantas e também entre os quadrantes da mesma. Em todas as plantas foi marcado pelo menos um ramo, cuja marcação foi efetuada com fitas plásticas coloridas de aproximadamente 40 cm de comprimento.

Para a determinação da eficiência dos tratamentos foram realizadas duas avaliações.

Na primeira, realizada 60 dias após a queda das pétalas, levou-se em consideração o percentual do número médio de frutos efetivos (NMFE), conforme a seguinte fórmula (Fórmula 6):

$$\text{Número médio de frutos efetivos (\%)} = \left(\frac{A}{A + B} \right) \times 100 \text{ onde,}$$

A = número de frutos vingados e B = número de cálices retidos e/ou número de frutos amarelecidos devido à doença.

A segunda avaliação foi realizada por ocasião da colheita dos frutos, cujos critérios de avaliação foram os seguintes: a) número médio de frutos por planta; b) peso

médio de frutos por planta e, c) peso médio dos frutos. Estas avaliações foram realizadas nas quatro plantas centrais da parcela, a partir das quais estabeleceu-se a média.

3.2.6.2. Efeito de benomyl associado a diferentes fertilizantes no controle de *C. gloeosporioides*

A influência da associação de benomyl com vários produtos com propriedades fertilizantes foi determinada mediante mistura de tanque, seguida de sua aplicação em plantas cítricas.

Os fertilizantes avaliados foram nitrato de potássio (13% de N + 43% de K), sulfato de zinco (35% de Zn) e uréia (45% de N). Após a dissolução, todos os produtos foram coados para remoção de impurezas e adicionados ao tanque de pulverização. Os tratamentos e respectivas doses em ingrediente ativo (i.a.) ou produto comercial (p.c.) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Tratamentos e respectivas doses de benomyl e fertilizantes utilizados em experimento sobre controle de *C. gloeosporioides*.

Tratamentos	Dose((i.a. ou [p.c.])/100 l de água)
1. Benomyl	(50g)
2. Benomyl + Nitrato de potássio	(50g + [250g])
3. Nitrato de potássio	[250g]
4. Benomyl + Sulfato de zinco	(50g +[250g])
5. Sulfato de zinco	[250g]
6. Benomyl + Uréia	(50g +[250g])
7. Uréia	[250g]
8. Testemunha	-

O local de execução dos experimentos como também a metodologia de aplicação dos produtos, estádios de florescimento, delineamento experimental e critérios de avaliação encontram-se apresentados entre os itens 3.2.6.1.1. a 3.2.6.1.5.

3.2.6.3. Efeito de benomyl associado a óleo mineral e espalhantes adesivos no controle de *C. gloeosporioides*

Os tratamentos e respectivas doses de fungicida, óleo mineral e espalhantes encontram-se apresentados na Tabela 5. A associação benomyl - óleo mineral

foi feita em pré-mistura, iniciando-se através do fungicida e, posteriormente, com o óleo mineral. A seguir, os produtos foram adicionados ao tanque de pulverização.

Contrariamente à metodologia de preparo de benomyl, para os espalhantes não se procedeu dissolução prévia, sendo estes prontamente utilizados. Nos casos de associações, estes foram sempre adicionados no tanque após a adição da suspensão do fungicida.

Tabela 5 -Composição em i.a. e doses de fungicida, óleo mineral e espalhantes adesivos avaliados no controle de *C. gloeosporioides*.

Tratamentos	Concentração em i.a. (%)	Doses (g ou ml de i.a./100 l água)
1. Benomyl	50	50
2. Benomyl + Óleo mineral Fersol ^R	50 + 80	50 + 160
3. Benomyl + Ag-Bem ^R	50 + 51.6	50 + 25.8
4. Benomyl + Aterbane BR ^R	50 + 46.6	50 + 93.2
5. Benomyl + Adefix ^R	-50 +60	-50 +6
6. Testemunha	-	-

As características químicas dos componentes avaliados em associação com benomyl são apresentadas na Tabela 6.

O local de execução dos experimentos como também a metodologia de aplicação dos produtos, estádios de florescimento, delineamento experimental e critérios de avaliação encontram-se apresentados entre os itens 3.2.6.1.1. a 3.2.6.1.5.

Tabela 6 - Características químicas do óleo mineral e espalhantes adesivos utilizados em experimento de controle de *C. gloeosporioides*.

Nome	Formulação	Composição
Óleo mineral Fersol ^R	concentrado emulsionável	mistura de hidrocarbonetos parafínicos
Aterbane BR ^R	solução aquosa concentrada	mistura de condensado de alcoofenóis com óxido de eteno e sulfonatos orgânicos
Ag-Bem ^R	emulsão concentrada	resina sintética emulsionada + agente tensoativo aniônico
Adefix ^R	solução aquosa concentrada	mistura do ácido sulfônico dodecilbenzeno + metoximetilcelulose de sódio

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização patogênica de isolados de *C. gloeosporioides*

4.1.1. Caracterização patogênica de isolados de *C. gloeosporioides*

A inoculação mediante a pulverização de flores e botões florais com suspensão conidial mostrou ser uma técnica eficiente para avaliação da capacidade patogênica de isolados de *C. gloeosporioides*. Sintomas típicos da doença foram observados a partir do 4º dia da inoculação. O período de 7 dias, compreendido entre a inoculação e a avaliação mostrou-se bastante satisfatório, uma vez que os sintomas mostraram-se completamente definidos. Os dados referentes à capacidade patogênica de isolados de *C. gloeosporioides*, pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Patogenicidade de doze isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG em flores de laranja 'Pêra' sob condições de casa-de-vegetação.

Isolados (grupos)	Flores doentes (%)	Cálices retidos (%)	Nº médio de frutos efetivos (NMFE)
(SGO)			
LA2	52,40 ± 0,82 ^x	40,20 ± 12,91	0,36 ± 0,17
LA3	59,67 ± 2,37	32,55 ± 9,29	0,30 ± 0,17
LA6	46,43 ± 9,68	33,89 ± 1,18	0,54 ± 0,07
LA7	40,80 ± 8,08	18,85 ± 16,41	0,61 ± 0,34
LA13	41,90 ± 5,91	37,49 ± 10,66	0,36 ± 0,12
LA14	47,24 ± 5,51	27,01 ± 23,42	0,25 ± 0,22
Média ^y	48,07 a	31,66 a	0,38 b
(KLA)			
LI21	40,38 ± 4,88	33,50 ± 3,03	0,50 ± 0,0
LI22	38,23 ± 7,19	20,77 ± 18,02	0,33 ± 0,28
LI23	40,23 ± 4,09	38,93 ± 7,90	0,55 ± 0,38
Média	39,68 b	31,07 a	0,46 b
(FGG)			
SE29	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
SE30	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
SE31	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Média	0,0 c	0,0 b	1,0 a
Testemunha	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Média	0,0 c	0,0 b	1,0 a

x - desvio padrão; y - médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Levando-se em consideração a percentagem de flores com sintomas observa-se que os três grupos de *C. gloeosporioides* diferiram estatisticamente entre si, cujas maiores médias foram observadas para SGO, seguido de KLA. Os isolados pertencentes ao grupo FGG apresentaram comportamento estatístico semelhante ao tratamento testemunha, não produzindo sintomas da QPFC.

Em relação ao comportamento individual dos isolados, nota-se que o maior percentual de flores com sintomas foi verificado entre os isolados SGO, notadamente LA3 e LA2, cujas médias foram superiores a 50%. Em relação aos isolados do grupo KLA, o percentual de flores com sintomas situou-se em torno de 40%.

Em relação à percentagem de cálices retidos, observou-se que não houve diferença significativa entre os isolados pertencentes aos grupos SGO e KLA, embora estes tenham diferido significativamente de FGG. Não foi observada diferença estatística entre FGG e o tratamento correspondente à testemunha.

Quanto ao número médio de frutos efetivos (NMFE), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os isolados dos grupos SGO e KLA porém, ambos diferiram dos isolados do grupo FGG. O valor do NMFE observado nas plantas testemunhas e naquelas inoculadas com isolados do grupo FGG, foi igual a 1,0.

Analisando conjuntamente a percentagem de flores com sintomas x cálice retido ou NMFE, verifica-se que estas duas variáveis mostraram-se independentes, obtendo-se um baixo coeficiente de determinação. Os valores de R^2 para as relações flores doentes (%) - cálices retidos (%) e, flores doentes (%) - NMFE, foram 0,098 e 0,223, respectivamente.

Comparando o comportamento entre os isolados dos grupos SGO e KLA, apesar da existência de diferença significativa entre ambos quanto à percentagem de flores com sintomas, verifica-se que esta tendência necessariamente não se manteve em relação à percentagem de retenção de cálices e também quanto ao número de frutos efetivos, onde ambos apresentaram o mesmo comportamento estatístico.

4.1.2. Avaliação comparativa de diferentes níveis de severidade da QPFC na retenção de cálices e de frutos de laranja ‘Valência’

Para determinação dos níveis de severidade da QPFC na retenção de frutos e de cálices foram realizadas apenas avaliações comparativas excluindo-se, portanto, o uso de análise estatística. Nestas avaliações foram consideradas duas situações: nível de severidade em botões florais e em flores abertas. A queda de pétalas para o caso de flores abertas deu-se em torno de 4-6 dias após a sua marcação, enquanto que para os botões marcados ocorreu em torno de 8-10 dias. Neste período não foi registrado ocorrência de chuva ou qualquer outra alteração climática significativa. Praticamente todos os botões florais sem sintomas aparentes ou com sintomas leves mantiveram seu desenvolvimento normal, ocorrendo abertura normal das flores e conseqüente formação dos órgãos reprodutivos. Para o caso de botões severamente afetados, cerca de 59% não chegaram ao estágio flor aberta. A marcação de menor número de botões florais com sintomas se comparada à de flores foi devido à dificuldade de encontrar órgãos naquele estágio e com o nível de severidade desejado.

Para o caso de botões florais, observa-se através da Tabela 8, que no nível zero de severidade, embora tenham sido selecionados apenas botões aparentemente saudáveis, houve a formação de 1,86% de cálice retido, o que evidencia a ocorrência da QPFC. Neste nível de severidade, a retenção de frutos foi de 2,33%. Para o nível 1 de severidade, verificou-se que o incremento do percentual de cálices retidos foi cerca de treze vezes superior àquele observado no nível zero. A redução na capacidade de retenção dos frutos foi ainda mais expressiva, variando de 2,33 para 0,03%. Para o nível 2, enquanto as tendências de redução do percentual de retenção de frutos se consolidaram, foi observado, contrariamente, que a formação de cálice retido foi reduzida em mais de 50% àquela observada no nível 1 de severidade, cujo valor obtido foi de 11,11%.

Em relação às flores marcadas, observou-se que mesmo aquelas que se mostravam aparentemente saudáveis, foi verificada a presença de 2,57% de cálices retidos e uma retenção de frutos na ordem de 3,30%. Para o nível 1 de severidade, observou-se um incremento relevante no número de cálices retidos, acompanhado de expressiva redução no percentual de frutos retidos. O incremento do número de cálices retidos variou de 2,57 para 45,53%, enquanto a retenção de frutos foi reduzida de 3,30 para 1,78%. No nível 2 de severidade, apesar de ter havido uma queda no percentual de cálices retidos, este se manteve ainda muito elevado, com valor de 38,92%. Expressiva redução no percentual de retenção de frutos foi também observado naquele nível de severidade, cujo valor foi de 0,011%.

Tabela 8 - Retenção de cálices e de frutos de laranja 'Valência' em função de diferentes níveis de severidade da QPFC, em botões florais e em flores abertas, sob condições de infecção natural.

Estádio da flor/(nível de severidade)*	Nº cálices retidos/nº botões ou flores marcadas	Nº frutos retidos/nº botões ou flores marcadas	Cálices retidos (%)	Frutos retidos (%)
Botões florais (0)	4/214	5/214	1,86	2,33
Botões florais (1)	8/33	1/33	24,24	0,03
Botões florais (2)	6/54	0/54	11,11	0,0
Flores abertas (0)	7/272	9/272	2,57	3,30
Flores abertas (1)	51/112	2/112	45,53	1,78
Flores abertas (2)	65/167	2/167	38,92	0,011

*- (0) - ausência aparente de sintomas; (1) - presença de sintomas leves (lesão pequena, menor que 4 mm de comprimento e aparentemente restrita a uma área correspondente a uma pétala; (2) - presença de sintomas severos (lesão única, porém de comprimento superior a 50% da área da pétala, ou lesões de tamanhos variados sobre uma ou várias pétalas simultaneamente).

O coeficiente de determinação obtido entre o número de cálices retidos e frutos efetivamente formados (frutos retidos) foi baixo, obtendo-se um $R^2=0,197$.

4.2. Caracterização morfológica de isolados de *C. gloeosporioides*

4.2.1. Características morfológicas de conídios e apressórios de isolados de *C. gloeosporioides*

Os dados referentes às médias e amplitude de comprimento, largura e a relação comprimento/largura de conídios correspondentes aos grupos SGO, KLA e FGG encontram-se na Tabela 9.

Observa-se que houve diferença significativa entre os três grupos analisados, tanto em relação ao comprimento como à largura dos conídios, cujas maiores médias em ordem decrescente foram observadas para os grupos FGG, KLA e SGO.

Analisando-se a amplitude dos valores do comprimento dos conídios observa-se que as maiores faixas foram observadas para os isolados do grupo SGO, variando de 7,55 (LA6) a 17,22 (LA4). Para os isolados do grupo KLA, a amplitude variou de 9,73 (LI21) a 17,42 (LI19). As menores discrepâncias foram observadas para os isolados do grupo FGG, variando de 10,22 (SE29) a 17,33 (SE26).

Em relação à amplitude da largura dos conídios, as maiores variações foram também observadas em relação aos isolados do grupo SGO, variando de 2,22 (LA9) a 5,77 (LA2). No grupo KLA, a amplitude variou de 2,77 (LI20) a 5,77 (LI21), enquanto que para FGG a variação foi de 3,11 (SE26) a 5,99 (SE29).

Tabela 9- Comprimento, largura e relação comprimento/largura de conídios de vários isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG.

Isolados (grupos)	Conídio		
	Comprimento (CC) (μm)	Largura (LC) (μm)	CC)/(LC)
(SGO)			
LA1	11,34 (9,99 - 12,77) ^x	3,79 (3,11 - 4,33) ^x	3,00 (2,42 - 3,53) ^x
LA2	12,52 (9,99 - 15,66)	4,51 (3,33 - 5,77)	2,79 (2,12 - 3,61)
LA3	12,38 (10,44 - 15,66)	4,40 (3,55 - 5,11)	2,82 (2,13 - 3,43)
LA4	12,00 (9,51 - 17,22)	4,00 (2,88 - 5,22)	3,02 (2,03 - 4,09)
LA5	11,68 (9,33 - 13,55)	3,41 (2,77 - 4,22)	3,44 (2,94 - 4,48)
LA6	10,22 (7,55 - 13,82)	3,35 (2,26 - 4,22)	3,08 (2,32 - 4,47)
LA7	12,32 (8,31 - 15,90)	4,25 (3,51 - 4,88)	2,92 (1,96 - 4,21)
LA8	11,13 (7,99 - 14,10)	3,45 (2,44 - 4,62)	3,30 (1,97 - 4,90)
LA9	10,62 (8,66 - 13,44)	3,12 (2,22 - 4,44)	3,48 (2,66 - 4,57)
LA10	14,93 (12,44 - 17,10)	4,39 (3,55 - 5,22)	3,42 (2,79 - 4,0)
Média ^y	11,91 c	3,87 c	3,13 b
(KLA)			
LI19	14,46 (12,13 - 17,42)	4,24 (3,37 - 5,06)	3,42 (2,69 - 4,17)
LI20	13,34 (10,22 - 16,04)	3,98 (2,77 - 5,15)	3,39 (2,62 - 4,27)
LI21	12,19 (9,73 - 15,15)	4,38 (3,11 - 5,77)	2,82 (1,99 - 4,40)
LI22	14,01 (11,88 - 16,66)	4,01 (3,33 - 4,88)	3,51 (2,67 - 4,19)
LI23	12,18 (8,66 - 14,99)	3,69 (2,88 - 4,44)	3,32 (2,36 - 4,65)
Média ^y	13,23 b	4,06 b	3,29 a
(FGG)			
SE26	14,15 (11,44 - 17,33)	4,23 (3,11 - 5,33)	3,39 (2,67 - 4,96)
SE27	14,92 (13,24 - 16,48)	4,29 (3,55 - 5,33)	3,36 (2,48 - 4,28)
SE29	13,30 (10,22 - 15,77)	4,55 (3,33 - 5,99)	2,97 (1,96 - 4,33)
SE30	13,69 (12,17 - 15,99)	4,82 (3,99 - 5,55)	2,86 (2,28 - 3,81)
Média ^y	14,02 a	4,52 a	3,15 ab

x - amplitude; y- médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em relação à largura, observa-se que os limites superiores de amplitude não foram muito discrepantes, variando de 5,77 (SGO e KLA) a 5,99 (FGG). Para os limites inferiores, as variações de amplitude foram de 2,22 (SGO) a 3,11 (FGG), e foram relativamente proporcionais às observadas quanto aos limites inferiores do comprimento dos conídios.

Quanto à relação CC/CL, observa-se que KLA diferiu significativamente de SGO, porém não diferiu de FGG. A maior relação CC/CL foi observada para o grupo KLA.

Analisando os limites de amplitude observados para a relação CC/CL, observa-se que variaram de 1,96 (SGO, KLA) a 4,96 (FGG). A maior variação de amplitude foi observada para o grupo FGG (1,96 - 4,96), embora proporcionalmente tenha sido pouco discrepante de SGO (1,96 - 4,90) e KLA (1,99 - 4,65).

Em relação aos apressórios, a técnica de deposição de gota de suspensão conidial sobre discos de folhas de laranjeiras demonstrou ser eficiente para sua diferenciação, para os isolados pertencentes aos grupos SGO e FGG. Para o caso do grupo KLA, a metodologia de pulverização de suspensão conidial sobre folhas jovens de limão 'Galego' demonstrou ser também uma técnica eficiente para a diferenciação, embora o tempo para produção tenha se estendido de 48 para 72 horas.

Todos os apressórios produzidos apresentaram paredes grossas, de coloração escura bem definida, notadamente os do grupo FGG. Os valores correspondentes à média e amplitude do comprimento, largura e relação comprimento do

apressório (CA)/largura do apressório (LA) destas estruturas são apresentadas na Tabela 10. Inclui-se, também, o seu formato predominante.

Observa-se que para todas as variáveis analisadas houve diferença significativa entre todos os grupos estudados, sendo que o FGG foi o que apresentou as maiores médias para comprimento e largura, seguido de SGO e KLA. As médias de comprimento foram 8,40, 7,70 e 6,20, respectivamente. Para a largura dos apressórios as médias foram 5,83, 5,06 e 4,76, correspondentes aos grupos FGG, SGO e KLA, respectivamente.

Para os valores de amplitude relativos ao comprimento dos apressórios, as maiores variações foram observadas para os isolados do grupo SGO, cujos limites variaram de 4,44 (LA8) a 12,10 (LA5). As menores variações foram observadas para os isolados do grupo KLA, variando de 4,17 (LI21) a 9,55 (LI22). Quanto aos valores de amplitude para a largura dos apressórios, as maiores variações foram também observadas para os isolados do grupo SGO, cujos limites variaram de 2,55 (LA1) a 9,33 (LA2). Para os isolados dos grupos KLA e FGG, embora os valores absolutos de amplitude tenham sido diferentes, as diferenças relativas de amplitude foram as mesmas.

Quanto à relação CA/LA, os três grupos diferiram estatisticamente entre si, cujos valores foram 1,55, 1,46 e 1,31, correspondentes ao SGO, FGG e KLA, respectivamente. Em relação aos limites de variações dos valores de amplitude, as maiores variações foram observadas para os isolados do grupo SGO, seguidas de FGG e KLA. Os limites de amplitude foram os seguintes: SGO - 0,71 (LA2) a 3,13 (LA1); FGG - 0,82 (SE27) a 2,35 (SE30) e KLA - 0,76 (LI23) a 1,85 (LI22).

Tabela 10 - Comprimento, largura, relação comprimento/largura e formato predominante de apressórios de isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG.

Isolados (grupos)	Apressório			
	Comprimento (CA) (µm)	Largura (LA) (µm)	Comprimento do apressório (CA)/Largura do apressório (LA)	Formato predominante
(SGO)				
LA1	7,90 (6,77 - 9,77) ^x	4,56 (2,55 - 5,55) ^x	1,76 (1,34 - 3,13) ^x	clavado
LA2	8,12 (6,66 - 10,33)	5,98 (4,66 - 9,33)	1,37 (0,71 - 1,76)	clavado
LA3	9,89 (5,99 - 13,77)	5,44 (4,44 - 8,22)	1,84 (1,25 - 3,00)	clavado
LA4	6,19 (5,11 - 7,77)	4,53 (3,55 - 5,33)	1,37 (0,95 - 1,75)	clavado
LA5	8,61 (6,66 - 12,10)	4,61 (2,71 - 5,55)	1,89 (1,42 - 2,86)	clavado
LA6	7,32 (5,77 - 9,66)	4,71 (3,77 - 5,99)	1,57 (1,00 - 2,00)	clavado
LA7	7,80 (6,11 - 9,73)	5,85 (4,17 - 7,77)	1,34 (1,04 - 1,60)	clavado
LA8	5,80 (4,44 - 7,99)	4,26 (3,33 - 5,55)	1,38 (0,94 - 1,97)	clavado
LA9	7,14 (5,33 - 9,11)	4,61 (2,62 - 5,95)	1,57 (1,00 - 2,03)	clavado
LA10	8,23 (4,44 - 11,42)	6,03 (4,31 - 8,66)	1,37 (0,90 - 1,84)	clavado
Média ^y	7,70 b	5,06 b	1,55 a	
(KLA)				
LI19	5,70 (4,66 - 7,15)	4,70 (3,95 - 5,44)	1,22 (1,00 - 1,59)	arredondado
LI20	7,18 (4,44 - 11,11)	5,42 (2,88 - 7,55)	1,33 (0,80 - 1,68)	arredondado
LI21	5,93 (4,17 - 8,99)	4,57 (3,66 - 5,77)	1,29 (1,04 - 1,72)	arredondado
LI22	5,40 (4,22 - 9,55)	4,21 (2,66 - 6,66)	1,29 (1,00 - 1,85)	arredondado
LI23	6,80 (5,33 - 8,88)	4,90 (3,77 - 6,93)	1,40 (0,76 - 1,81)	arredondado
Média	6,20 c	4,76 c	1,31 c	
(FGG)				
SE26	9,12 (7,33 - 10,66)	6,57 (5,33 - 8,22)	1,40 (1,02 - 1,71)	lobulado
SE27	6,26 (4,48 - 8,04)	4,85 (3,33 - 6,22)	1,30 (0,82 - 1,82)	lobulado
SE29	9,33 (7,11 - 11,99)	5,99 (4,66 - 8,11)	1,59 (1,00 - 2,30)	lobulado
SE30	8,88 (6,88 - 11,59)	5,94 (3,66 - 7,22)	1,53 (1,01 - 2,35)	lobulado
Média	8,40 a	5,83 a	1,46 b	

^x amplitude; y - médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si o nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Cada um dos isolados diferenciou apressórios com formatos caracteristicamente diferentes. Os apressórios produzidos pelos isolados do grupo SGO eram predominantemente clavados, os de KLA, arredondados e no grupo FGG, predominavam os lobulados. Embora alguns isolados tenham diferenciados apressórios bastante uniformes, outros o produziram com formatos variados, embora em número significativamente menor. A maior uniformidade quanto ao formato dos apressórios foi observada entre os isolados do grupo KLA.

4.3. Caracterização eletroforética de isolados de *C. gloeosporioides*.

O diagrama correspondente aos perfis eletroforéticos de esterase obtidos de vários isolados de *C. gloeosporioides* encontra-se na Figura 1.

Pela análise do número, posição e intensidade das bandas eletroforéticas verifica-se que os isolados do grupo SGO, representados por LA2, LA3 e LA5 apresentaram quatro bandas. A mobilidade relativa (R_m) da enzima para estes isolados variou de 0,4 - 0,8 a 3,9 - 4,1, apresentando ainda duas bandas complementares intermediárias de R_m 1,1 - 1,4 e 2,2 - 2,7. As bandas de maior intensidade foram a primeira, de maior definição, e a quarta, cuja intensidade foi inferior em relação à primeira. As demais bandas apresentaram intensidades mais fracas. Para o isolado LA7, as bandas de maior intensidade foram a primeira, mais forte, e a segunda. Já para o isolado LA8, a banda localizada entre 1,1 - 1,4, comum nos outros isolados do grupo,

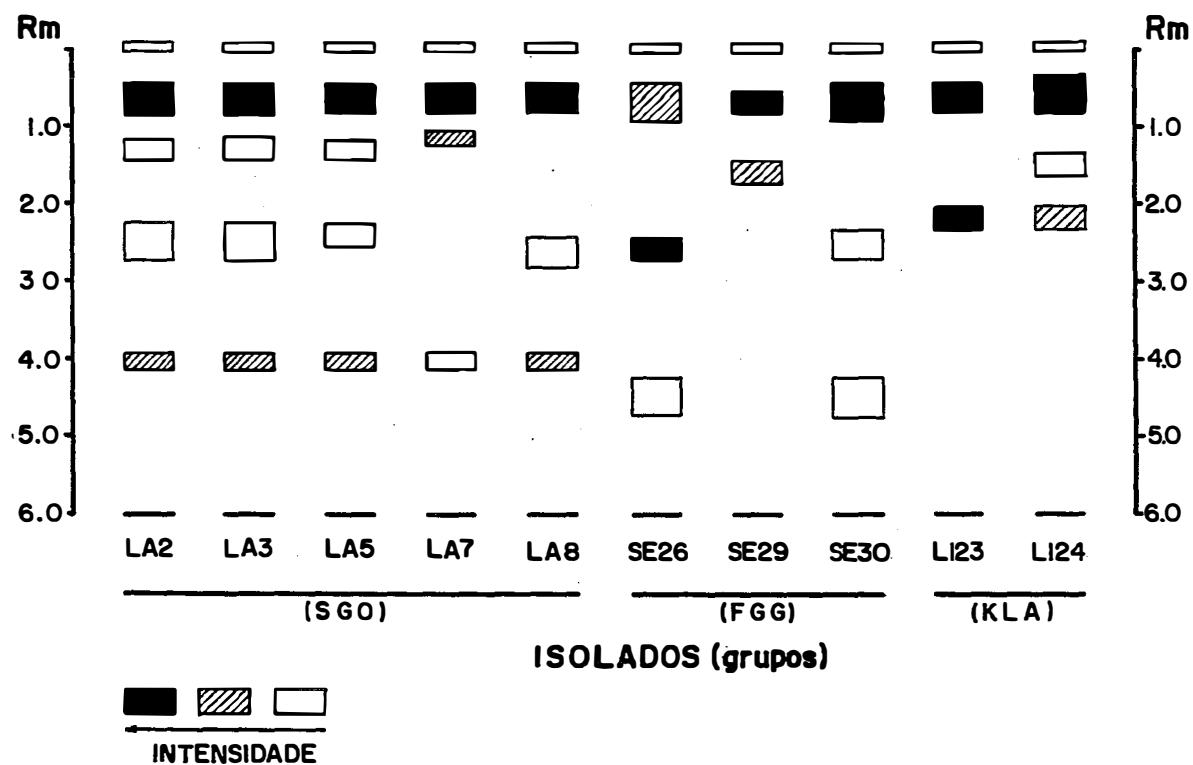


Figura 1 - Diagrama dos perfis eletroforéticos de esterase e mobilidade relativa (R_m) de isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO (LA2, LA3, LA5, LA7, LA8), KLA (LI23, LI24) e FGG (SE26, SE29, SE30).

não foi observada, apesar deste apresentar as demais características dos perfis comuns a SGO.

Para os isolados do grupo FGG, representados por SE26 e SE30, verificou-se a presença de três bandas. A primeira, de maior intensidade continha Rm de 0,4 - 0,9, ao passo que a segunda, de menor intensidade, variou de 2,2 - 2,7. A terceira banda foi de baixa intensidade e o seu Rm foi de 4,2 - 4,7. Para o isolado SE26 houve inversão quanto à intensidade das bandas, sendo a segunda de maior definição. Já em relação ao isolado SE29, verificou-se que, embora este tenha apresentado uma banda com característica similar às demais, como foi o caso da primeira, apresentou também uma banda de mobilidade 1,4 - 1,6, de definição intermediária, a qual não foi verificada em SE26 e SE30. Contrariamente, duas outras bandas verificadas nestes isolados não foram visualizadas em SE29.

Em relação aos isolados do grupo KLA, representado por LI23 e LI24, foi observada a presença de duas bandas características, sendo a primeira de Rm 0,3 - 0,8, de maior intensidade, e a segunda com mobilidade de 2,0 - 2,3, de menor intensidade. Além disso, no perfil eletroforético do isolado LI24, foi também observada a presença de uma banda complementar de Rm 1,3 - 1,6 de baixa intensidade.

Analisando conjuntamente os perfis eletroforéticos obtidos, verifica-se a presença de uma banda de mobilidade de 0,4 - 0,8, freqüentemente de alta intensidade, comum a todos os isolados de *C. gloeosporioides*, independente dos grupos que provieram. Por outro lado, observa-se que todos os isolados do grupo SGO apresentaram uma banda de Rm 3,9 - 4,1, característica apenas para este grupo, indicando ser

diferenciadora em relação a KLA e FGG. No grupo FGG, a presença de uma banda de Rm 4,2 - 4,7, comum apenas neste grupo, evidencia também ser a mesma diferenciadora em relação aos demais grupos analisados.

O diagrama densitométrico do padrão de esterase exibido pelos isolados analisados encontra-se sumarizado na Figura 2. Para representação dos isolados foram utilizados os respectivos grupos nos quais os isolados encontram-se agrupados. Os valores correspondentes ao número, tamanho e posição das bandas podem ser comprovados através das características densitométricas observadas.

4.4. Efeito da temperatura no crescimento micelial de isolados de *C.*

gloeosporioides

Observa-se através da Tabela 11 que, independente das temperaturas avaliadas, os isolados SE27 e SE31 apresentaram sempre maior crescimento de colônias, diferindo significativamente dos demais isolados. Nas temperaturas de 15, 20 e 25°C as colônias destes isolados foi superior a 50% em relação aos demais. Já a 30°C, o tamanho das colônias dos isolados SE27 e SE31 foi cerca de três vezes superior aos demais. Nesta temperatura, todos os três grupos diferiram significativamente entre si sendo o menor tamanho de colônias observado entre os isolados pertencentes ao grupo SGO. À temperatura de 32°C houve significativa redução do crescimento das colônias de LA27 e LA31 e tornou limitante para os demais isolados, cujo desenvolvimento foi muito escasso, independente dos grupos analisados.

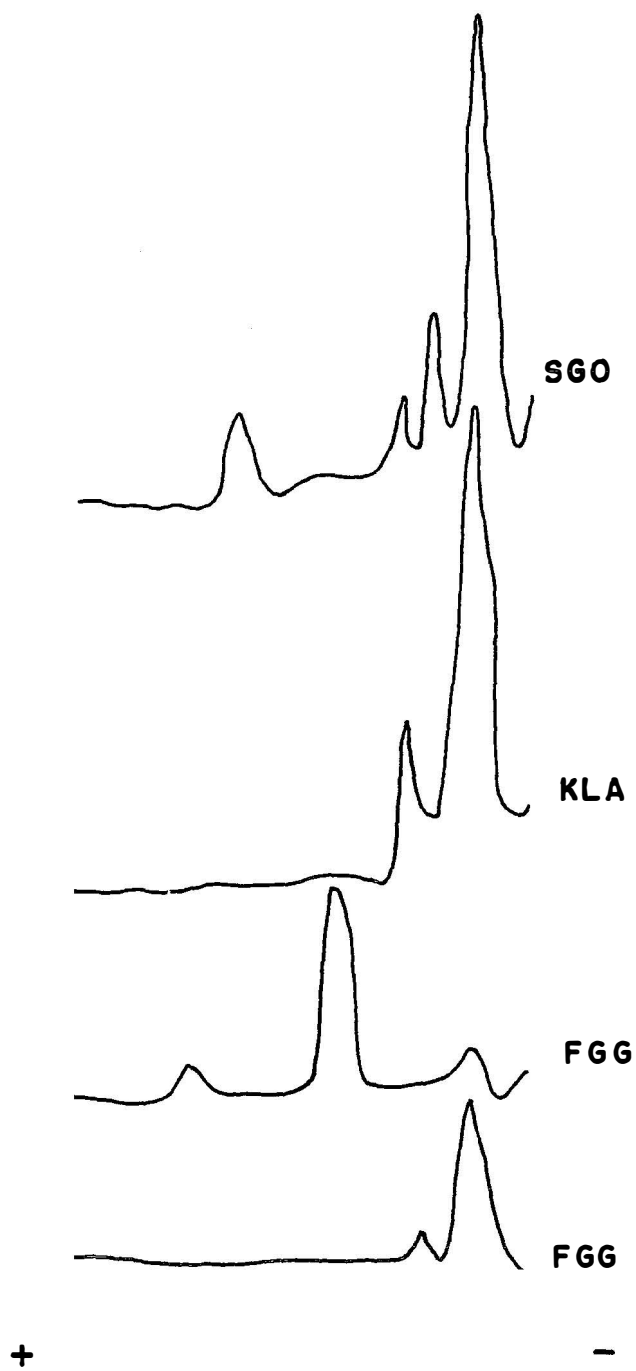


Figura 2 - Diagrama densitométrico (540 nm) do padrão de esterase dos isolados pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG.

Tabela 11 - Tamanho de colônias (mm) de sete isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG, em diferentes temperaturas, após 120 h de incubação.

Isolados (grupos)	Temperatura (°C)				
	15	20	25	30	32
(SGO)					
LA2	17,62 ± 1,97 ^x	29,62 ± 2,05	36,87 ± 1,03	11,75 ± 0,50	0,0 ± 0,0
LA3	19,50 ± 0,70	28,12 ± 0,62	36,31 ± 1,10	10,62 ± 2,68	1,50 ± 0,57
LA7	21,50 ± 0,57	28,37 ± 0,75	36,87 ± 0,62	13,62 ± 1,79	2,0 ± 0,0
Média ^y	19,54 bC	28,70 bB	36,10 bA	12,00 cD	1,16 bE
(KLA)					
LI19	23,87 ± 0,62	28,87 ± 0,85	37,50 ± 1,47	15,75 ± 1,50	1,50 ± 0,57
LI23	18,62 ± 2,13	27,37 ± 2,42	36,25 ± 1,32	19,50 ± 3,51	2,75 ± 0,95
Média	21,25 bC	28,12 bB	36,87 bA	17,62 bD	2,12 bE
(FGG)					
SE27	35,87 ± 3,42	53,00 ± 7,24	57,62 ± 2,49	53,37 ± 1,10	31,87 ± 1,93
SE31	35,50 ± 1,00	50,50 ± 1,29	62,37 ± 3,63	56,50 ± 1,91	16,50 ± 1,29
Média	35,68 aC	51,75 aB	60,0 aA	54,93 aAB	24,18 aD

x - desvio padrão; y - médias seguidas pela mesma letra (minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas) não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com exceção à temperatura de 30°C, o comportamento entre os isolados dos grupos SGO e KLA foi semelhante, mostrando as mesmas tendências nas temperaturas favoráveis e desfavoráveis ao desenvolvimento das colônias.

Analisando o comportamento dos grupos em relação às diferentes temperaturas, observa-se que o maior tamanho de colônias para SGO e KLA ocorreu a 25°C, diferindo estatisticamente das demais temperaturas. Para o grupo FGG, o maior crescimento das colônias também foi a 25°C, embora não tenha diferido estatisticamente à temperatura de 30°C.

A temperatura ótima para o desenvolvimento das colônias dos isolados, estimada através de regressão não linear e ajustada pela função beta (Equação 1), encontra-se representada na Figura 3 onde se verifica que, para os isolados LA2, LA3 e LA7, a temperatura ótima encontra-se na faixa de 22 a 24°C; para os isolados LI19 e LI23 a faixa de temperatura ótima situou-se entre 22 - 24°C e 24 - 25°C, respectivamente (Figura 4). A faixa de temperatura ótima estimada para os isolados SE27 e SE31 foi respectivamente, 25 - 27°C e 26 - 28°C (Figura 5).

Adotando-se os mesmos procedimentos anteriores e realizando-se a comparação da temperatura ótima, de acordo com os grupos correspondentes, verifica-se que para SGO a faixa ideal de crescimento é de 22 - 24°C, para KLA, de 23 - 25°C e FGG, de 25 - 27°C. A curva que representa a faixa ideal para crescimento das colônias dos isolados pertencentes a estes grupos encontra-se representada nas Figura 6.

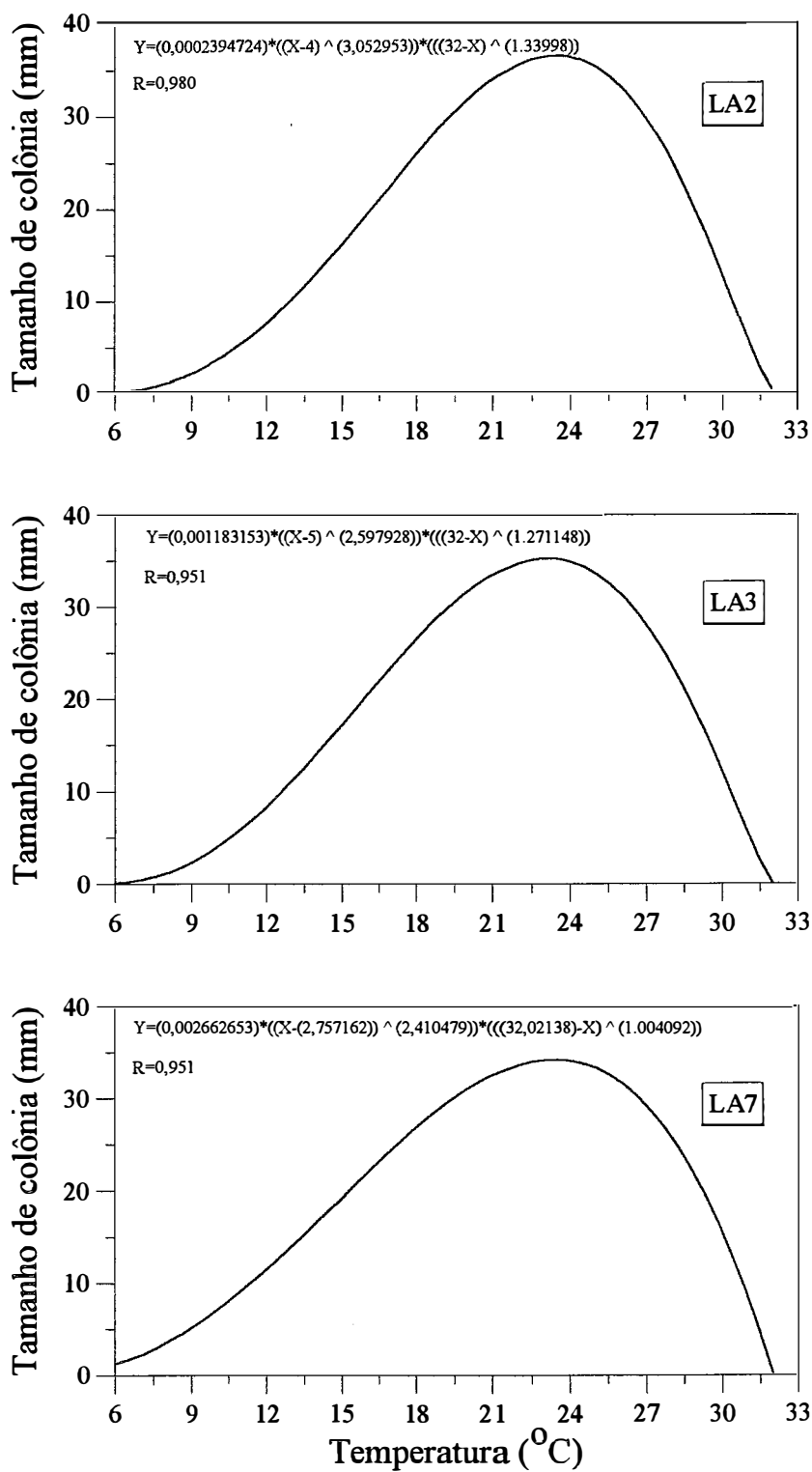


Figura 3 - Crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes ao grupo SGO sob diferentes temperaturas.

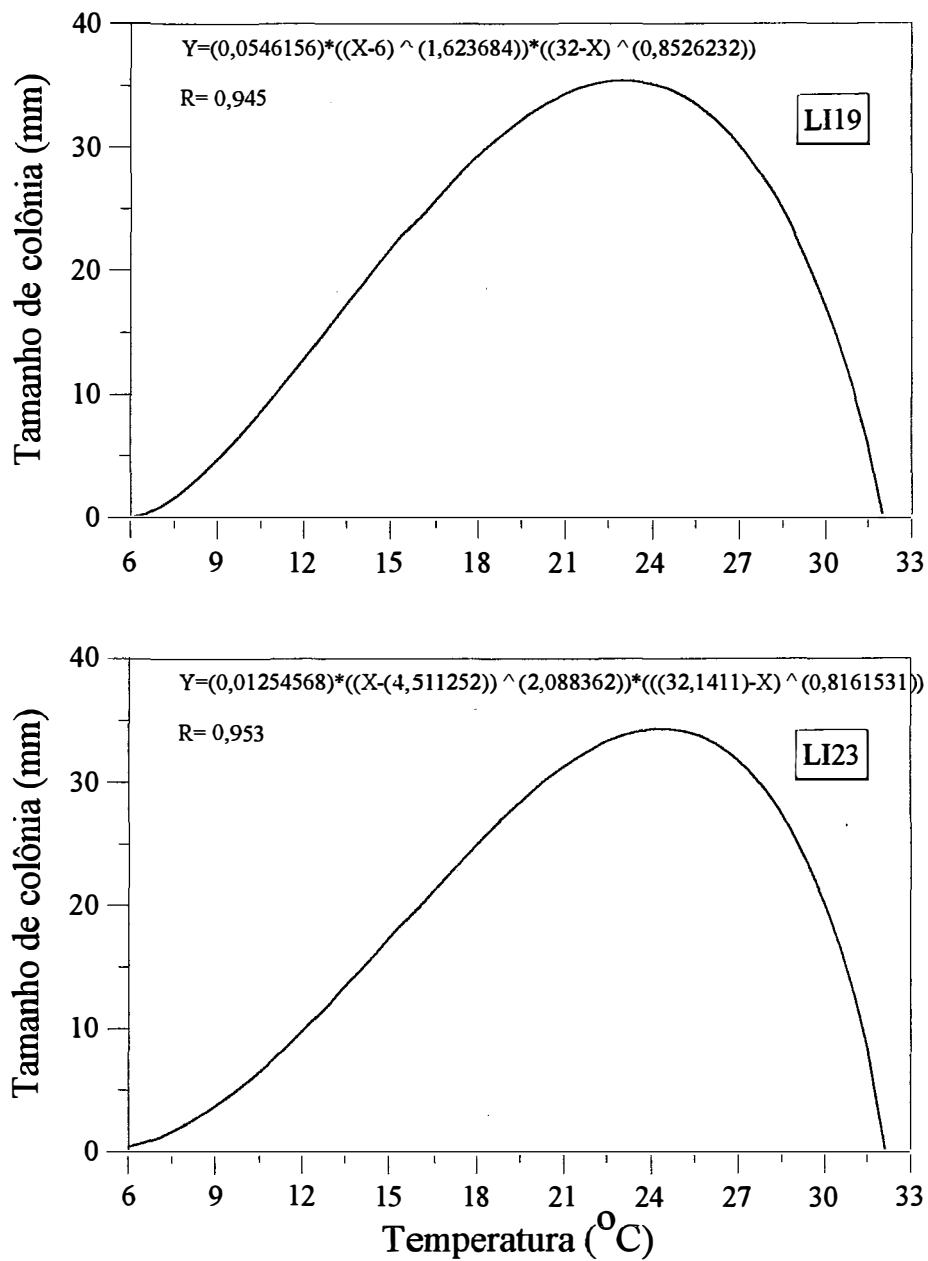


Figura 4 - Crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes ao grupo KLA sob diferentes temperaturas.

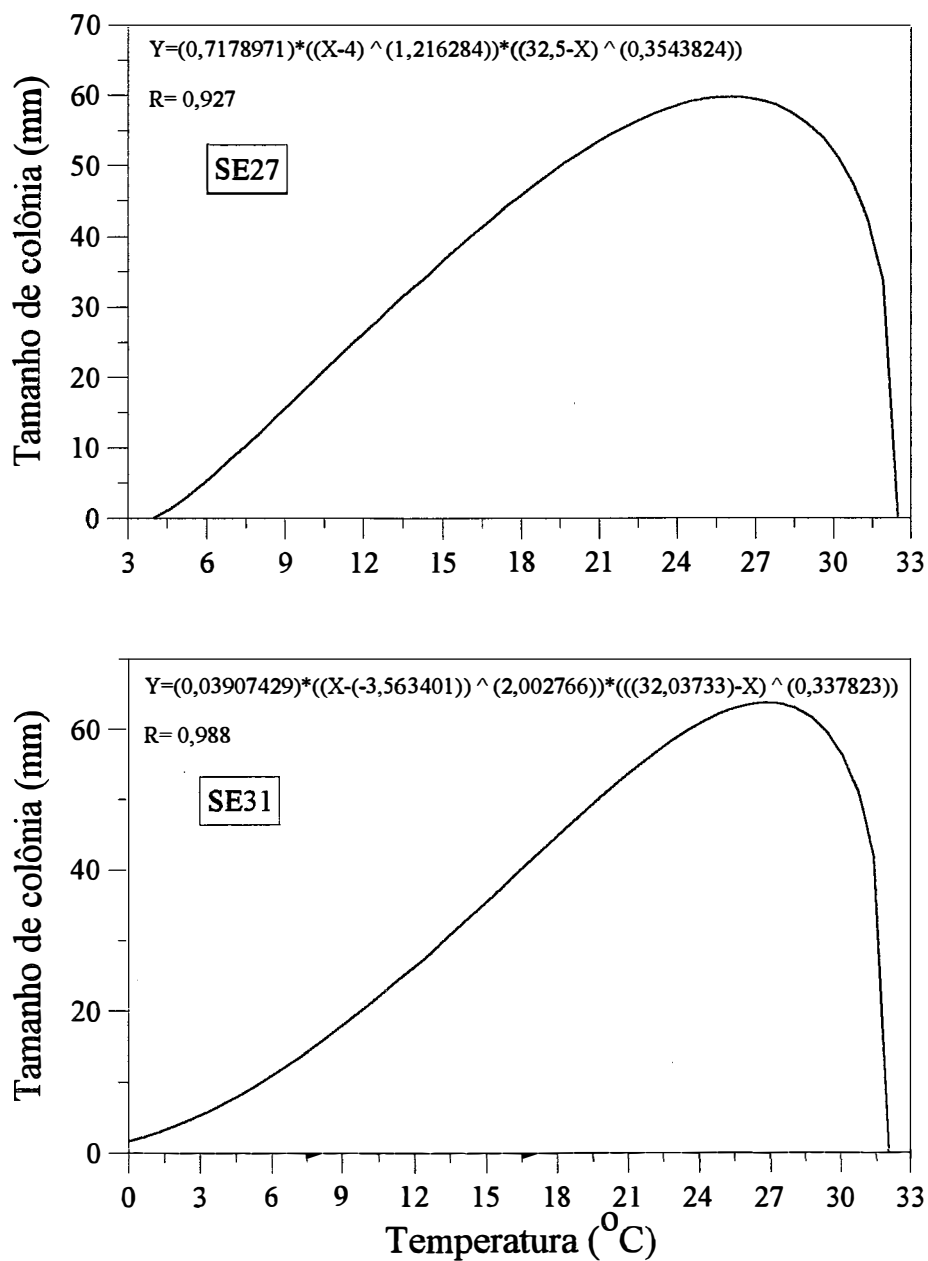


Figura 5 - Crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes ao grupo FGG sob diferentes temperaturas.

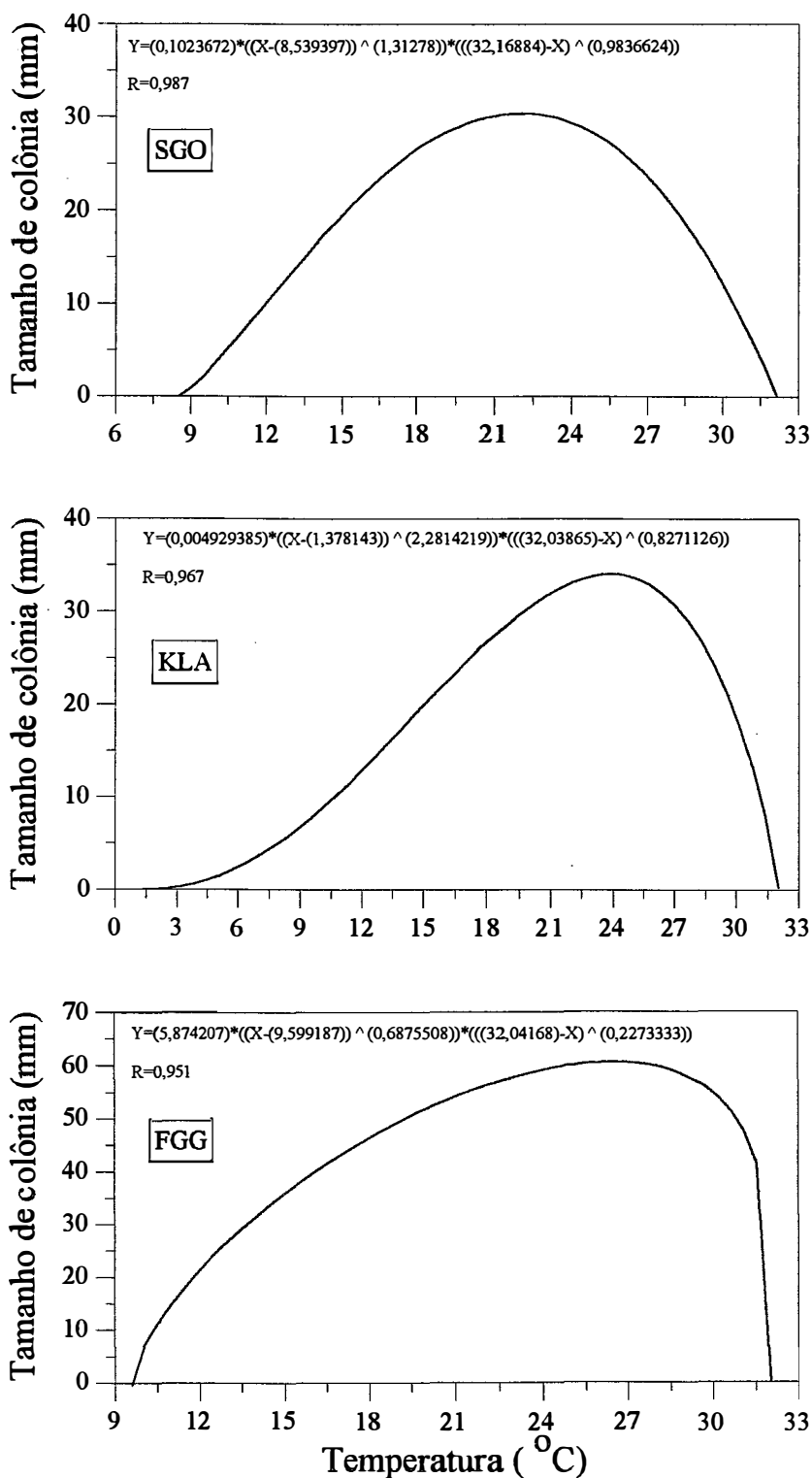


Figura 6 - Comparação do crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG, sob diferentes temperaturas.

4.5. Controle de *C. gloeosporioides*

4.5.1. Sensibilidade de *C. gloeosporioides* in vitro

4.5.1.1. Avaliação do efeito de diferentes concentrações de benomyl no crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG.

Os dados referentes ao crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG, em relação a diferentes doses de benomyl, encontram-se na Tabela 12.

Na ausência de fungicida, os isolados pertencentes aos grupos FGG (SE28 e SE31) tiveram maior desenvolvimento micelial, diferindo estatisticamente de SGO (LA2, LA4, LA9 e LA12) e KLA (LI19 e LI25). Entre os grupos SGO e KLA, ambos apresentaram praticamente o mesmo crescimento e não diferiram significativamente entre si.

Tabela 12 - Efeito de diferentes doses de benomyl no tamanho de colônias de oito isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG, após 72 h de incubação.

Isolados (grupos)	Tamanho de colônias (mm) nas concentrações ($\mu\text{g/ml}$) ^x			
	0	1	10	100
(SGO)				
LA2	35,83 b	17,16 bc	16,16 ab	15,00 bc
LA4	34,83 bc	14,66 c	14,66 bc	16,00 ab
LA9	35,83 b	16,16 bc	14,66 bc	12,83 bc
LA12	31,00 c	10,66 d	12,00 c	11,83 c
Média	34,37 bA	14,66 bB	14,37 bB	13,91 bB
(KLA)				
LI19	34,00 bc	19,66 ab	18,50 ab	16,16 ab
LI25	31,33 c	21,50 a	19,16 a	19,83 a
Média	32,66 bA	20,58 aB	19,25 aB	17,99 aB
(FGG)				
SE28	41,66 a	0,0 e	0,0 c	0,0 d
SE31	42,33 a	0,0 e	0,0 c	0,0 d
Média	41,99 aA	0,0 cB	0,0 cB	0,0 cB

x - médias seguidas pela mesma letra (minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas) não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A 1 $\mu\text{g/ml}$, o maior crescimento médio das colônias foi observado entre os isolados do grupo KLA seguido de SGO. Os isolados pertencentes a estes grupos diferiram estatisticamente entre si e também em relação aos do grupo FGG. Nesta concentração, os isolados do grupo FGG mostraram-se altamente sensíveis ao fungicida, não sendo observado crescimento micelial. A 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$, os isolados do grupo KLA

exibiram as mesmas tendências observadas a 1 $\mu\text{g/ml}$, apresentando maior desenvolvimento de colônias em relação aos do grupo SGO.

Para os grupos SGO e KLA, o tamanho das colônias observadas entre 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ foi praticamente o mesmo, não se observando diferença significativa entre eles. Os isolados do grupo FGG mostraram-se altamente sensíveis, observando-se grande inibição a partir de 1 $\mu\text{g/ml}$.

O comportamento (tamanho de colônias) de cada um dos isolados às diferentes doses de benomyl encontra-se representado nas Figuras 7 e 8. Os isolados SE28 e SE31, por se mostrarem altamente sensíveis a partir de 1 $\mu\text{g/ml}$ não foram incluídos entre os apresentados.

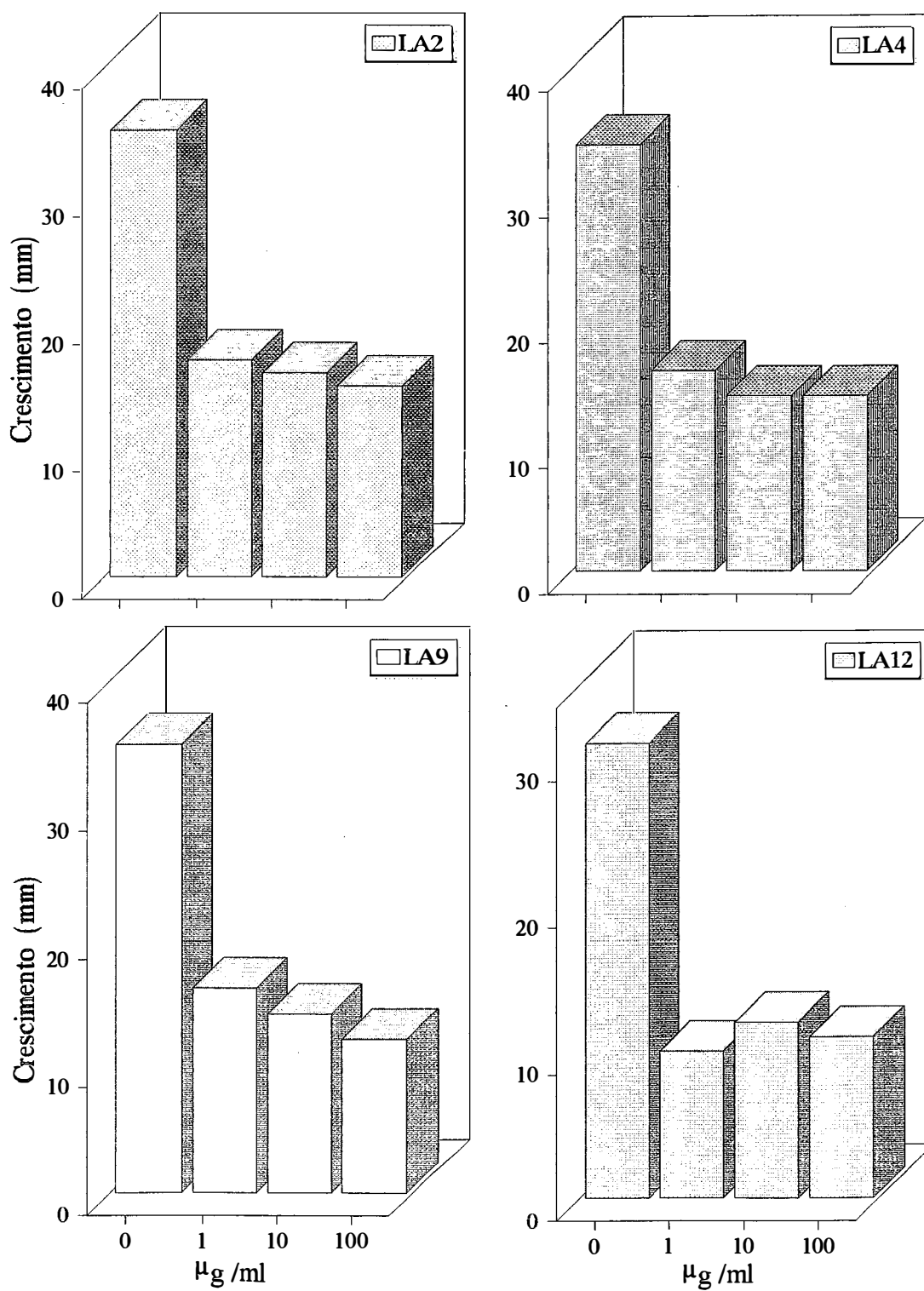


Figura 7. Crescimento micelial de quatro isolados de *C.gloeosporioides* pertencentes ao grupo SGO em diferentes doses de benomyl.

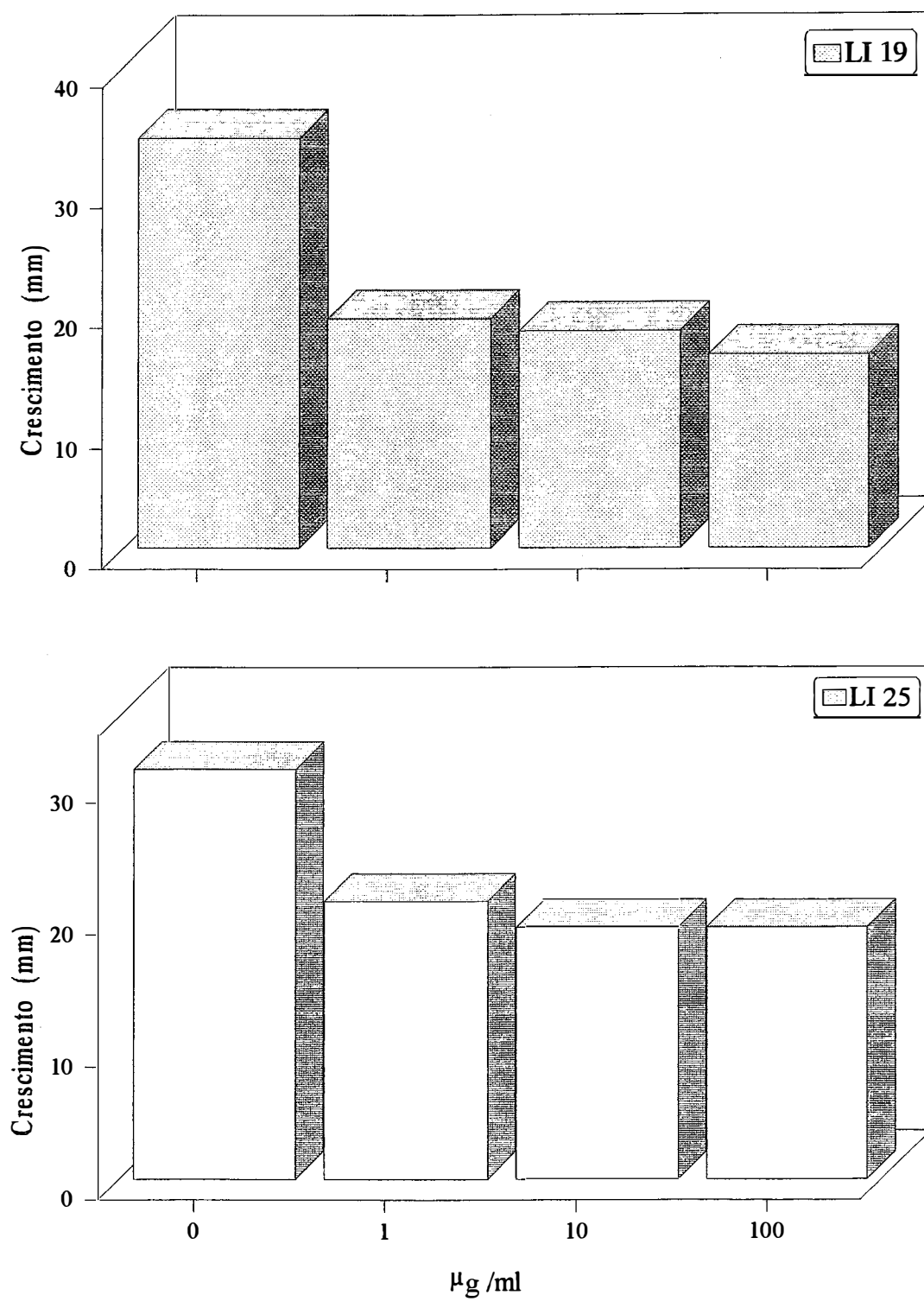


Figura 8. Crescimento micelial de dois isolados de *C.gloeosporioides* pertencentes ao grupo KLA em diferentes doses de benomyl.

4.5.1.2. Efeito de benomyl em doses crescentes na inibição do crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides*

Pelos dados obtidos (Tabela 13) verifica-se que houve aumento na percentagem de inibição do crescimento micelial à medida em que se elevaram as doses do fungicida, embora não se tenha detectado diferença estatística entre as concentrações contendo 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ e entre 200 e 250 $\mu\text{g/ml}$. As doses de 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ apresentaram atividade inibitória intermediária, não diferindo estatisticamente entre si, porém, sendo significativamente diferente das demais. A maior inibição foi observada a 2500 $\mu\text{g/ml}$.

Em relação ao comportamento individual, observa-se que todos os três isolados testados mostraram-se altamente insensíveis ao fungicida, apresentando crescimento micelial até a 2500 $\mu\text{g/ml}$ de benomyl. Analisando a percentagem de inibição média dos isolados, verifica-se que LA2 e LA3 apresentaram o mesmo comportamento estatístico, não diferindo entre si, mostrando-se, porém, significativamente diferentes de LA5, o qual teve um nível de insensibilidade menos elevado.

Tabela 13 - Inibição do crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides* sob diferentes concentrações de benomyl após 72 h de incubação.

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Inibição do crescimento micelial (%) dos isolados			Média ^x
	LA2	LA3	LA5	
0	0.0	0.0	0.0	0.0 a
100	48.86	52.67	55.57	52.37 b
200	55.07	53.50	57.41	55.32 bc
250	56.39	54.78	56.50	55.89 c
500	61.24	58.57	62.98	60.93 d
1000	60.37	64.81	66.36	63.94 d
2500	85.79	82.41	89.19	85.90 e
Média ^x	52.53 B	52.39 B	55.47 A	

x - médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

4.5.1.3. Efeito de benomyl na esporulação de isolados de *C. gloeosporioides* sob condições *in vitro*

Analisando os dados contidos na Tabela 14 observa-se que no tratamento que não foi incluído fungicida no meio de cultura, todos os isolados apresentaram praticamente o mesmo nível quanto ao número de conídios produzidos, com exceção apenas de LA2, que diferiu estatisticamente de LA3 e LA6. O número de conídios produzidos por estes isolados foram 7,85, 29,04 e 29,68 x 10⁵ conídios/ml, respectivamente.

Na presença de meio de cultura preparado na concentração a 10 µg/ml, o isolado LA4 foi o que produziu maior número de conídios, embora estatisticamente não tenha diferido de LA3, LI22, LA14 e LA2. Já a 100 µg/ml, o maior número de conídios foi obtido pelo isolado LI22, embora este tenha se comportado significativamente semelhante a LA3, LA4 e LA11. Nesta concentração, a menor esporulação foi obtida pelo isolado LA9 o qual diferiu significativamente de LI22 e LA3 porém, foi estatisticamente semelhantemente aos demais isolados.

Comparando-se a esporulação obtida na dose zero com aquela a 10 µg/ml, observa-se que com exceção dos isolados LA6, LA9 e LA11, todos os demais apresentaram um incremento estatisticamente significativo no número de conídios produzidos. Entre estas, duas concentrações verificou-se que o número médio produzido variou de 20,49 x 10⁵ conídios/ml 47,17 x 10⁵ conídios/ml. Esta diferença

Tabela 14 - Efeito de doses de benomyl na esporulação de dez isolados de *C. gloeosporioides* após 102 h de incubação.

Isolados	Esporulação ($\times 10^5$ conídios/ml) nas doses ($\mu\text{g/ml}$) ^y		
	0	10	100
LA2	7,85 bB	52,00 aABCD	8,93 bBC
LA3	29,04 bA	60,49 aAB	29,36 bAB
LA4	9,62 cAB	64,94 aA	25,75 bABC
LA6	29,68 aA	42,30 aBCD	17,38 bBC
LA9	20,57 abAB	31,74 aD	6,0 bC
LA11	27,88 aAB	40,44 aBCD	25,68 aABC
LA12	18,61 bAB	37,43 aCD	15,25 bBC
LA14	25,36 bAB	50,05 aABCD	19,86 bBC
LA17	17,06 bAB	38,18 aCD	19,99 bBC
LI22	19,24 aAB	54,12 aABC	46,12 aA
Média ^x	20,49 b	47,17 a	21,43 b

y - médias seguidas pela mesma letra (minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas) não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

significa que houve um incremento de cerca de 130% no número de conídios produzidos em meio contendo 10 µg/ml do fungicida.

Por outro lado, comparando-se o número de conídios produzidos a 10 µg/ml com os produzidos a 100 µg/ml, nota-se que, de um modo geral, houve uma redução significativa do número de conídios produzidos praticamente para todos os isolados avaliados, exceto para LA11 e LI22, os quais mantiveram um nível de esporulação elevado em todas as concentrações avaliadas. A redução do número de conídios a 100 µg/ml comparado àquele produzido a 10 µg/ml foi de cerca de 120%.

Nesta experimentação, embora o grupo KLA de *C. gloeosporioides* estivesse sido representado apenas pelo isolado LI22, comparando-se o número de conídios produzidos por este, com aqueles do grupo SGO, que foi constituído pelos demais, observa-se que o comportamento de ambos foi muito semelhante, embora a sua esporulação tenha se mantido excepcionalmente elevada a 100 µg/ml de benomyl.

4.5.1.4. Efeito de doses crescentes de benomyl no crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de pomares com históricos diferentes quanto à utilização daquele fungicida

Observa-se através da Tabela 15 que houve diferença significativa de efetividade entre as doses de benomyl avaliadas, cujo maior percentual de inibição foi verificado na concentração mais elevada (500 µg/ml). Embora tenha sido constatada

diferença estatística entre 500 µg/ml e as demais, verifica-se que não houve diferença significativa entre 100, 200 e 250 µg/ml.

Tabela 15 - Efeito de doses de benomyl na inibição do crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de pomares com históricos diferentes quanto à utilização daquele fungicida.

Isolados	Inibição do crescimento micelial (%) nas doses (µg/ml) ^x					Média ^y
	0	100	2.00	250	500	
LA10	0,0 b	43,01 a	42,85 a	43,77 a	45,28 a	34,98 B
LA14	0,0 d	43,56 c	46,67 ab	43,90 bc	47,96 a	36,42 A
LA18	0,0 b	43,36 a	43,66 a	43,66 a	45,70 a	35,27 AB
Média ^y	0,0 a	43,31 b	44,39 b	43,77 b	46,31 c	

x - dados transformados em $\text{arc sen} \sqrt{x/100}$; y - médias seguidas pela mesma letra (minúscula na linha e maiúscula na coluna) não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quanto à sensibilidade dos isolados verifica-se através da média de inibição do crescimento micelial, que houve diferença significativa entre LA10 e LA14, para os quais os percentuais de inibição foram de 34,98 e 36,42%, respectivamente. Já o isolado LA18 apresentou comportamento estatístico intermediário, não diferindo significativamente dos demais isolados.

Analisando os antecedentes de cada isolado e comparando com o seu respectivo nível de sensibilidade, observa-se que LA10, obtido de pomar cuja utilização de benomyl tem sido regular nos últimos anos, inclusive sendo aplicado há cerca de três meses do isolamento do fungo, apresentou um nível de sensibilidade inferior àquele de LA14, obtido de pomar sem antecedentes da utilização de fungicidas benzimidazóis nos últimos anos. Por outro lado, o isolado LA18, obtido de pomar que recebeu apenas uma pulverização de benomyl cerca de três meses antes do seu isolamento, apresentou um nível intermediário de sensibilidade, não diferindo estatisticamente dos demais isolados.

Analisando conjuntamente o nível de sensibilidade e os antecedentes de cada isolado em termos de exposição ao fungicida, embora o estudo tenha se restringido a uma amostra pequena, notou-se uma tendência de que uma maior exposição ao fungicida conduziu a uma redução do nível de sensibilidade do isolado.

4.5.1.5. Eficiência de fungicidas pertencentes a diferentes grupos químicos na inibição de *C. gloeosporioides*

Os dados referentes à percentagem média de inibição do crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides* em diferentes concentrações de benomyl, chlorothalonil, folpet, mancozeb, prochloraz e tebuconazole são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Inibição do crescimento micelial de três isolados de *C.gloeosporioides* a diferentes doses de seis fungicidas após 96 h de incubação.

Tratamentos	Inibição (%) e doses ($\mu\text{g/ml}$)					Média ^y
	0	1	10	100	200	
Benomyl	0,0f	52,33c	50,57b	52,88b	53,59b	41,87c
Chlorothalonil	0,0f	7,73e	13,99d	33,23c	38,10c	18,61e
Folpet	0,0f	1,05f	16,71d	54,05b	56,67b	25,69d
Mancozeb	0,0f	13,05d	21,75c	100,0a	100,0a	46,96b
Prochloraz	0,0f	91,03b	100,0a	100,0a	100,0a	78,20a
Tebuconazole	0,0f	95,69a	100,0a	100,0a	100,0a	79,13a

x- média de inibição do crescimento micelial de três isolados; y - médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na dose de 1 $\mu\text{g/ml}$ todos os produtos diferiram significativamente entre si, destacando-se os fungicidas prochloraz e tebuconazole, que inibiram, em média, mais de 90% do crescimento micelial dos isolados. Já o benomyl, nesta concentração, inibiu cerca de 50%, enquanto os demais produtos mostraram-se pouco eficientes, apresentando um percentual de inibição muito baixo. O fungicida folpet foi o que demonstrou menor eficiência.

A 10 $\mu\text{g/ml}$, prochloraz e tebuconazole inibiram completamente o crescimento micelial, confirmando a alta sensibilidade dos isolados já verificada a 1 $\mu\text{g/ml}$. Naquela concentração, o benomyl apresentou o mesmo nível de inibição verificado a 1 $\mu\text{g/ml}$, enquanto os demais fungicidas apesar de exibirem uma melhoria no percentual de inibição, mostraram eficácia ainda muito baixa.

A 100 $\mu\text{g/ml}$, mancozeb inibiu completamente o crescimento micelial exibindo, portanto, a mesma eficiência de prochloraz e tebuconazole a 10 $\mu\text{g/ml}$. Nesta dose não houve diferença significativa entre benomyl e folpet, cujo percentual de inibição foi de 52,88 e 54,05%, respectivamente. O fungicida que se mostrou menos eficiente foi o chlorothalonil, com 33,23% de inibição do crescimento micelial.

A 200 $\mu\text{g/ml}$, o comportamento estatístico dos fungicidas foi semelhante ao observado a 100 $\mu\text{g/ml}$, onde benomyl e folpet não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram um percentual de inibição de 53,59 e 56,67%, respectivamente. Para o chlorothalonil foi observado praticamente o mesmo desempenho verificado a 10 $\mu\text{g/ml}$, apresentando uma inibição de 38,10%.

Comparando a média geral de inibição de todos os produtos avaliados verifica-se que prochloraz e tebuconazole foram os mais eficientes, não diferindo significativamente entre si sendo, porém, estatisticamente diferente dos demais. Mancozeb e benomyl, apesar de serem significativamente diferentes entre si, apresentaram eficiência intermediária, cuja inibição foi de 46,96 e 41,87%, respectivamente.

Analisando a relação entre as doses e inibição, verifica-se que para todos os fungicidas houve um incremento de eficiência à medida que se elevaram as doses. Este incremento embora variável foi, no entanto, muito expressivo em tebuconazole, prochloraz e mancozeb. Em relação ao benomyl, estes incrementos foram muito pequenos, não havendo diferença estatística quanto à eficiência verificada entre 1 e 200 $\mu\text{g/ml}$.

O comportamento dos isolados LA2, LA3 e LA7 em relação às doses dos fungicidas chlorothalonil, folpet e mancozeb foram determinados através de análise de regressão polinomial quadrática. Estes resultados encontram-se representados nas Figuras 9 a 11. Quanto à benomyl, prochloraz e tebuconazole, estes não foram incluídos devido terem apresentado um baixo coeficiente de determinação.

Os valores de ED_{50} para os fungicidas chlorothalonil, folpet e mancozeb foram estimados através da equação de regressão. Para benomyl, prochloraz e tebuconazole as estimativas foram baseadas na percentagem de inibição média observada a 1 $\mu\text{g/ml}$. Os valores de ED_{50} encontram-se na Tabela 17.

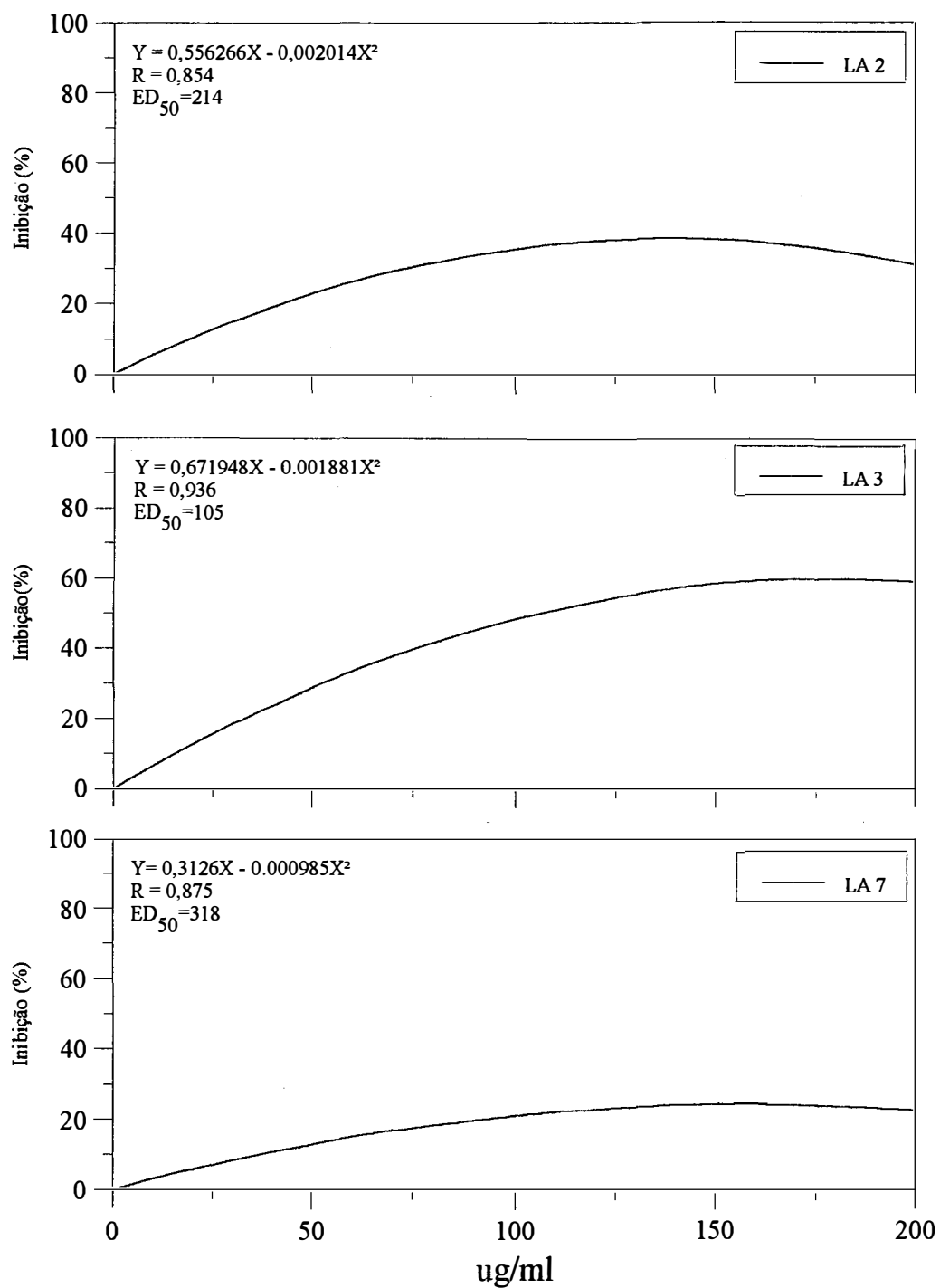


Figura 9 - Efeito de doses crescentes de chlorothalonil na inibição do crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes ao grupo SGO.

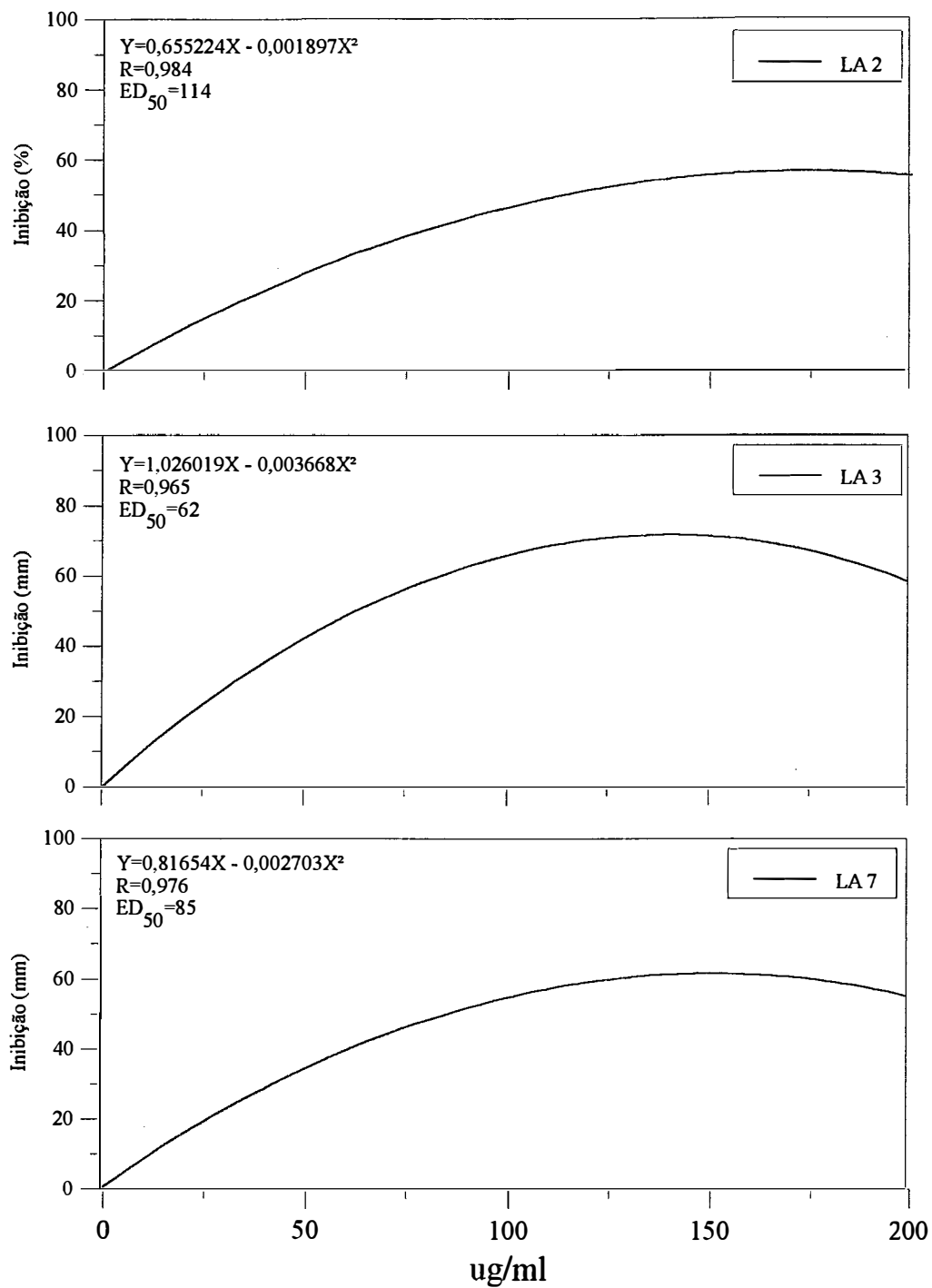


Figura 10 - Efeito de doses crescentes de folpet na inibição do crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes ao grupo SGO.

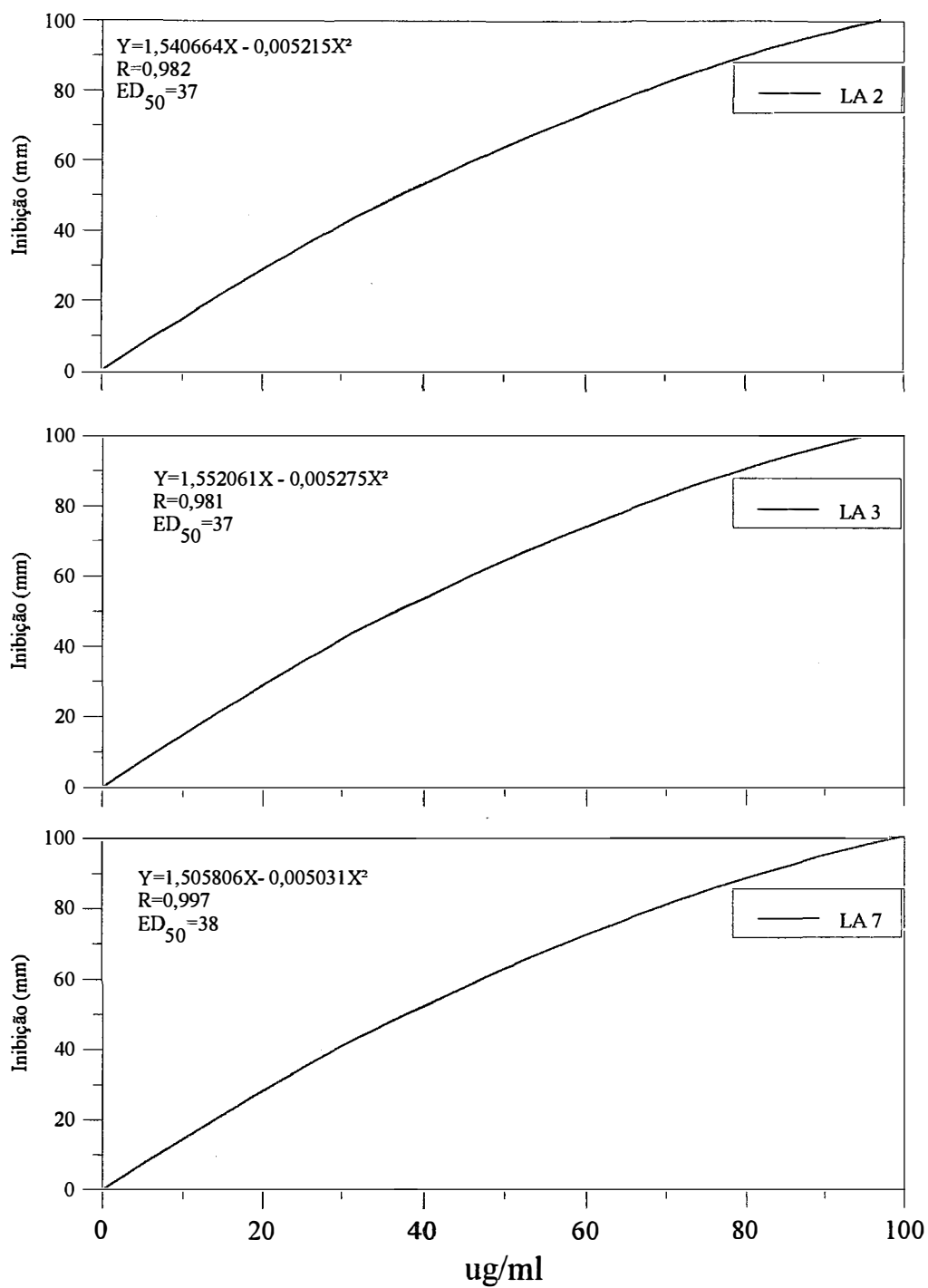


Figura 11 - Efeito de doses crescentes de mancozeb na inibição do crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes ao grupo SGO.

Tabela 17 - ED₅₀ de seis fungicidas testados para a inibição do crescimento micelial de três isolados de *C. gloeosporioides*.

Fungicidas	Isolados			Média
	LA2	LA3	LA7	
Benomyl ^y	<1	<1	<1	<1
Chlorothalonil ^x	214	105	318	212
Folpet ^x	85	62	114	87
Mancozeb ^x	37	37	38	37
Prochloraz ^y	<1	<1	<1	<1
Tebuconazole ^y	<1	<1	<1	<1

x - estimativa determinada através de regressão quadrática dos valores de inibição do crescimento micelial; y - estimativa determinada através de observação das doses que apresentaram 50% de inibição do crescimento micelial, comparado com a testemunha.

Analisando os valores estimados de ED₅₀, observa-se que os produtos que apresentaram maior fungitoxicidade inerente foram benomyl, prochloraz e tebuconazole, cujos índices foram inferiores a 1 µg/ml. Para os demais produtos, os ED₅₀ estimados foram de 37, 87 e 212, correspondentes a mancozeb, folpet e chlorothalonil, respectivamente.

Em função das estimativas de ED₅₀, a eficiência dos grupos químicos correspondentes aos fungicidas avaliados pode ser discriminada em ordem decrescente da

seguinte forma: 1 - benzimidazol, imidazol e triazol; 2 - carbamato; 3 - ftalimida; 4 - ftalonitrila.

4.5.2. Controle de *C. gloeosporioides* em pomares

4.5.2.1. Efeito de diversos fungicidas no controle de *C. gloeosporioides* em plantas de laranja ‘Folha Murcha’

Pelos dados obtidos (Tabela 18) verifica-se que, em relação ao número médio de frutos efetivos (NMFE), o tratamento que se destacou foi o tebuconazole + Impress^R, embora não tenha diferido estatisticamente de benomyl, prochloraz, carbendazim e tiofanato metílico. Os tratamentos que se mostraram menos eficientes foram o mancozeb e anilazine, os quais foram estatisticamente semelhantes entre si e não diferiram significativamente da testemunha.

Analisando-se a produção verifica-se que, em relação ao número total de frutos, o tratamento que se mostrou mais eficiente foi o tebuconazole + Impress^R, embora estatisticamente não tenha diferido de carbendazim, benomyl, prochloraz e tiofanato metílico, cuja produção foi de 442, 390, 380, 353 e 308 frutos, respectivamente. O menor número de frutos foi observado nos tratamentos constituídos por mancozeb e anilazine, os quais não diferiram estatisticamente da testemunha. A produção destes tratamentos foi de 185, 229 e 104 frutos, respectivamente.

Tabela 18 - Efeito de vários fungicidas no número médio de frutos efetivos (NMFE) e na produção de laranja 'Folha Murcha', afetada pela QPFC, em condições de campo.

Tratamentos	NMFE (%) ^y	Produção ^x		
		Nº de frutos	Peso de frutos (kg)	Peso médio dos frutos (g)
Anilazine	11,56cde	229 bcd	70 bcd	308 a
Benomyl	25,21ab	380 ab	107 ab	283 a
Carbendazim	19,79abc	390 ab	110 ab	283 a
Mancozeb	6,24de	185 cd	54 cd	292 a
Prochloraz	20,56abc	353 abc	98 abc	283 a
Tebuconazole + Impress ^R	31,41a	442 a	124 a	281 a
Tiofanato metílico	18,27ab	308 abc	89 abc	290 a
Testemunha	2,72e	104 d	31 d	298 a

x - média de quatro repetições, cada parcela representada por 4 plantas; médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; y - dados reais transformados em $\sqrt{x/100}$.

Em relação ao peso de frutos, foram constatadas as mesmas tendências observadas quanto ao número de frutos produzidos, comprovando-se os níveis de eficiência detectados.

Quanto ao peso médio dos frutos não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos, indicando uma ausência de relação entre o nível de eficiência dos tratamentos e peso dos frutos obtidos.

Os valores do coeficiente de determinação (R^2), obtidos entre as variáveis NMFE (%) - número de frutos e NMFE - peso de frutos, foram 0,942 e 0,940, respectivamente, demonstrando, dessa forma, uma alta relação entre as mesmas.

4.5.2.2. Efeito de benomyl associado a diversos fertilizantes no controle de *C. gloeosporioides*.

Pelos dados obtidos (Tabela 19) observa-se que em relação ao número médio de frutos efetivos (NMFE), benomyl isoladamente ou em combinação com KNO_3 , foi o tratamento mais eficiente, embora não tenha diferido estatisticamente de benomyl acrescido de uréia ou de $ZnSO_4$. O KNO_3 apresentou comportamento intermediário e diferiu de uréia e $ZnSO_4$, os quais foram estatisticamente semelhantes à testemunha.

Tabela 19 - Efeito de benomyl aplicado isoladamente ou associado a diferentes fertilizantes no número médio de frutos efetivos (NMFE) e na produção de laranja 'Folha Murcha', afetada pela QPFC, em condições de campo.

Tratamentos	NMFE(%) ^y	Produção ^x		
		Nº total de frutos	Peso total de frutos (kg)	Peso médio dos frutos (g)
Benomyl	25,09a	447 a	124 a	279 ab
Benomyl + KNO ₃	26,63a	508 a	136 a	270 ab
KNO ₃	15,91b	405 a	115 a	284 ab
Benomyl + Uréia	20,61 ab	478 a	127 a	267 b
Uréia	0,0c	144 b	44 b	309 a
Benomyl + ZnSO ₄	19,18ab	422 a	119 a	282 ab
ZnSO ₄	0,0c	115 b	34 b	299 ab
Testemunha	0,0c	156 b	46 b	304 ab

x - média de quatro repetições, cada parcela representada por 4 plantas; médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; y -dados reais transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$.

Verificou-se que em todos os tratamentos constituídos de benomyl, isoladamente ou associado com KNO₃, uréia ou ZnSO₄, houve um incremento no número de frutos produzidos, diferindo significativamente da testemunha (Tabela 19). O

tratamento constituído por KNO_3 , isoladamente, também diferiu estatisticamente da testemunha e apresentou o mesmo comportamento dos tratamentos onde foram empregados o fungicida benomyl. Por outro lado, observou-se que a utilização isolada de uréia e ZnSO_4 não proporcionou incremento no número de frutos produzidos e, dessa maneira, não diferindo significativamente da testemunha.

Em relação ao peso de frutos, observou-se que os resultados obtidos foram semelhantes aos relacionados com o número total de frutos produzidos, verificando-se, portanto, as mesmas tendências estatísticas.

Quanto ao peso médio dos frutos, os únicos tratamentos que diferiram estatisticamente entre si foram benomyl + uréia e uréia, isoladamente. O peso médio dos frutos nestes tratamentos foi de 267 e 309 g, respectivamente. Nos demais tratamentos, inclusive a testemunha, o peso médio dos frutos teve valores intermediários e não diferiram significativamente entre si e também em relação a benomyl + uréia e uréia, isoladamente.

Analisando os dados em relação ao número e peso de frutos produzidos, verifica-se que os tratamentos que se mostraram menos eficientes no controle da QPFC foram uréia e ZnSO_4 , uma vez que a utilização dos mesmos se refletiu em menor produção. Por outro lado, apesar de não ter diferido significativamente de benomyl + uréia, benomyl + ZnSO_4 e KNO_3 , o tratamento onde se verificou maior número e peso de frutos foi benomyl + KNO_3 . Quanto ao peso médio dos frutos não foi notada nenhuma relação entre o nível de eficiência dos tratamentos e o peso dos frutos produzidos.

Os valores do coeficiente de determinação (R^2) obtidos entre as variáveis NMFE (%) - número total de frutos e NMFE-peso total de frutos foram 0,963 e 0,960, respectivamente, demonstrando, dessa forma, existir uma alta relação entre as mesmas.

4.5.2.3. Efeito de benomyl aplicado isoladamente ou associado a óleo mineral ou espalhante adesivo no controle de *C. gloeosporioides*

Os dados referentes ao efeito de benomyl aplicado isoladamente ou associado a óleo mineral e espalhante adesivo no controle de *C. gloeosporioides* são apresentados na Tabela 20.

Analisando-se os dados referentes ao número médio de frutos efetivos (NMFE) observa-se que todos os tratamentos constituídos de benomyl, isoladamente ou em associação com espalhante adesivo, foram eficientes no controle da QPFC, não diferindo estatisticamente entre si porém, sendo significativamente diferente da testemunha. Por outro lado, benomyl + óleo mineral mostrou-se pouco eficiente, comportando semelhantemente com a testemunha.

Tabela 20 - Efeito de benomyl aplicado isoladamente ou associado com óleo mineral ou espalhante adesivo no número médio de frutos efetivos (NMFE) e na produção de laranja ‘Folha Murcha’, afetada pela QPFC, sob condições de campo.

Tratamentos	NMFE(%) ^y	Produção ^x		
		Nº total de frutos	Peso total dos frutos (kg)	Peso médio dos frutos (g)
Benomyl	23,27a	392 ab	113 ab	285 a
Benomyl + Adefix ^R	24,89a	396 ab	112 ab	286 a
Benomyl + Aterbane ^R	27,03a	461 a	126 a	273 a
Benomyl + Ag-Bem ^R	19,11ab	366 ab	103 abc	281 a
Benomyl + óleo mineral	11,37bc	230 bc	67 bc	293 a
Testemunha	0,0c	172 c	52 c	304 a

x - média de quatro repetições, sendo cada parcela representada por 4 plantas; médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; y - dados reais transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$.

Pelo número de frutos produzidos verifica-se que o tratamento que se mostrou mais eficiente foi benomyl acrescido de Aterbane^R, embora não tenha diferido estatisticamente de benomyl, isoladamente, e de benomyl acrescido de Adefix^R ou Ag-Bem^R. A produção observada nestes tratamentos foi de 461, 392, 396 e 366 frutos, respectivamente. O tratamento que se refletiu em menor número de frutos produzidos foi benomyl + óleo mineral, embora estatisticamente tenha se assemelhado a benomyl, benomyl + Adefix^R e benomyl-Ag-Bem^R. Por outro lado também não diferiu da testemunha.

Quanto ao peso total de frutos, foram observadas as mesmas tendências detectadas em relação ao número de frutos produzidos, destacando-se, positivamente, a associação de benomyl + Aterbane^R.

Em relação ao peso médio de frutos, verificou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos, indicando não existir relação entre o nível de eficiência demonstrado pelos tratamentos e o peso médio dos frutos obtidos.

Os valores do coeficiente de determinação (R^2), obtidos entre as variáveis NMFE (%) - número total de frutos e, NMFE (%) - peso total de frutos, foram 0,947 e 0,952, respectivamente, demonstrando uma alta relação entre as mesmas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização patogênica e morfológica de isolados de *C. gloeosporioides*

Isolados de *C. gloeosporioides* com características bio-ecológicas e culturais distintas foram obtidos de plantas cítricas em vários estados do Brasil. Estes isolados puderam ser agrupados e constituíram três grupos distintos: SGO, KLA e FGG.

Os isolados do grupo SGO foram obtidos de pétalas de laranjas doces com sintomas típicos da QPFC enquanto que os do grupo KLA o foram de folhas, flores e frutos de limão ‘Galego’ com sintomas de antracnose. Os do grupo FGG foram obtidos de tecidos senescentes de laranjas doces. Em meio de cultura, os isolados dos grupos SGO e KLA produziram colônias predominantemente acinzentadas e brancas com pigmentação laranja profundo, respectivamente. Além disso, o seu crescimento micelial foi considerado lento se comparado com aquele dos isolados do grupo FGG. Além do crescimento micelial rápido, os isolados deste grupo exibiram também colônias cinza a cinza escuro e sem pigmentação laranja.

Em teste de patogenicidade realizado em flores de laranja ‘Pêra’ sob condições de casa-de-vegetação, todos os isolados do grupo SGO produziram sintomas típicos da QPFC. Sintomas típicos da QPFC foram também produzidos por todos os do

grupo KLA e, em ambas situações, os isolados dos dois grupos foram regularmente recuperados através de reisolamento.

Além da presença significativa de flores com sintomas típicos da QPFC, o elevado percentual de cálices retidos acompanhado de baixa retenção de frutos confirmaram a patogenicidade dos isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO e KLA. Nenhum sintoma da doença foi produzido mediante a inoculação de isolados pertencentes ao grupo FGG.

Desde a comprovação do envolvimento de *C. gloeosporioides* com a QPFC, realizada por FAGAN em 1979, somente aos isolados do grupo SGO havia sido creditada a responsabilidade pela doença. No entanto, os resultados obtidos neste estudo além de confirmarem o agente causal da doença, demonstram também, o envolvimento adicional de isolados do grupo KLA com esta enfermidade. Estes dados coincidem com os obtidos por AGOSTINI et al. (1992) que verificaram a associação de isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de limão ‘Galego’ com a produção de sintomas da QPFC em laranja doce e em ‘lima da Pérsia’, em condições de casa-de-vegetação.

Todavia, não existem evidências de que os isolados pertencentes ao grupo KLA sejam também responsáveis pela QPFC em condições de campo. Pelos testes de patogenicidade realizados por AGOSTINI et al. (1992), em folhas de “seedlings” de limão ‘Galego’, ficou também demonstrado que os isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes aos grupos SGO e KLA são distintos, patogenicamente.

A origem dos isolados do grupo SGO é ainda desconhecida, porém AGOSTINI et al. (1992) admitiram a hipótese de que o mesmo tenha se originado de

isolados de KLA que perderam a virulência ao limão ‘Galego’. Segundo aqueles pesquisadores, esta teoria é sustentada em função do caráter endêmico dos isolados deste grupo e também devido à obtenção de sintomas típicos de antracnose da ‘lima da Pérsia’, em limão ‘Galego’, mediante a inoculação com isolados obtidos de laranja do grupo ‘Navel’ afetada pela QPFC.

Não obstante o envolvimento de *C. gloeosporioides*, desde há muitos anos ocasionando queda de flores de plantas cítricas na Flórida, como mencionado por BURGER (1921), a ocorrência da QPFC apenas a partir da década de 50 em Belize, América Central, elimina a possibilidade de que o agente causal mencionado em ambos os lugares seja o mesmo. Este fato é sustentado principalmente à diferença de sintomas descritos nos dois lugares. Aliado a isso, a rápida dispersão deste grupo e os resultados de patogenicidade positiva obtidos nesta experimentação mediante inoculação com isolados de características bio-ecológicas diferentes daquelas empregadas por AGOSTINI et al. (1992), dão também suporte às hipóteses daqueles pesquisadores de que o grupo SGO tenha se originado de KLA ao longo da sua convivência com plantas cítricas.

Em função dos diferentes níveis de severidade observados em botões florais e em flores abertas sob condições naturais, admite-se que as infecções em botões florais têm conseqüências mais expressivas do que quando ocorrem em flores abertas. Sob níveis de severidade intermediária, houve, comparativamente, maior número de frutos retidos oriundos de flores infectadas do que em botões, naquelas condições.

Para níveis de severidade elevada, nenhum fruto foi retido a partir dos botões florais infectados, enquanto que de flores, igualmente doentes, a retenção foi de 0,03%. A baixa retenção ou mesmo ausência total de frutos a partir de botões infectados deveu-se, possivelmente, a sua alta sensibilidade neste estágio, com conseqüente queda antes que a flor completasse o seu desenvolvimento. Esta possibilidade deve ter contribuído também para a menor retenção de cálices, se comparada com o número produzido a partir de flores abertas e doentes. Estas razões devem ter contribuído para a obtenção de um baixo valor de correlação.

Embora sejam resguardadas as devidas proporções e metodologia, a ausência completa de retenção de frutos para o caso de botões florais severamente infectados e a baixa retenção observada em flores igualmente afetadas, obtidas nesta experimentação, coincidem com os dados obtidos por FAGAN (1979) que verificou ausência completa de frutificação a partir de botões florais inoculados. Quanto à percentagem de cálices retidos, houve também relação entre os dados obtidos e os observados por aquele pesquisador.

Embora os sintomas da QPFC sejam consistentemente observados com maior frequência em flores abertas do que em botões florais, como já comprovado por DENHAM & WALLER (1981), a ausência absoluta de frutos retidos a partir daqueles órgãos com elevado nível de severidade, comprova, por outro lado, a sua alta sensibilidade uma vez infectado pelo fungo.

Admitindo que a ocorrência de sintomas da QPFC é incomum em botões florais com até 10 mm de comprimento, sua incidência expressiva, observada nesta

experimentação, deve-se, possivelmente, a uma alta pressão de inóculo, como já mencionado por Agostini & Timmer⁸, (citados por AGOSTINI et al., 1992).

A presença de cálices retidos a partir de botões florais e flores abertas, aparentemente sem sintomas, indica que o fungo pode desenvolver infecções latentes sem provocar a produção de sintomas típicos da doença.

Pelos estudos morfológicos tornou-se evidente a possibilidade de separação dos isolados de *C. gloeosporioides*, pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG, levando-se em consideração as dimensões de comprimento, largura e a relação comprimento/largura de conídios e apressórios. Estas dimensões foram normalmente maiores para os isolados do grupo FGG, menores, para SGO, no caso dos conídios e apressórios para o grupo KLA. O formato predominante dos apressórios foi também completamente distinto entre os grupos, sendo caracteristicamente clavado para SGO, arredondado para KLA e lobulado para FGG.

A possibilidade da separação dos isolados de *C. gloeosporioides* frequentemente associados aos citros, foi também demonstrada por AGOSTINI et al. (1992) mediante estudos da morfologia das formas SGO, KLA e FGG. Segundo aqueles pesquisadores, ficou comprovado que a forma FGG diferiu claramente das formas KLA e SGO em relação ao perímetro e área dos conídios. Enquanto o perímetro e a área dos conídios da forma FGG foram consistentemente superiores, nas formas SGO e KLA, igualmente distintas, foram significativamente inferiores. Pela área dos conídios foi

⁸ Agostini, J.P. & Timmer, L.W. Não publicado.

possível separar as formas FGG das demais porém, não sendo possível fazê-la entre SGO e KLA.

As dimensões médias dos conídios, em μm , foram de 11,91 x 3,87 para os isolados do grupo SGO, de 13,23 x 4,06 para KLA e de 14,20 x 4,52 para os isolados do grupo FGG. As dimensões correspondentes aos grupos SGO e FGG foram semelhantes àquelas obtidas por FAGAN (1980) para os isolados dos grupos cgp e cgc, de patogenicidade igualmente positiva e negativa para flores de laranja doce, respectivamente. Para o caso dos isolados do grupo KLA, as dimensões observadas se enquadraram dentro dos limites descritos originalmente por CLAUSEN (1912) para *Gloeosporium limetticolum*, antiga descrição de *C. gloeosporioides* associado à antracnose do limão ‘Galego’.

Embora as médias observadas das dimensões dos conídios tenham sido semelhantes àquelas verificadas por SIMMONDS (1965), MORDUE (1971) e SUTTON (1980) para a espécie, por outro lado estas não foram idênticas. Entretanto, variações desta natureza têm sido postas em destaque em função da heterogeneidade da espécie e à diferença na metodologia de produção dos conídios (BURGER, 1921; SUTTON, 1992).

A metodologia envolvendo o uso de discos de folhas de laranjeira para a diferenciação dos apressórios dos isolados dos grupos SGO e FGG e, brotações novas de limão ‘Galego’ para os do grupo KLA, demonstrou ser uma técnica simples e eficiente, constituindo-se, portanto, em uma alternativa adicional para a obtenção daquelas estruturas. Esta via alternativa assume importância para estudos morfológicos porque permite observar a diversidade destas estruturas, uma vez que, para o caso do

Colletotrichum, tendem a ser muito semelhantes em tamanho e variam pouco quando produzidas em cultura, prejudicando, assim, a separação de grupos eventualmente existentes (GUNNELL & GUBLER, 1992). Os apressórios produzidos, em geral abundantes, eram de cor castanha escuro, parede espessa e localizavam-se na extremidade do tubo germinativo logo após a germinação do conídio, ou na extremidade de hifas, ou ainda, de ramificações laterais.

As dimensões médias, em μm , para os apressórios foram, de 7,70 x 5,06 para os isolados do grupo SGO, de 6,20 x 4,76 para o grupo KLA e 8,40 x 5,83 para os isolados do grupo FGG. Estas dimensões foram semelhantes àquelas observadas por AGOSTINI et al. (1992) para as formas FGG, SGO e KLA e enquadram-se dentro dos limites apresentados por ARX (1957), MORDUE (1971) e SUTTON (1992), para a espécie.

Neste estudo tornou-se evidente a possibilidade da separação dos grupos SGO, KLA e FGG em função das dimensões dos apressórios. Entretanto, estes resultados divergem daqueles obtidos por AGOSTINI et al. (1992) que verificaram que, mediante este critério, torna-se possível distinguir apenas a forma FGG das demais. Estas variações, no entanto, podem ser devidas à heterogeneidade da espécie (SUTTON, 1992) e à diferença quanto a metodologia de obtenção dos apressórios.

Além das dimensões, pelo formato dos apressórios ficou demonstrado também a possibilidade da separação dos isolados de *C. gloeosporioides* frequentemente associado às plantas cítricas. Os isolados do grupo SGO predominantemente produziram apressórios clavados, os do grupo KLA, arredondados, e FGG, predominantemente

lobulados. Os resultados referentes a dimensões e formato dos apressórios coincidem com aqueles obtidos por AGOSTINI et al (1992). Os formatos descritos se enquadram também àqueles reportados por ARX (1957), MORDUE (1971) e SUTTON (1992), embora a forma arredondada não tenha sido mencionada pelos dois últimos autores. Segundo COX & IRWIN (1988), a morfologia do apressório, e não exatamente o seu tamanho, constitui-se em critério de grande validade para a caracterização de grupos de *C. gloeosporioides*.

5.2. Caracterização eletroforética e resposta à temperatura

Padrões eletroforéticos observados para os isolados de *C. gloeosporioides* confirmam o polimorfismo característico da espécie e demonstra a possibilidade da distinção dos grupos SGO, KLA e FGG, freqüentemente associados às plantas cítricas.

Para os isolados do grupo SGO existem bandas de esterase distintas, de Rm 3,9 - 4,1, que permitem distinguir KLA e FGG. Aliado a isto, uma banda de esterase igualmente específica, de Rm 4,2 - 4,7, presente apenas nos isolados do grupo FGG constituiu-se, também, em alternativa adicional para a distinção dos demais grupos. Em relação aos isolados do grupo KLA, os padrões eletroforéticos demonstrados, embora distintos dos demais, não se mostraram muito consistentes. Por outro lado, uma banda de Rm 0,4 - 0,8 constituiu-se em característica indicativa dos grupos SGO, KLA e FGG.

Estes resultados coincidem com os obtidos por LIYANAGE et al. (1992) os quais mediante estudo de DNA ribossomal, verificaram que duas populações de *C.*

gloeosporioides, correspondentes às formas SGO e FGG, constituíram dois grupos geneticamente distintos.

Esta diversidade genética foi também confirmada através da utilização de enzimas de restrição envolvendo a cutinase produzida pelas formas SGO e FGG de *C. gloeosporioides* (LIYANAGE et al., 1993). Como isolados do grupo KLA não foram contemplados em nenhum destes trabalhos, uma análise comparativa deste, principalmente com o grupo SGO, tornou-se impossível de ser realizada.

Embora os isolados dos grupos SGO e KLA tenham demonstrado bandas específicas, não foi possível estabelecer uma relação entre os perfis eletroforéticos e a virulência dos patógenos avaliados. Esta relação, embora positiva para alguns patógenos como *Radopholus similis* (HUETTEL et al., 1983), *Microcyclus ulei* (JUNQUEIRA et al., 1987), *C. gloeosporioides* isolado de *Stylosanthes guianensis* (LENNÉ & BURDON, 1990) e de jiló (PEREIRA, 1995), para outros, como no caso de *C. orbiculare* (REGO et al., 1994), esta correspondência não tem sido mantida. Estas relações, no entanto, poderiam ser melhor avaliadas e interpretadas com a utilização de técnicas moleculares, as quais têm se mostrado eficientes para distinção de populações (BRAITHWAITE et al., 1990), isolados (MILLS et al., 1992), biótipos (HAYDEN et al., 1994) ou mesmo espécies (BERNSTEIN et al., 1995).

A temperatura tem-se constituído em componente adicional para estudos de caracterização de linhagens, grupos e espécies de diversos patógenos. ASTUTI (1986) verificou que dois fungos causadores de antracnose em pimenta, *C. capsici* e *Gloeosporium piperatum*, apresentaram maior nível de esporulação a 30 e 23°C,

respectivamente. KIM et al. (1986) trabalhando com duas estirpes de *C. gloeosporioides*, verificaram que apesar da temperatura ótima para crescimento destas ter sido de 20 a 26°C, o crescimento micelial da estirpe R foi mais rápido do que o da estirpe G. SMITH & BLACK (1990) demonstraram também a importância da temperatura como caráter distintivo de espécies de *Colletotrichum* associado ao morango. Segundo aqueles pesquisadores, a maior diferença no crescimento ocorreu a 32°C onde o diâmetro médio das culturas de *C. acutatum*, com cinco dias de idade, era de 13 mm, comparado com 69 mm de *C. fragariae* e 63 mm para *C. gloeosporioides*.

Pela resposta à temperatura obtida neste trabalho, detectaram-se diferenças entre os isolados pertencentes aos grupos SGO, KLA e FGG. Em todas as temperaturas avaliadas os isolados do grupo FGG diferiram consistentemente dos grupos SGO e KLA. A 32°C, por exemplo, o crescimento dos isolados dos grupos SGO e KLA foi de 1,16 e 2,12 mm, comparado com 24,18 mm do grupo FGG.

A temperatura ótima de crescimento observada para os isolados empregados neste estudo, variou de 22 a 25°C para os dos grupos SGO e KLA e de 25 a 28°C para os do grupo FGG. Estes dados são semelhantes aos observados por AGOSTINI et al. (1992) que verificaram o máximo crescimento destes três grupos entre 23 a 27°C. Esta pequena variação pode ser devida à diferença das faixas de temperatura avaliadas e à metodologia de interpretação dos resultados.

5.3 Controle de *C. gloeosporioides*

Com base no comportamento *in vitro*, foram determinadas duas populações de *C. gloeosporioides* que reagiram diferentemente à presença de benomyl: uma, sensível e, outra, não sensível. A sensível, representada por isolados do grupo FGG, mostrou-se muito sensível, sendo inibida a 1 µg/ml de benomyl enquanto que, a não sensível, representada por isolados dos grupos SGO e KLA, cresceu indistintamente e mostrou-se pouco inibida mesmo em altas concentrações do fungicida.

Além da baixa eficiência na inibição do crescimento micelial, foi verificado que a 10 µg/ml houve uma tendência do fungicida estimular a esporulação de isolados pertencentes aos grupos SGO e KLA. Este incremento na esporulação se assemelha aos resultados obtidos por OKIOGA (1976), o qual verificou que a pulverização de hastes de ramos de cafeeiros previamente tratados com carbendazim em condições de campo, propiciava também um aumento na esporulação de *C. coffeanum* quando tratadas com aquele fungicida em condições de laboratório, fato este não verificado com o uso de captafol. Segundo aquele pesquisador, os resultados sugeriram que a aplicação de carbendazim e Folcidin^R, pertencentes ao grupo dos benzimidazóis, resultou no desenvolvimento de uma linhagem resistente, não apenas para aqueles fungicidas, como também para o benomyl.

Entretanto, mediante estudos realizados envolvendo três isolados obtidos de pomares com diferentes níveis de utilização de benomyl, foi verificado que os mesmos foram igualmente insensíveis, embora tenha se notado que o isolado de maior tempo de

exposição ao fungicida tenha mostrado uma maior insensibilidade *in vitro*. Os elementos disponíveis não permitem, no entanto, comprovar qualquer relação daquela natureza.

A existência de duas populações de *C. gloeosporioides* com níveis diferentes de sensibilidade a benomyl foram também descritas na Flórida, EUA, por SONODA & PELOSI (1988) os quais concluíram que os isolados correspondentes às formas FGG mostraram-se consistentemente mais sensíveis do que aqueles pertencentes à forma SGO. Naquele estudo, embora a concentração avaliada nos testes *in vitro* tenha variado de 0 a 500 µg/ml, os dados apresentados e a discussão limitaram-se apenas até a 10 µg/ml o que prejudica, parcialmente, comparações com os resultados aqui obtidos. Entretanto, foi possível notar, naquele trabalho, que para o caso dos isolados SGO, o nível de insensibilidade a 1 e 10 µg/ml foi o mesmo, o que coincide com os resultados ora obtidos porém, em concentrações mais elevadas.

Embora constem na literatura registros sobre a existência de várias espécies de fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* que adquiriram resistência ao benomyl e similares (GRIFFEE, 1973; COOK & PEREIRA, 1976, OKIOGA, 1976; CHIKUO & KOBAYASHI, 1991; FERNANDES et al., 1994), a falta de sensibilidade dos isolados, observada no presente trabalho, não indica, aparentemente, a ocorrência daquele fenômeno e, sim, uma característica genética deste fungo. Evidências semelhantes são apontadas na literatura envolvendo duas populações de *C. gloeosporioides*, de colônias miceliais cinza e alaranjada, freqüentemente associadas a várias culturas, cuja distinção entre ambas é feita mediante avaliação da sua sensibilidade a benomyl (SHABI & KATAN, 1983; SHABI et al., 1993). Nesse caso, os isolados de

crescimento micelial rápido e de coloração acinzentada mostraram-se marcadamente sensíveis ao fungicida enquanto que, os de crescimento micelial lento e alaranjado, comportaram-se consistentemente insensíveis.

Para outras espécies, como por exemplo *C. acutatum*, tem também sido observado situação semelhante, onde este fungicida tem se tornado um componente do meio de cultura para estudo da sobrevivência do fungo no solo (EASTBURN & GUBLER, 1990) ou para distinção das suas formas miceliais cinza e alaranjada (BERNSTEIN et al. 1995).

Os fungicidas chlorothalonil e folpet apresentaram baixo nível de inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, mesmo a 200 µg/ml. O ED₅₀ destes fungicidas evidenciaram baixa eficácia dos mesmos, *in vitro*, embora constem na literatura vários trabalhos demonstrando sua eficiência para o controle de *C. gloeosporioides* associado a várias outras culturas (OSORIO, 1989; PIERCE & McCAIN, 1990; BORRAS et al., 1993).

Mancozeb a 100 µg/ml inibiu completamente o crescimento micelial de todos os isolados, evidenciando a possibilidade da sua utilização no controle de *C. gloeosporioides*, como já anteriormente verificado para o controle da antracnose em citros (OROZCO SANTOS & GONZALES-GARZA, 1986) e em goiaba (HOSSAIN & MEAH, 1992).

Os fungicidas prochloraz e tebuconazole, inibidores da síntese de ergosterol, mostraram-se altamente eficientes *in vitro*, promovendo completa inibição do crescimento micelial a 10 µg/ml. Estes resultados indicam ser os mesmos promissores no

controle da QPFC e coincidem com os dados obtidos por Zitko & Timmer⁹, (citados por TIMMER et al., 1994), os quais constataram também a eficácia de fungicidas com este modo de ação, na inibição *in vitro* de *C. gloeosporioides*. Para o caso do prochloraz, particularmente, existem vários registros na literatura sobre sua eficiência no controle de *C. gloeosporioides* em tratamento pós-colheita de abacate (McMILLAN Jr. & NARAYANAN, 1990) e manga (ULLASA, 1989; LONSDALE et al., 1991; PELSAR & LESAR, 1991).

Os resultados obtidos sob condições de campo tornaram evidente a viabilidade do controle da QPFC mediante o uso dos fungicidas inibidores da síntese de ergosterol, tebuconazole, acrescido de espalhante adesivo, e também através do prochloraz.

Não há na literatura nenhum registro referente à utilização ou mesmo sobre a eficiência de tebuconazole no controle de *C. gloeosporioides* sob condições de campo. Todavia, estes resultados obtidos confirmam a eficiência já verificada *in vitro* e coincidem com as observações de Zitko e Timmer⁹, os quais prognosticaram a eficiência de fungicidas inibidores da síntese ergosterol na inibição de *C. gloeosporioides*, *in vitro*. Em relação ao prochloraz, embora não conste na literatura nenhum registro referente à sua influência no controle da QPFC, este se constitui, por outro lado, em tratamento eficiente para o controle de várias doenças causadas por *C. gloeosporioides* associado a outras culturas (ULLASA, 1989; McMILLAN Jr. & NARAYANAN, 1990; LONSDALE et al., 1991; PELSAR & LESAR, 1991; LONSDALE & KOTZÉ, 1993).

⁹ Zitko, S.E. & Timmer, L.W. Evaluation of fungicides *in vitro* for control of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Fungic. Nematicide Tests**, 47: 335, 1991.

Contrariamente ao que ocorrera *in vitro*, em condições de campo o fungicida benomyl demonstrou ser um dos tratamentos mais eficientes no controle da QPFC, tanto em relação ao número médio de frutos efetivos (NMFE) e número de frutos produzidos, como também quanto ao peso total de frutos. Tiofanato metílico e carbendazim, especialmente, ambos igualmente pertencentes aos benzimidazóis, mostraram-se também eficazes no controle da doença. Anilazine e mancozeb mostraram-se pouco eficientes no controle da doença, resultando em baixa produção de frutos.

A eficiência observada com a utilização de benomyl, isoladamente, foi também confirmada mediante a sua associação com vários fertilizantes e espalhantes adesivos, demonstrando que a mistura de tanque dos mesmos não se refletiu em redução da eficiência no controle da QPFC. Esta mistura para os casos de nitrato de potássio e de Aterbane^R refletiu-se positivamente, propiciando, inclusive, em aumento na produção. A simples utilização de nitrato de potássio contribuiu também para um incremento na produção.

Várias são as citações onde é verificada a influência do potássio na incidência de pragas e doenças em um grande número de culturas. Nestas citações aquela influência tem sido positiva, negativa ou neutra. Para o primeiro caso, PERRENOUD (1990), em levantamento realizado, constatou que em 1549 casos envolvendo doenças fúngicas, em cerca de 70% deles a utilização daquele nutriente refletiu-se positivamente, contribuindo para redução da doença. Resultados concretamente positivos são inclusive citados por SIJ et al. (1993), os quais constataram que potássio e, potássio acrescido de

benomyl, suprimiram a antracnose em soja contribuindo para incrementos significativos na produção.

A associação de benomyl com espalhantes adesivos não contribuiu significativamente para incremento no NMFE e na produção. Este fato pode ser devido às características sistêmicas do benomyl. Já o óleo mineral, por outro lado, embora não tenha propiciado ao surgimento de sintomas evidentes de fitotoxicidade, demonstrou ter refletido negativamente na eficiência daquele fungicida uma vez que o número e peso total de frutos foram comparativamente reduzidos. Este fato deve-se, possivelmente, à elevação do pH da solução em razão da presença de componentes responsáveis em evitar contaminação microbiológica do óleo.

O controle da QPFC através da utilização de benomyl tem sido demonstrado por vários pesquisadores. Em alguns casos, entretanto, tem-se verificado que o controle da doença, medido através da contagem de cálices retidos, nem sempre tem se refletido em aumento na produção (PORTO, 1979; PORTO, 1981_{a,b}; FAGAN, 1984) o que diverge dos resultados obtidos por outros pesquisadores cujas relações entre eficiência de controle e aumento da produção têm sido mantidas (MELO & MORAIS, 1990; CHILDERS, 1992). Resultados intermediários foram também reportados por TIMMER & ZITKO (1992), os quais constataram que, em locais onde o nível da doença foi baixo ou moderado, não houve incremento na produção mediante o controle da doença. Entretanto, resposta altamente positiva foi obtida através do controle efetivo da doença em pomares severamente afetados. De acordo com PORTO et al. (1979), estas discrepâncias podem ser devidas a vários fatores, incluindo-se aspectos genéticos e

nutricionais do hospedeiro e, também, ao potencial de inóculo do patógeno. Além disso, segundo TIMMER & ZITKO (1992), há também uma compensação das plantas afetadas pela QPFC, com conseqüente redução da queda fisiológica normal dos frutos, freqüentemente comum logo após a florada, que se estende até cerca de 90 dias do início da mesma.

Nos estudos ora desenvolvidos, foi verificado um alto coeficiente de determinação entre o número médio de frutos efetivos (NMFE) e os valores relativos à produção. Estes dados indicam, dessa forma, que a utilização do parâmetro número médio de frutos efetivos (NMFE) constitui-se em alternativa viável para prognosticar a eficiência dos tratamentos com vistas ao controle da doença.

A presença de frutos com tamanho maior que o normal foram também obtidos nas plantas não pulverizadas, embora isto de um modo geral não tenha refletido em aumento de peso. Estas observações se assemelham também àquelas citadas por TIMMER & ZITKO (1992) os quais verificaram que nas parcelas testemunhas ou que receberam apenas uma ou duas pulverizações, os frutos produzidos foram igualmente grandes e tornaram-se inaceitáveis para o comércio de frutas frescas.

A eficiência relativamente baixa de benomyl *in vitro* e, por outro lado significativamente expressiva em condições de campo, tem conduzido a um questionamento sobre as razões destas discrepâncias. Além de um certo nível de inibição, de 40 a 60%, que se observou *in vitro*, duas outras hipóteses têm também sido consideradas: atividade hormonal do fungicida e inibição da cutinase.

Respostas semelhantes às citocininas têm sido verificadas com a utilização de benomyl e compostos relacionados, em várias culturas, incluindo-se aipo, alface, tomate (SPENCER, 1979), em folhas de trigo destacadas (PERSON et al., 1957) e, segundo Becker¹⁰, (citado por SKENE 1972), também em videira. Estas respostas freqüentemente têm implicado em maior retenção de clorofila naquelas hortaliças (SPENCER, 1972), atraso na senescência de folhas de trigo (PERSON et al., 1957) e alterações no formato dos cachos, peso das bagas e vigor das videiras (SKENE, 1972). De acordo com ROTHWELL & WRIGHT (1967), os compostos com atividade semelhante às citocininas estão relacionadas à adenina e, a similaridade desta estrutura e o metil - 2 - benzimidazol carbamato, o qual é a parte sistêmica de benomyl, conduz à possibilidade de que o derivado daquele fungicida apresente atividade semelhante ao citado hormônio (SPENCER, 1979). Resultados comprovando a propriedade hormonal de benomyl foram inclusive demonstradas por SKENE (1972) em estudos realizados com “calus” de soja e cotilédones de rabanete, embora sua efetividade tenha sido muito baixa se comparada com a cinetina. Entretanto, segundo aquele pesquisador, esta fraca atividade poderia ser compensada pelas altas doses do fungicida quando utilizado sob condições de campo.

A cutinase, a qual encontra-se marcadamente envolvida no processo infeccioso causado por *Fusarium solani* f. sp. *lisi* em ervilha (SOLIDAY & KOLATTUKUDY, 1976) e por *C. gloeosporioides* em frutos de mamoeiros (DICKMAN et al., 1982), tem também sido isolada de pétalas de *C. sinensis* com

¹⁰ Becker, H. Untersuchungen über den Einsatz des Fungicides Benomyl in der Rebensveredlung. *Wein-Wissenschaft*, 26:50-56, 1971.

sintomas da QPFC (LIYANAGE et al., 1992, 1993), embora a extensão da sua importância na doença não tenha sido ainda caracterizada.

DICKMAN et al. (1983), mediante trabalho *in vitro* verificaram a existência de 13 pesticidas, predominantemente organofosforados, que demonstraram ser potentes inibidores da cutinase purificada de *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose do mamão. Segundo aqueles pesquisadores, alguns daqueles compostos, mesmo em concentrações muito baixas, inibiram eficientemente infecções em frutos de mamão inoculados, não obstante não ter exibido nenhuma influência no crescimento micelial do fungo. Neste trabalho de DICKMAN et al. (1983), a alta atividade inibitória demonstrada por benomyl à cutinase, possibilitou supor a existência de um mecanismo adicional semelhante no controle da QPFC, em citros. Segundo aqueles pesquisadores, sob condições aquosas, o benomyl se hidroliza espontaneamente para formar carbendazim e n-butil-isocianato. Este último, o qual pode ser o responsável pela alta atividade inibitória da enzima (DICKMAN et al., 1983), modifica, de forma covalente, a serina ativa, a qual tem importância reconhecida no patossistema *F. solani* f. sp. *pisi* - ervilha (KÖLLER & KOLATTUKUDY, 1982).

6. CONCLUSÕES

Em função dos resultados experimentais obtidos é possível relacionar as seguintes conclusões:

- a) constatou-se, no Brasil, três grupos de *C. gloeosporioides* frequentemente associados às plantas cítricas, também identificados em outros países, designados SGO, KLA e FGG; os três grupos distinguíram-se quanto às características culturais, patogênicas, morfológicas, eletroforéticas, resposta à temperatura e sensibilidade à benomyl;
- os isolados dos grupos SGO e KLA mostraram-se patogênicos quando inoculados em flores de laranja doce e produziram todos os sintomas típicos da QPFC, fato este não verificado mediante a inoculação com isolados do grupo FGG;
- o comprimento, a largura e a relação comprimento/largura de conídios e apressórios foram, normalmente, maiores nos isolados do grupo FGG e, menores, para SGO, no caso dos conídios e apressórios para KLA;

- o formato dos apressórios demonstrou-se predominantemente clavado para os isolados do grupo SGO, arredondado para KLA e lobulado para FGG;
- os isolados do grupo SGO exibiram uma banda de esterase de Rm 3,9 - 4,1 que permitiu distinguí-los dos isolados dos grupos KLA e FGG; uma banda igualmente específica, de Rm 4,2 - 4,7, presente apenas em isolados do grupo FGG constituiu-se, também, em alternativa adicional para distinguí-los dos isolados de outros grupos;
- os isolados dos grupos SGO, KLA e FGG reagiram distintamente quanto às diferentes faixas de temperatura: a temperatura ótima para o crescimento micelial dos isolados dos grupos SGO e KLA situou-se entre 22 a 25°C enquanto que, para os do grupo FGG, aquela faixa foi de 25 a 28°C.
- constatou-se duas populações de *C. gloeosporioides*, freqüentemente associadas às plantas cítricas, que se comportaram diferentemente à presença de benomyl em meio de cultura: uma, sensível, representada por isolados do grupo FGG, coincidentemente não patogênica e, outra, não sensível, representada pelos grupos SGO e KLA, de patogenicidade positiva; a ausência de sensibilidade a benomyl demonstrada pelos isolados de *C. gloeosporioides* pertencentes ao grupo KLA corresponde ao primeiro relato na literatura;

- houve um incremento significativo na esporulação de oito isolados do grupo SGO e um de KLA, mediante o seu cultivo em BDA acrescido de benomyl a 10 µg/ml;

- b) o fungicida benomyl, isoladamente ou em combinação com adubos foliares (KNO₃, ZnSO₄ ou uréia), e também outros fungicidas igualmente pertencentes ao grupo dos benzimidazóis como carbendazim e tiofanato metílico, mostraram se eficientes no controle da QPFC; prochloraz e tebuconazole, que comportaram-se altamente eficientes *in vitro*, foram também eficazes em condições de campo, constituindo-se, portanto, em novas alternativas para o controle da QPFC;

- c) sob níveis de severidade elevada, as infecções da QPFC em botões florais demonstraram ter conseqüências mais relevantes do que em flores abertas; nenhum fruto foi retido a partir de botões florais infectados enquanto que, de flores abertas, naquelas condições, a retenção foi de 0,03%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIKARAM, N.K.B.; EWING, D.F.; KARUNARATNE, A.M.; WIJERATNE, E.M.K.
Antifungal compounds form immature avocado fruit peel. **Phytochemistry**, Oxford,
31(1):93- 96, 1992.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological
characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus.
Phytopathology, St. Paul, **82(11)**: 1377 - 1382, 1992.

ALEXOPOULOS, C.J. Subdivision Deuteromycotina Form - Class Deuteromycetes. The
imperfect fungi. In: 2º ed. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley & Sons,
1979. cap. 27, p. 534 - 572.

ALVAREZ, A.M. & NISHIJIMA, W.T. Postharvest diseases of papaya. **Plant Disease**.
St. Paul, **71(8)**: 681 - 686, 1987.

ARX, J.A. von Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathologische
Zeitschrift**, Berlin, **29**: 413 - 469, 1957.

- ASTUTI, E.B. The effect of storage temperature and fruit maturity on the incidence of anthracnose on chilli pepper. **Buletin Penelitian Hortikultura**, Jakarta Pusat **13(1):40-50**, 1986. Apud **Review of Plant Pathology**, Wallingford, **68(9):489**, 1989.
- BABU, K.J. & REDDY, S.M. Changes in sugar and organic acid of lemon fruit due to infection. **Indian Phytopathology**, New Delhi, **42(1): 195 - 196**, 1989.
- BACH, E. E. Utilização da eletroforese no estudo de alterações enzimáticas na interação planta-patógeno. In: I ENCONTRO SOBRE APLICAÇÕES DA ELETROFORESE NA AGROPECUÁRIA, 1. , Nova Odessa, 1989. Instituto de Zootecnia, 1989. p.1-4.
- BACH, E.E. Comparação morfológica, patogênica, serológica e eletroforética de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, isolado de milho, sorgo e capim massambará. Piracicaba, 1991. 137 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BAKER, R.E.D; CROWDY, S.H.; McKEE, R.K. A review of latent infections caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and allied fungi. **Tropical Agriculture**, Guildford, **17(1):128-132**, 1940.

- BAXTER, A.P.; VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A.; EICKER, A. A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungus genus *Colletotrichum*. **Phytophylactica**, Pretoria, **17**(1): 15 - 18, 1985.
- BERNSTEIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAN, R.A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. **Plant Disease**, St. Paul, **79**(5): 478 - 482, 1995.
- BORRAS, M.A.D.; CERVERA, V.; LUIS, G.; VELA, R.; DIAZ-BORRAS, M.A. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Geotrichum candidum* through action of *Trichoderma viride* and commercial fungicides. **Microbiologie**, Chatenay-Malabry, **11**(4):425-428, 1993.
- BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. Restriction fragment length polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, **94**: 1129-1137, 1990.
- BROWN, G.E. Factors affecting postharvesting development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, St. Paul, **65**(4): 404-409, 1975.

BURDON, J.J. & ROELFS, A.P. The effects of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*. **Phytopathology**, St. Paul, **75**(9): 1068 - 1073, 1985.

BURGER, O.F. Variations in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, **20**(9): 723 - 736, 1921.

CAPPELLINI, R.A.; CEPONIS, M.J.; LIGHTNER, G.W. Disorders in avocado, mango, and pineapple shipments to New York market, 1972 - 1985. **Plant Disease**, St. Paul, **72**(3):270- 273, 1988.

CHANG, L.D.; SR.B.; A.M.; STEWARD, F.C. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*. **Nature**, London, **193**(2): 756 - 759, 1962.

CHIKUO, Y. & KOBAYASHI, N. A study of strawberry anthracnose. (1) Perfect stage of pathogen which originated from the northern area of Kyushu Island and its benomyl resistance. **Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu**, **37**(1):23-26, 1991. Apud **Review of Plant Pathology**, Wallingford, **71**(7):515-516, 1992.

- CHILDERS, C.C. Suppression of *Frankliniella bispinosa* (Thysanoptera: Thripidae) and the fungal pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*, with pesticides during the bloom cycle and improved fruit set on 'Navel' orange in Florida. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore **85**(4):1330-1339, 1992.
- CLARE, B.G. & ZENTMEYER, G.A. Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. **Phytopathology**, St. Paul, **56**(11): 334 -1335, 1966.
- CLARE, B.G. Starch gel electrophoresis of proteins as an aid in identifying fungi. **Nature**, London, **200**(11): 803 - 804, 1963.
- CLAUSEN, R.E. A new fungus concerned in wither tip of varieties of citrus medica. **Phytopathology**, St. Paul, **2**(6):217-234, 1912.
- COOK, R.T.A. & PEREIRA, J.L. Strains of *Colletotrichum coffeanum*, the causal agent of coffee berry disease, tolerant to benzimidazole compounds in Kenya. **Annals of Applied Biology**, London, **83**(3):365-379, 1976.
- COX, M.L. & IRWIN, J.A.G. Conidium and appressorium variation in Australian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Systematic Botany**, Melbourne, **1**(2):139-144, 1988.

- DARVAS, J.M. & KOTZE, J.M. Fungi associated with pre and postharvest diseases of avocado fruit at Westfalia Estate, South Africa. **Phytophylactica**, Pretoria, **19**(1): 83 - 85, 1987.
- DAVIS, R.D.; BOLAND, R.M.; HOWITT, C.J. Colony descriptions, conidium morphology, and the effect of temperature on colony growth of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Stylosanthes* spp. growing in several countries. **Mycological Research**, Cambridge, **96**(2):128-134, 1992.
- DENHAM, T.G. Postbloom fruit drop disease. In: Whiteside, J.O.; Garnsey, Timmer, L.W., Eds. **Compendium of Citrus Diseases**. St. Paul, APS Press, 1989. p. 24-25.
- DENHAM, T.G. & WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, London, **98**(1):65-77, 1981.
- DENHAM, T.G. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. **Pans**, London, **25**(1): 30 - 36, 1979.
- DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S.; KOLATTUKUDY, P.E. Effects of organophosphorous pesticides on cutinase activity and infection of papaya by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, St. Paul, **73**(8):1209-1214, 1983.

DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S.; KOLATTUKUDY, P.E. Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. **Physiology and Plant Pathology**, London, **20**(3): 333-347, 1982.

DICKSON, B.T. *Colletotrichum* v. *Vermicularia*. **Mycologia**, Lancaster, **17**: 213 - 217, 1925.

DODD, J.C.; JEFFRIES, P. ; JEGER, M.J. Management strategies to control latent infection in tropical fruit. **Aspects of Applied Biology**, Wellesbourne, **20**(1), 49 - 56, 1989.

DONADIO, L.C.; CAETANO, A.A.; ROMANO, R. Controle da antracnose do limoeiro Galego. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 3., Rio de Janeiro, 1975. **Anais**. Rio de Janeiro, SBF, 1975. p. 203 - 207.

DORNELLES, C.M.M. O problema da queda de frutos jovens de citros no Rio Grande do Sul. In: Mesa Redonda para Estudo da Queda de Frutos Jovens em Citrus. Taquari, RS, 1977. p.3-6.

DUKE, M.M. The genera *Vermicularia* Fr. and *Colletotrichum* Cda. **Transactions of the British Mycological Society**, London, **13**(2): 156 - 184, 1928.

EASTBURN, D.M. & GUBLER, W.D. Strawberry anthracnose: Detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. **Plant Disease**, St. Paul, **74**(2):161-163, 1990.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.; BARROW, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, **61**(1):42-44, 1971.

FAGAN, H.J. **Premature fruit drop of citrus in British Honduras**. Citrus Research Report, University of the West Indies, 1971. (Bulletin 18).

FAGAN, H.J. Plant pathology and nematology in British Honduras. Citrus Research Report, University of the West Indies, Stann Creek, Belize. 1972. 16 p.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial ground spraying. **Turrialba**, Turrialba, **34**(2): 179 - 186, 1984.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop; a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, London, **91**(1): 13 - 20, 1979.

FAGAN, H.J. Strains of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus in Belize.

Transactions of the British Mycology Society, London, 74(3): 643 - 644, 1980.

FANCELLI, M.I. Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre

isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de

A. solani f.sp. *lycopersici* M.F. Piracicaba, 1991. 80 p. (Doutorado - Escola

Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FAWCETT, H.S. **Citrus diseases and their control.** New York and London, Mc Graw,

1936. 656 p.

FEICHTENBERGER, E. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia

e epidemiologia. **Laranja, Cordeirópolis, 15(1): 109 - 128, 1994.**

FEICHTENBERGER, E. Queda dos frutos jovens de citros, doença induzida por uma

raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja, Cordeirópolis,**

12(2): 513 - 521, 1991.

FERNANDES, M.C.A.; RIBEIRO, R.L.D.; SANTOS, A.S.; AKIBA, F. Ocorrência de isolador de *Colletotrichum gloeosporioides* resistentes ao fungicida Benomyl. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26. Itajaí, 1994. **Resumos Apresentados. Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, **19**(Supl.):284, 1994 .

FIGUEIREDO, G.D.; ALFENAS, A.C.; CROMMONSCHENKEL, S.H.; FARIA, J.C.D. Isoenzymatic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates with different virulence level. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, **36**(4):793-808, 1993.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, **33**:9-13, 1967.

FITZELL, R.D.; PEAK, C.M.; DARNELL, R.E. A model for estimating levels of anthracnose disease of mango. **Annals of Applied Biology**, London, **104**(3):451-458, 1984.

FULTON, H.R. Relative Susceptibility of citrus varieties to attack by *Gloeosporium limetticolum* (Clausen). **Journal of Agricultural Research**, Washington, **30**(7): 629 - 635, 1925.

GARRAWAY, M.O. & EVANS, R.C. Growth of fungi. In: Garraway, M.O. & Evans, R.C., ed. **Fungal nutrition and physiology**. New York, John Wiley & Sons Inc., 1984. p.231-263.

GRIFFEE, P.J. Resistance to Benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, **60**(3):433-440, 1973.

GUNNELL, P.S. & GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, Lancaster, **84**(2): 157 - 165, 1992.

HANSEN, E.M.; BRASIER, C.M., SHAW, D.S.; HAMM, P.B. The taxonomic structure of *Phytophthora megasperma*: evidence for emerging biological species groups. **Transactions of the British Mycological Society**, London, **87**(4):557- 573, 1986.

HAU, B. & KRANZ, J. Mathematical and statistics for analysis in Epidemiology. In: KRANZ, J., ed. **Epidemics of Plant Diseases**. Berlin, Spring-Verlag, 1990. p.12-52.

- HAYDEN, H.L.; PEGG, K.G.; AITKEN, E.A.B.; IRWIN, J.A.G. Genetic relationships as assessed by molecular markers and cross-infection among strains of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, 42 (1):9-18, 1994.
- HOSSAIN, M.S. & MEAH, M.B. Prevalence and control of guava fruit anthracnose. **Tropical Pest Management**, London, 38(2): 181-185, 1992.
- HUETTEL, R.N.; DICKSON, D.W. & KAPLAN, D.T. Biochemical identification of the two races of *Radopholus similis* by starch gel electrophoresis. **Journal of Nematology**, Lawrence, 15:338-344, 1983.
- JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M.J.; PLUMBLEY, R.A. The biology of *Colletotrichum* species on tropical fruit and vegetables. **Plant Pathology**, London, 39, 343-366, 1990.
- JUNQUEIRA, N.T.; ALFENAS, A.C.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L.; GASPAROTTO, L. Variabilidade isoenzimática de isolados de *Mycrocychus ulei* com diferentes níveis de virulência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 12(3): 208-214, 1987.

JVO, P.S. & STOTZKY, G. Electrophoretic analysis of isozymes from seed of *Pinus abces* and *Pseudotsyga*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **51**(11):2201-2205, 1973.

KAJIWATA, T. An Anthracnose of passion fruit caused by *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding et Schrenk. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, **31**(2): 90-100, 1986.

KIM, W.G.; CHO, E.K.; LEE, E.J. Two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose on pepper fruits. **Korean Journal of Plant Pathology**, Seoul, **2**(2):107-113, 1986.

KIM, W.K.; HEATH, M.C.; ROHRINGER, R. Comparative analysis of proteins of *Uromyces phaseoli* var. *typica*, *U. phaseoli* var. *vignae*, and *U. vicial-fabae*: polypeptide mapping by two dimensional electrophoresis. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **63**(12): 2144 - 2149, 1985.

KÖLLER, W. & KOLATTUKUDY, P.E. Mechanisms of action of cutinase: Chemical modification of the catalytic triad characteristic of serine hydrolases. **Biochemistry**, Easton, **21**(13):3083-3090, 1982.

LENNÉ, J.M. & BURDON, J.J. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. **Phytopathology**, St. Paul, **80**(8): 728-731, 1990.

LINDE, D.C.; GROTH, J.V.; ROELFS, A.P. Comparison of isozyme and virulence diversity patterns in the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathology**, St. Paul, **80**(2):141-147, 1990.

LIYANAGE, H.D.; KÖLLER, W.; McMILLAN Jr., R.T.; KISTLER, H.C. Variation in cutinase from two populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, **83**(1): 113 - 116, 1993.

LIYANAGE, H.D.; McMILLAN Jr., R.T.; KISTLER, H.C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, **82**(11):1371-1376, 1992.

LONSDALE, J.H. & KOTZÉ, J.M. Chemical control of mango blossom diseases and the effect on fruit set and yield. **Plant Disease**, St. Paul, **77**(6):558-562, 1993.

LONSDALE, J.H.; LONSDALE, J.M.; GREEF, H.; BROOKS, W. The efficacy of prochloraz, chloramizol-sulphate and guazatine on postharvest diseases of mango. Yearbook. South African Mango Growers Association, Tzaneen, **11**:35-38, 1991.

LU, T.H. & GROTH, J.U. Isozyme detection and variation in *Uromyces appendiculatus*.

Canadian Journal of Botany, Ottawa, **66**: 885-890, 1987.

LUTCHMEAH, R.S. & SANTCHURN, D. Common postharvest deterioration of banana

cv. "Naine" in Mauritius. **Revue Agricole et Sucriere de l'île Maurice**, Port

Louis, **70**(1/2): 28 - 36, 1991.

McMILLAN Jr., R.T. Evaluation of fungicides for control of postbloom fruit drop of

"Tahiti" limes caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Proceedings of the**

Florida State of Horticultural Society, Winter Haven, **104**:160-161, 1991.

McMILLAN Jr., R.T. & NARAYANAN, K.R. Effectiveness of chemical postharvest

treatments for avocado anthracnose control. **Proceedings of the Florida State**

Horticultural Society, Winter Haven, **103**: 232 - 233, 1990.

McMILLAN Jr., R.T. & TIMMER, L.W. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused

by *Colletotrichum gloeosporioides* in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, **73**(1):81,

1989.

MELO, M.B. de & MORAIS, C.F.M. de. Controle químico da queda de frutos jovens

de citros, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 11., Petrolina,

1991. **Programas e Resumos**. Petrolina, SBF, 1991. n.p.

- MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H.
Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*
(Tass) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 1(1):57-66, 1976.
- MILLS, P.R.; HODSON, A.; BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum*
gloeosporioides isolates infecting tropical fruits. In: BAILEY, J.A. & JEGER, M.J.,
ed. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford, CAB
International, 1992. cap. 14, p. 269 - 228.
- MORDUE, J.E.M. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Nº 316, 317,
Kew, 1971.
- MOREIRA, A.M. & ALFENAS, A.C. Diferenciação de espécies de *Cylindrocladium*
por meio da análise eletroforética de proteínas e isoenzimas em géis de
poliacrilamida. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 10(2): 258, 1985.
- MUGNAI, L.; SURICO, G.; RAGAZZI, A. *Glomerella cingulata* on olive in India:
morphological and pathological notes. Bulletin-OEPP, Oxford, 23(3):449-455,
1993. Apud **Review of Plant Pathology**, Wallingford, 73(2):135-136, 1994.

NAQVI, S.A.M.H. Pre-harvest application of fungicides in Nagpur mandarin orchards to control post-harvest storage decay. **Indian Phytopathology**, New Delhi, **46(2)**: 190-193, 1993.

NEWMAN, P.L. & OWEN, H. Evidence of a sexual recombination in *Rhynchosporium secalis*. **Plant Pathology**, London, **34 (3)**: 338 - 340, 1985.

OKIOGA, D.M. Occurrence of strains of *Colletotrichum coffeanum* resistant to methyl benzimidazol-2-ylcarbamate (carbendazim) and chemically-similar compounds. **Annual of Applied Biology**, London, **84(1)**:21-30, 1976.

OROZCO SANTOS, M. & GONZALES GARZA, R. Caída de fruto pequeño y su control en naranja "Valencia" en Veracruz. **Agricultura Técnica en México**, México, **12(2)**: 259-269, 1986.

OSORIO, C.J.A. Control químico de la antracnosis del name *Discorea alata* L. causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, Penz. **Fitopatología Colombiana**, Cali, **13(2)**:72-77, 1989.

PARK, W.M.; LEE, Y.S.; WOLF, G.; HEITEFUSS, R. Differentiation of physiologic races of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. Cav. by PAGE - electrophoresis. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, **117(2)**: 113 - 121, 1986.

PELSAR, P. du T. & LESAR, K.H. Postharvest decay control in mangoes with combinations of prochloraz, imazalil, benomyl on TBZ. Yearbook. South African Mango Grower's Association, Tzaneen, 11: 9-10, 1991. Apud **Review of Plant Pathology**, Wallingford, 73(5):354, 1994.

PEREIRA, R.M.V. Caracterização morfológica, fisiológica, serológica e eletroforética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu ARX, isolado de pimentão (*Capsicum annum* L.) e jiló (*Solanum gilo* Radd.), e seu controle químico. Piracicaba, 1995. 155 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").

PERRENOUD, S. **Potassium and plant health**. 2.ed. Bern, International Potash Institute, 1990. 365 p. (IPI Research Topics, 3).

PERSON, C.; SANBORSKI, D.J.; FORSYTH, F.R. Effect of benzimidazole on detached wheat leaves. *Nature*, London, 180(12):1294-1295, 1957.

PETRUNAK, D.M. & CHRIST, B.J. Isozyme variability in *Alternaria solani* and *A. alternata*. *Phytopathology*, St. Paul, 82(11): 1343 - 1347, 1992.

PIERCE, L. & McCAIN, A.H. Anthracnose of piggyback plant caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. **Journal of Environmental Horticulture**, Washington, 8(4):207-209, 1990.

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

PORTO, O. de M. Efeito da época e número de aplicações de benomyl no controle da queda anormal de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., Recife, 1981. **Anais. Recife, SBF, 1981_b.** p.569- 577.

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

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

PRATES, H.S.; RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L. Observações sobre a doença podridão floral na citricultura paulista. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., Ilhéus, 1995. **Resumos Apresentados. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 20(Supl.):296, 1995.**

RAMANJULU, V. & REDDY, M.R.S. Post-infection changes in Sathgudi sweet orange fruits caused by *Gloeosporium limeticola*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, **42(1)**: 191 - 192, 1989_a.

RAMANJULU, V. & REDDY, M.R.S. Pre-harvest stem-end rot of sathgudi sweet orange caused by *Gloeosporium limeticola*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, **42(1)**: 108 - 109, 1989_b.

RAWLINGS, T.E. **Phytopathological and Botanical Research Methods**. New York, John Wiley & Sons Inc., 1933. 156 p.

REGO, A.M.; MAFFIA, L.A., ALFENAS, A.C. Virulência e análise de isoenzimas de *Colletotrichum orbiculare*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **19(4)**: 552 - 559, 1994.

ROIG, E.; NEUMANN, P.; SIMON, J.P. Growth and isoenzyme comparison of five isolates of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, St. Paul, **80(2)**: 65 - 71, 1990.

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

ROTHWELL, K. & WRIGHT, T.C. Phytokinin activity in some new 6-substituted purines. **Proceedings of the Royal Society. Serie B**, London, **167(2)**:202-223, 1967.

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

SHABI, E. & KATAN, T. Occurrence and control of anthracnose of almond in Israel. **Plant Disease**, St. Paul, **67(12)**: 1364-1366, 1983.

SHABI, E.; KATAN, T.; GERA, H.; ELISHA, S. Taxonomical determination of pathogenic *Colletotrichum gloeosporioides* of almond, anemone and avocado according to fungicide sensitivity. **Phytoparasitica**, Pretoria, **21(1)**:2, 1993.

SHERRIF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; LAFAY, J.F.; BRIGOO, Y.; BAYLEY, J.A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, New York, **18(2)**:121 - 138, 1994.

SIJ, J.W.; TURNES, F.T.; WHITNEY, N.G.. Suppression of anthracnose on soybeans with potassium fertilizer and benomyl. **Better Crops with Plant Food**, Washington, **77(1):12-13**, 1992/1993.

SIMMONDS, M.B.E. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. **Queensland Journal of Agriculture and Animal Sciences**, Brisbane, **22(4):437- 459**, 1965.

SINGH, N.I. Fungi associated with withertip disease of citrus. **Indian Phytopathology**, New Delhi, **42(4): 587-589**, 1989.

SKENE, G.M. Cytokinim-like properties of the systemic fungicide benomyl. **Journal of Horticultural Science**, Cambridge, **47(2):179-182**, 1972.

SMALL, W. On the occurrences of a species of *Colletotrichum*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, **11(1):112-137**, 1926.

SMITH, B.J. & BLACK, L.L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, **74(1): 69 - 76**, 1990.

SMOOTH, J.J. & MELVIN, C.F. Decay of degreened citrus fruit as affected by time of washing and TBZ application. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, **85**: 235 - 238, 1972.

SMOOTH, J.J. & MELVIN, C.F. Postharvest decay of specialty hybrid citrus fruits in relation to degreening time. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, **80**: 246 - 250, 1967.

SOLIDAY, C.L. & KOLATUKUDY, P.E. Isolation and characterization of a cutinase from *Fusarium culmorum* and its immunological comparison with cutinases from *F. solani pisi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, **176**(1):334-343, 1976.

SONODA, R.M. & PELOSI, R.R. Characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, **101**: 36 - 38, 1988.

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

SPENCER, D.M. Results in practice - II. Glasshouse crops. In: MARSH, R.W. ed. **Systemic fungicides**. 2. ed. London and New York, Longman, 1979. cap, 11.II, p. 240-258.

SUTTON, B.C. *Colletotrichum demathium* (Pers. ex Fries) Grove and *C. trinchellum* (Fx Fr.) Duke. **Transactions of the British Mycological Society**, London, **45(2):222-232**, 1962.

SUTTON, B.C. Development of fructifications in *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. and related species. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **44(7):887-897**, 1966.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. London, CMI, 1980. 696 p.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A. & JEGER, M.J., ed. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford, CAB International, 1992. cap. 1, p.1-26.

SZECSI, A. & TOTH, S. Comparison of isolates in the *Chaetomium aureum* species group by esterase isoenzyme analysis. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, **65(1):198-201**, 1987.

TARIQ, V.N.; GUTTERIDGE, C.S.; JEFFRIES, P. Comparative studies of cultural and biochemical characteristics used for distinguishing species within *Sclerotinia*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, **84**(3): 381 - 397, 1985.

TAUBENHAUS, J.J. A study of some *Gloeosporium*s and their relation to a sweet pea disease. **Phytopathology**, St. Paul, **1**(6): 196 - 202, 1911.

THIND, T.S. & JHOOTY, J.S. Studies on variability in two *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose and fruit rot of chillies in Punjab. **Indian Phytopathology**, New Delhi, **43**(1): 53-58, 1990.

TIFFANY, L.H. & GILMAN, J.C. Species of *Colletotrichum* from legumes. **Mycologia**, Lancaster, **46**: 52 - 75, 1954.

TIMMER, L.W. & ZITKO, S.E. Aerial applications of fungicide for control of postbloom fruit drop. **Citrus Industry**, Bartow, **73**:26-27, 1991.

TIMMER, L.W. & ZITKO, S.E. Timing of fungicide applications for control of postblom fruit drop of citrus in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, **76**(8):820-823, 1992.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIKAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, **78**(4): 329 - 334, 1994.

ULLASA, B.A. Influence of time of application of some fungicides on their efficacy against mango anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease Research**, Ludhiana, **4**(2):196-197, 1989.

ULLASA, B.A. & RAWAL, R.D. Occurrence of stem - end rot of Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) and its control through post-harvest treatment with fungicides. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, **58**(4): 324 - 326, 1988.

WILSON, G.W. The identity of the anthracnose of grasses. **Phytopathology**, St. Paul, **4**(2): 106 - 112, 1914.