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

**Isolamento e identificação de substâncias provenientes da
laranjeira ‘Valência’ (*Citrus sinensis*) envolvidas no estímulo e/ou
quebra da dormência de estruturas quiescentes de *Colletotrichum*
acutatum, agente causal da podridão floral dos citros**

Simone Cristiane Brand

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

**Piracicaba
2012**

Simone Cristiane Brand
Engenheiro Agrônomo

**Isolamento e identificação de substâncias provenientes da laranjeira ‘Valência’
(*Citrus sinensis*) envolvidas no estímulo e/ou quebra da dormência de
estruturas quiescentes de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão
floral dos citros**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

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

**Piracicaba
2012**

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

Brand, Simone Cristiane

Isolamento e identificação de substâncias provenientes da laranjeira 'Valência' (*Citrus sinensis*) envolvidas no estímulo e/ou quebra da dormência de estruturas quiescentes de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros / Simone Cristiane Brand. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Água de lavagem 2. Compostos voláteis 3. Fungos fitopatogênicos 4. Laranja
5. Podridão floral dos citros I. Título

CDD 634.31
B817i

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

Aos meus pais,

Guído Afonso Brand e Romana Franke Brand,

pelo exemplo de vida, educação, confiança e amor em todos os dias de minha vida. Pelo apoio em todas as etapas e decisões e pela força para superar a distância, por vezes dolorida. Essa conquista é de Vocês! Amo Vocês!

DEDICO.

A minha querida “maninha” Sílvane,

pela amizade, apoio e carinho constantes. Amo você!

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, por cada novo dia, pela fé para superar obstáculos e dificuldades, pelos momentos de alegria, por tudo que me proporcionou ao longo desses anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, junto com a equipe docente, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Sérgio F. Pascholati pelos ensinamentos, orientação, conselhos, paciência e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

À Dr. Silvia Blumer pela grande ajuda em todos os momentos e, principalmente pela amizade. A Rafaela Roma pelo auxílio nos trabalhos e pela amizade.

Às colegas de curso e queridas amigas Dalilla Rezende e Caroline Rabelo pelas palavras de apoio, pelo auxílio nos trabalhos, pelos momentos de descontração, o meu agradecimento especial.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Fitopatológica: Cynthia Renata Lima Sá, Dayson Brandão, Greicy Andrea Sarria Villa, Luiz Rafael Pinto, Nikolas Cristofolletti, Nívea Tonucci e Sara Mondoni pelos momentos de descontração que partilhamos e pelo aprendizado. E os amigos desde a época do estágio: André Beltrame, Ariana Vilela, Fernando Cappello, Josué Chou, Leonardo Toffano, Luciana Iurkiv, Marisa Faulin e Ueliton Messias, pelo aprendizado proporcionado.

Ao Prof. Francisco André Tanaka e o Técnico Renato Salaroli pela ajuda no preparo das amostras pela visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia Fabrício Packer, Guilherme Frare e Isabela Primiano e a laboratorista Silvia Lourenço, pela troca de idéias e auxílio e também pela amizade.

Aos colegas do curso e disciplinas pela convivência e estudos conjuntos. Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelo auxílio sempre que necessário.

Ao Dr. Jorgino Pompeu Júnior do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” pelo auxílio na obtenção de flores de laranja ‘Valência’ no início dos estudos.

À Sanicitrus, que gentilmente cedeu as mudas de laranja ‘Valência’ utilizadas nos testes e para indução de floração.

À laboratorista Solange Aparecida Vieira Barros, do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ, pela pronta disposição em auxiliar na liofilização das amostras, bem como ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Cena/ESALQ.

Ao Prof. Fábio Augusto e ao aluno de doutorado Leandro Wang Hantao do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas pelo auxílio na etapa de identificação de compostos voláteis.

Ao Prof. Edson Rodrigues Filho e aluna de doutorado Livia Soman de Medeiros do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos e a Prof.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva do Laboratório de Produtos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos pela grande ajuda na etapa de identificação de substâncias.

Ao Pós-doutorando Prof. Luiz Roberto Martins Pinto e ao Prof. Carlos Tadeu dos Santos Dias do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao meu namorado Marcelo Marques, pelo carinho, apoio, paciência, auxílio nas análises e pela presença tão importante nessa etapa da minha vida.

À Prof.^a Elena Blume e Prof.^a Marlove Muniz pela valiosa contribuição no início da minha vida acadêmica e científica e pela amizade. Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria pelo apoio mesmo de longe.

Aos demais amigos da ESALQ e aos amigos que mesmo distantes torceram por mim e contribuíram para que hoje eu estivesse aqui.

Às amigas de República ao longo destes dois anos Jaislanny Medeiros, Lilian Heloisa, Luciane Mendes, Marina Medeiros, Meire Alves, Rafaela Felipe e Vanessa Caron pela agradável convivência e momentos de descontração.

Aos familiares que mesmo de longe torceram muito por mim. Um agradecimento especial a minha querida Tia Bia.

Enfim, a todos que de uma ou outra forma acompanharam essa caminhada e contribuíram na construção deste trabalho.

Muito obrigada, de coração!

*Um tempo que aprendi a entender as coisas do mar,
a conversar com as grandes ondas
e não discutir com o mau tempo.
A transformar o medo em respeito,
o respeito em confiança.
Descobri como é bom chegar quando se tem paciência.
E, para se chegar, onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.
É preciso, antes de mais nada, querer.
(Amyr Klink)*

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 A cultura dos citros.....	21
2.2 Podridão floral dos citros (PFC).....	22
2.2.1 Histórico e importância.....	22
2.2.2 Etiologia.....	23
2.2.3 O ambiente e a doença.....	24
2.2.4 Sintomatologia.....	25
2.2.5 Ciclo da doença.....	26
2.2.6 Controle.....	28
2.3 Substâncias vegetais exógenas e sua ação sobre patógenos.....	28
2.3.1 Substâncias solúveis em água.....	28
2.3.2 Compostos voláteis.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Obtenção dos isolados fúngicos.....	33
3.2 Obtenção das águas de lavagem brutas (ALBs).....	34
3.3 Efeitos das águas de lavagem brutas.....	35
3.3.1 Efeito <i>in vitro</i> das ALBs sobre a germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Colletotrichum acutatum</i>	35
3.3.2 Efeito <i>in vitro</i> das ALBs sobre conídios e apressórios quiescentes de <i>Colletotrichum acutatum</i>	36
3.3.3 Efeito <i>in vitro</i> das ALBs sobre micélio quiescente de <i>Colletotrichum acutatum</i>	37
3.3.4 Efeito das ALBs sobre estruturas quiescentes de <i>Colletotrichum acutatum</i> em folhas de laranjeira ‘Valência’.....	38
3.3.4.1 Método 1.....	39
3.3.4.2 Método 2.....	39
3.3.4.3 Método 3.....	40
3.3.4.4 Método 4.....	40
3.3.5 Efeito das ALBs sobre a severidade da PFC em laranjeira ‘Valência’.....	40

3.4 Efeitos dos compostos voláteis (CVs).....	41
3.4.1 Efeito <i>in vitro</i> dos compostos voláteis brutos (CVBs) oriundos de flores, botões, folhas velhas e folhas novas de laranjeira ‘Valência’ na germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Colletotrichum acutatum</i>	41
3.4.2 Efeito <i>in vitro</i> dos CVs identificados a partir de flores e botões de laranjeira ‘Valência’ na germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Colletotrichum acutatum</i>	41
3.5 Identificação de substâncias oriundas de plantas cítricas.....	42
3.5.1 Substâncias solúveis em água.....	42
3.5.2 Identificação de variação na composição das ALBs.....	46
3.5.3 Compostos voláteis.....	47
3.6 Análise dos dados.....	49
4 RESULTADOS OBTIDOS.....	51
4.1 Águas de lavagem brutas (ALBs).....	51
4.1.1 Efeito <i>in vitro</i> das ALBs sobre a germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Colletotrichum acutatum</i>	51
4.1.2 Efeito <i>in vitro</i> das ALBs sobre conídios e apressórios quiescentes de <i>Colletotrichum acutatum</i>	55
4.1.3 Efeito <i>in vitro</i> das ALBs sobre micélio quiescente de <i>Colletotrichum acutatum</i>	60
4.1.4 Efeito das ALBs sobre estruturas quiescentes de <i>Colletotrichum acutatum</i> em folhas de laranjeira ‘Valência’.....	62
4.1.5 Efeito das ALBs sobre a severidade da PFC em laranjeira ‘Valência’.....	66
4.2 Compostos voláteis (CVs).....	67
4.2.1 Efeito <i>in vitro</i> dos compostos voláteis brutos (CVBs) oriundos de flores, botões, folhas velhas e folhas novas de laranjeira ‘Valência’ na germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Colletotrichum acutatum</i>	67
4.2.2 Efeito <i>in vitro</i> dos CVs identificados a partir de flores e botões de laranjeira ‘Valência’ na germinação de conídios e formação de apressórios de <i>Colletotrichum acutatum</i>	71
4.3 Identificação de substâncias oriundas de plantas cítricas.....	75
4.3.1 Substâncias solúveis em água.....	75
4.3.2 Identificação de variação na composição das ALBs.....	86

4.3.3 Compostos voláteis.....	89
5 CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS.....	95

RESUMO

Isolamento e identificação de substâncias provenientes da laranjeira ‘Valência’ (*Citrus sinensis*) envolvidas no estímulo e/ou quebra da dormência de estruturas quiescentes de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros

A podridão floral dos citros (PFC), causada por *Colletotrichum acutatum*, induz a abscisão de frutos jovens, podendo causar perdas de até 100%. A presença de inóculo viável na forma de conídios e/ou apressórios quiescentes na planta justifica a ocorrência generalizada da doença. Em períodos de chuva a PFC é agravada, possivelmente, em função de substâncias lavadas das diferentes partes da planta, as quais contêm metabólitos que estimulam o desenvolvimento do fungo. Diante do exposto, objetivou-se verificar o efeito das águas de lavagem brutas (ALBs) de flores, botões, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) e mistura destas sobre conídios, apressórios e hifas quiescentes de *C. acutatum* (isolados 61A e 142) *in vitro* e *in vivo* e sobre a severidade da PFC, bem como identificar substâncias presentes nas ALBs, exibindo a atividade biológica de interesse. Além disso, buscou-se verificar variações na composição das ALBs. O efeito de compostos voláteis brutos (CVBs) e os identificados a partir de laranjeira ‘Valência’ (linalol, limoneno, mirceno, nonanal e a mistura destes) sobre o desenvolvimento do patógeno também foi avaliado. Todas as frações das ALBs estimularam a germinação dos conídios do fungo, sendo que a ALB de flores apresentou o maior estímulo para ambos os isolados. Para apressórios quiescentes (isolado 61A), o maior estímulo foi verificado nos tratamentos com ALBs de botões e da mistura e para conídios no tratamento mistura. Os maiores valores para comprimento do tubo germinativo foram observados nos tratamentos mistura, FN e botões. Para as estruturas quiescentes, o efeito das ALBs foi mais significativo para o isolado 142. Não foi observado efeito das ALBs sobre o micélio quiescente. Houve estímulo da germinação de conídios e ramificação de hifas *in vivo*, principalmente, em resposta ao tratamento com ALB de botões. A aplicação da ALB da mistura em flores resultou em maior severidade da PFC. Por sua vez, os CVBs apresentaram efeito inibitório. A exposição do isolado 61A aos voláteis (CVs) linalol, nonanal e mistura, resultou em germinação apenas na menor dose. O mirceno manteve a germinação semelhante a testemunha em todas as doses testadas, assim como limoneno nas doses de 0,005 a 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Todos os voláteis reduziram o comprimento do tubo germinativo. Para o isolado 142, houve redução em todas as variáveis para todas as doses dos CVs. Houve variações na composição das ALBs nas diferentes coletas, o que explica em parte a variação na capacidade de estímulo em alguns testes. Na ALB de flores, identificou-se a presença de cafeína, dos flavonóides glicosilados hesperidina e naringina, além de compostos glicosilados e peptídeos. Nas partes vegetais de laranjeira ‘Valência’ foram identificados 54 CVs. As ALBs apresentam efeito estimulatório sobre conídios e apressórios quiescentes de *C. acutatum* *in vitro* e *in vivo*, bem como sobre a severidade da PFC. Os CVs linalol, limoneno, mirceno, nonanal e a mistura destes são, de forma geral, inibitórios ao desenvolvimento de *C. acutatum*.

Palavras-chave: Água de lavagem; Lixiviados; Hesperidina; Cafeína; Oligossacarídeos

ABSTRACT

Isolation and identification of substances from sweet orange 'Valencia' (*Citrus sinensis*) involved in the stimulation and/or dormancy-breaking of quiescent structures of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of citrus postbloom fruit drop

The postbloom fruit drop of citrus (PFDC), caused by *Colletotrichum acutatum*, induces abscission of young fruits, and it may cause losses up to 100%. The presence of viable inoculum in the form of conidia and/or quiescent appressoria on the plant justifies the widespread occurrence of the disease. Under rain, the PFDC is increased, possibly due to substances washed from different parts of the plant, which contain metabolites that stimulate the development of the fungus. Therefore, we aimed to determine the effect of watery washing (WWs) of flowers, flower buds, old leaves (OL) and young leaves (YL) and the mixture of them on quiescent conidia and hyphae of *C. acutatum* (isolates 61A and 142) *in vitro* and *in vivo* and on the severity of the PFDC, and to identify substances in the WWs, exhibiting the biological activity of interest. In addition, variations in the composition of WWs were determined. The effect of crude volatile compounds (CVCs) and those identified from 'Valencia' sweet orange (linalool, limonene, myrcene, nonanal and the mixture of them) on the development of the pathogen was also evaluated. All fractions of WWs stimulated spore germination, and the flower WW exhibited the highest effect for both isolates. For quiescent appressoria (isolate 61A), the highest stimulus was observed in treatments with WWs from flower buds and the mixture and for quiescent conidia in the treatment mixture. The highest values for germ tube length were observed on the treatments mixture, YL and flower buds. For the quiescent structures, the effect of WWs was more significant for isolate 142. There was no effect of WWs on the quiescent mycelium. There was stimulation of conidia germination and hyphal branching *in vivo* in response mainly to treatment with WW from flower buds. The application of the mixture of WW in flowers resulted in higher severity of the PFDC. On the other hand, the CVCs showed inhibitory effect. Exposure of the isolate 61A to the volatiles (VCs) linalool, nonanal and the mixture of them, resulted in germination only at the lowest concentration. The germination on myrcene was similar to control at all doses tested as well as on limonene at doses from 0.005 to 0.25 mL mL⁻¹. All volatiles reduced the length of the germ tube. In the case of isolate 142, a reduction in all variables for all concentration of VCs was observed. There were changes in the composition of WWs based upon times of harvesting, which partly explains the variations observed in the ability to stimulate the structures in some experiments. In flower WWs, we identified the presence of caffeine, the flavonol glycosides hesperidin and naringin, glycosylated compounds and peptides. In the plant parts of sweet orange 'Valencia' were identified 54 VCs. The WWs have stimulatory effect on quiescent conidia and appressoria of *C. acutatum* *in vitro* and *in vivo* as well as in the severity of the PFDC. The VCs linalool, limonene, myrcene, nonanal and the mixture of them are, in general, inhibitory to the development of *C. acutatum*.

Keywords: Leaching; Washing; Hesperidin; Caffeine; Oligosaccharides

1 INTRODUÇÃO

A citricultura, em especial a paulista, constitui-se em setor de destaque no cenário brasileiro e mundial. No entanto, como em qualquer outra cultura, as doenças acarretam elevados prejuízos à cultura dos citros, podendo ocasionar elevadas perdas, quando as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno e quando não são tomadas as medidas adequadas para o controle. A doença conhecida como podridão floral dos citros (PFC) é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, que ao afetar as flores induz a abscisão de frutos jovens, podendo ocasionar perdas na produção de até 100%. Essa doença constitui-se em um dos principais problemas da cultura em áreas úmidas onde se produz citros nas Américas (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Os sintomas surgem em épocas de intensa pluviosidade e florada, sendo observadas manchas de tonalidade marrom ou alaranjada nas pétalas. Quando as condições ambientais são propícias, lesões se desenvolvem rapidamente, podendo afetar todo o tecido. A infecção tem como resultado o amarelecimento de frutos recém-formados que se destacam da base do ovário e caem, ficando os cálices aderidos à planta, estrutura conhecida como “estrela” ou “estrelinha” (PERES, 2002).

Uma das hipóteses que justificam a ocorrência generalizada da PFC em um pomar seria a presença de inóculo viável, podendo este estar presente em plantas assintomáticas ou mesmo em plantas daninhas. Experimentos realizados por Agostini e Timmer (1992), em condições controladas, mostraram que o patógeno pode sobreviver na forma de conídios e apressórios aderidos às folhas ou, ainda, na condição de infecção quiescente. Por sua vez, Zulfiqar; Brlansky; Timmer (1996) relataram que apressórios quiescentes aderidos às folhas são estimulados ao desenvolvimento em resposta à aplicação de extrato floral, que induz a estrutura a germinar, formando hifas e novos conídios. Apesar do termo germinação de apressórios não ser conceitualmente correto, a literatura pertinente menciona desta forma (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996).

O estudo do efeito dos lixiviados ou das águas de lavagem oriundas de plantas visa simular as condições que podem ocorrer com as estruturas de sobrevivência do patógeno em folhas assintomáticas com a ação da chuva. Esta atua lavando substâncias presentes em folhas, flores e botões florais, as quais podem resultar em estímulo a germinação de conídios e/ou maior desenvolvimento

do patógeno, os quais podem servir como fonte primária de inóculo para a infecção de flores e botões florais. O entendimento de como a doença se estabelece e evolui torna-se importante no estabelecimento de estratégias de manejo e controle, com vistas à irrigação e aplicação de fungicidas.

A hipótese levantada no presente estudo é que a chuva age lixiviando substâncias presentes em flores, botões florais, folhas velhas e folhas novas, as quais atuam estimulando conídios, apressórios e hifas quiescentes, levando a produção de conídios secundários, sendo estes a fonte de inóculo primária para infecção de flores e botões florais na estação seguinte. Pouco se sabe sobre quais substâncias estariam presentes nestas águas de lavagem e qual seria a substância específica atuante na quebra da condição quiescente do fungo *C. acutatum*, aspectos estes que se procurou elucidar no presente trabalho. Além de substâncias solúveis em água, compostos voláteis oriundos das plantas cítricas podem estar presentes atuando sobre estas estruturas quiescentes.

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram: obter águas de lavagem de flores, botões florais, folhas velhas e folhas novas de plantas cítricas com capacidade de estímulo e/ou quebra de dormência de conídios, apressórios e hifas quiescentes de *C. acutatum*; isolar e identificar substâncias presentes nas frações da água de lavagem, exibindo a atividade biológica de interesse; verificar a atividade de compostos voláteis brutos oriundos de flores, botões florais, folhas velhas e folhas novas de laranjeira 'Valência' e compostos voláteis purificados a partir dessas sobre o desenvolvimento do patógeno; avaliar a diferença de sensibilidade de dois isolados do fungo aos compostos voláteis e às águas de lavagem.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura dos citros

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Citrinae. Esta compreende também os gêneros *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus*, *Clymenia* e outros (SWINGLE; REECE, 1967). Originárias do continente asiático, as plantas cítricas foram introduzidas no Brasil, possivelmente na Bahia, pelas primeiras expedições colonizadoras (ALVES; MELO, 2010). Segundo estes autores, aqui com melhores condições para vegetar e produzir do que nas regiões de origem, a cultura se expandiu por todo o país, sendo que a citricultura brasileira hoje detém a liderança mundial, destacando-se pela promoção do crescimento sócio-econômico, contribuindo com a balança comercial nacional e como importante geradora direta e indireta de empregos.

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de citros, seguido dos Estados Unidos, sendo que o Estado de São Paulo é responsável por aproximadamente 80% da produção brasileira. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - Conab (2011), o volume de laranja a ser produzido no ano safra 2011/12, neste Estado, tende a ser maior que o do ano safra 2010/11, pois os adventos climáticos ocorridos nesta safra resultaram em queda na produção. Boteon (2011) relatou que os motivos para a redução na produção foram, inicialmente, a incidência da podridão floral (setembro de 2009) e a estiagem prolongada entre o outono e o inverno de 2010, causando perda de peso do fruto e até queda dos frutos nos pomares mais debilitados. Desse modo, para o ano safra 2011/12, a Conab estima uma área de 601,6 mil hectares com produção comercial de 355 milhões de caixas de 40,8 kg de laranja, para o Estado de São Paulo, dos quais 85% deverão ser destinados às indústrias processadoras de suco e 15% para o mercado *in natura*, percentuais semelhantes aos obtidos na safra anterior (CONAB, 2011).

Na maioria dos países citrícolas, as laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) são as mais produzidas ocupando, aproximadamente, dois terços dos plantios (POMPEU JUNIOR, 2001). As principais cultivares de laranja doce destinadas à produção de suco no Brasil são 'Pêra', 'Valência', 'Natal' e 'Hamlin', tendo como porta-enxerto, geralmente, o limão 'Cravo' (PIO et al., 2005). Em levantamento anterior estimou-se, quanto ao percentual de volume por variedade, que cerca de 90% da produção Paulista é composta pelas variedades 'Valência', 'Pêra', 'Hamlin' e 'Natal' (CONAB, 2011).

2.2 Podridão floral dos citros (PFC)

2.2.1 Histórico e importância

Os sintomas de podridão floral dos citros (PFC) foram observados pela primeira vez em 1957, em Belize, América Central, sendo o agente causal, mais tarde, descrito como *Colletotrichum gloeosporioides* (FAGAN, 1979). No Brasil, o primeiro relato da doença foi no Rio Grande do Sul (PORTO; ROSSETTI; DORNELLES, 1979). Em pomares do Estado de São Paulo foi constatada posteriormente, causando prejuízos nas safras 77/78 e 90/91 (FEICHTENBERGER, 1991). A doença foi identificada na Flórida em 1983, causando grandes prejuízos durante a primavera de 1988, principalmente em pomares de laranjas de umbigo e de 'Valência' (SONODA; HEBB, 1991).

As regiões Norte, Nordeste e Centro do Estado de São Paulo respondem por 60 a 70% da produção de citros do Estado (NEVES et al., 2010). Segundo os mesmos autores, no entanto, entre 2005 e 2009, houve aumento de 89% no número total de árvores na região Sudoeste. Além disso, 42% das árvores novas (de zero a dois anos de idade) do cinturão citrícola estão nessa região, fator que indica a importância cada vez maior da região na participação da produção total do cinturão nos próximos anos.

A migração da citricultura para a região Sudoeste deve-se a vários fatores: microclima mais privilegiado ao cultivo citrícola, com uma melhor distribuição de chuvas ao longo do ano; valor inferior da terra; alternativa para reduzir a morte súbita dos citros e clorose variegada dos citros no início da migração e, atualmente, devido ao huanglongbing, que nessa nova fronteira não ameaça os pomares e cujo controle é oneroso e dependente de alta tecnologia (NEVES et al., 2010). A melhor distribuição de chuvas reflete em redução nos custos de produção, devido à redução nos gastos com irrigação, porém torna o clima mais propício à PFC.

Peres (2002) relata que as perdas de produção são esporádicas na região citrícola ao Norte do Estado de São Paulo, porém, as epidemias são mais frequentes e podem causar perdas quase todos os anos, por exemplo, na região de Itapetininga, ao Sudoeste do Estado, considerada um novo pólo citrícola paulista, tendo sido verificada redução de 80% na produção nos anos de 1996/1997. Segundo Feichtenberger et al. (2005), no Sudoeste Paulista a PFC constitui-se na principal doença fúngica da cultura, sendo que, nas demais regiões produtoras paulistas, a doença é grave apenas em anos chuvosos. Segundo a Conab (2009), a

incidência da PFC, nos últimos quatro anos, vem ocasionando prejuízos aos citricultores, da ordem de 20 a 30 milhões de dólares/ano.

2.2.2 Etiologia

Agostini; Timmer; Mitchell (1992) em estudo sobre isolados de *C. gloeosporioides* de plantas cítricas identificaram três estirpes com distintas características morfológicas e patogênicas: FGG (“fast-growing gray”), com rápido crescimento em meio de cultivo e incapaz de causar podridão floral; SGO (“slow-growing orange”), com crescimento lento em meio de cultivo e patogênica em botões florais e, KLA (“Key lime anthracnose”), com características morfológicas semelhantes à estirpe SGO e, associada à antracnose do limão galego. Apenas mais tarde, com o uso de análises moleculares, as estirpes SGO e KLA foram reclassificadas como *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds e diferenciadas da estirpe FGG de *C. gloeosporioides* (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996). No entanto, em 2011, Lima e colaboradores identificaram *C. gloeosporioides* como novo agente causal da doença, sendo que 17,3% dos isolados oriundos de flores sintomáticas foram representados por esta espécie (LIMA et al., 2011).

C. acutatum apresenta como fase teleomórfica *Glomerella acutata*, pertencente ao Reino Fungi, Subreino Dikarya, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Ordem Incertae sedis, Família Glomerellaceae (MASSOLA JR; KRUGNER, 2011; INDEX FUNGORUM, 2011). O gênero *Glomerella* produz ascocarpos do tipo peritécio, contendo ascos unitunicados, cilíndricos a levemente clavados em seu interior, os quais contêm os ascósporos unicelulares, hialinos, elipsóides, retos ou ligeiramente curvos (MASSOLA JR.; KRUGNER, 2011).

A fase anamórfica, *C. acutatum* produz conídios fusiformes, asseptados, hialinos, com dimensões de 8 a 16 µm por 2,5 a 4 µm. Os apressórios são clavados a arredondados, escuros, com 4,7 a 6,1 µm (ALVES; DEL PONTE, 2011). O fungo apresenta crescimento lento em meio de cultivo, produzindo colônias de coloração branca com leve pigmentação cinza e massa de conídios de coloração rósea-alaranjada (FEICHTENBERGER et al., 2005).

2.2.3 O ambiente e a doença

As epidemias de PFC estão associadas à alta pluviosidade durante o florescimento (AGOSTINI; GOTTWALD; TIMMER, 1993). Os autores verificaram que maior incidência foi associada com quantidade e uniformidade de distribuição das chuvas durante o florescimento; respingos de água da chuva ou da irrigação durante a floração parecem ser importante fator da dispersão localizada da PFC; chuvas associadas a ventos aumentam a dispersão do patógeno e, por conseguinte, da doença. Segundo Peres (2002), outros fatores ambientais que também são importantes para o desenvolvimento da doença são o orvalho e a neblina, pois podem resultar em infecção localizada de flores, a partir de folhas ou outras flores infectadas, aumentando assim a disponibilidade de inóculo. Segundo a mesma, porém, mesmo com extensos períodos de molhamento, sem a força da chuva, as infecções ficam geralmente localizadas.

Timmer et al. (1994) mostraram que as condições que propiciam a ocorrência de mais de uma florada e/ou variedades que florescem mais de uma vez por ano, favorecem a ocorrência da doença. Por sua vez, os limões verdadeiros e a lima ácida 'Tahiti' são mais suscetíveis, seguidas das laranjas doces, enquanto as tangerinas são mais tolerantes (FEICHTENBERGER et al., 2005). Segundo os autores, as variedades que apresentam vários surtos de floração, como os limões verdadeiros, a lima ácida 'Tahiti' e algumas variedades de laranja doce, como a 'Pêra', são mais sujeitas ao ataque do fungo. Nessas variedades, a probabilidade de ocorrência de condições ambientais favoráveis durante pelo menos um dos surtos de florescimento é maior; além disso, as infecções provocadas pelo fungo em floradas precoces contribuem para um aumento do inóculo para infecções nas floradas subsequentes (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Quanto à temperatura, verifica-se que não é tão importante quanto as chuvas para o desenvolvimento da doença. O efeito da temperatura sobre a PFC pode ser direto, atuando sobre o fungo, e indireto, influenciando a duração do período de florescimento das plantas (FEICHTENBERGER et al., 2005). A faixa ótima de temperatura para o crescimento *in vitro* de *C. acutatum* está entre 23 e 27°C (AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL, 1992; PERES, 1998; FEICHTENBERGER et al., 2005), embora possa se desenvolver na faixa de 15 a 30°C (FEICHTENBERGER et al., 2005). Apesar das baixas temperaturas reduzirem o desenvolvimento da doença sob condições de campo, por outro lado, reduzem também a velocidade de

desenvolvimento da florada podendo, assim, prolongar o período em que as flores estão suscetíveis às infecções (TIMMER, 1993; TIMMER et al., 1994; FEICHTENBERGER et al., 2005).

2.2.4 Sintomatologia

A PFC afeta principalmente flores recém-formadas, sendo mais severa em períodos de precipitação intensa durante o florescimento. Os sintomas caracterizam-se por lesões necróticas de coloração róseo-alaranjada (Figura 1A), geralmente nas pétalas, após a abertura dos botões florais, comprometendo todos os tecidos das pétalas, que ficam rígidas e secas, mantendo-se firmemente aderidas ao disco basal por vários dias (FEICHTENBERGER et al., 2005). Em ataques severos, as lesões podem ocorrer antes mesmo da abertura das flores, provocando a completa podridão dos botões florais. Ainda, segundo os autores, os frutos recém-formados apresentam uma descoloração amarelo-pálida e caem rapidamente, enquanto os discos basais, os cálices e os pedúnculos ficam firmemente aderidos aos ramos, formando estruturas típicas da doença que recebem a denominação de “estrelinhas” (Figura 1B). Estas podem permanecer retidas nos ramos por mais de 18 meses, sendo que plantas com muitos cálices do ano anterior não florescem e comportam-se como se estivessem carregando frutos, podendo assim comprometer o florescimento no ano seguinte (FEICHTENBERGER, 1991). Sintomas também podem ocorrer no pistilo (estigma e estilete), onde são formadas lesões de coloração marrom ou negra (LIN et al., 2001).

Figura 1 – Sintoma de podridão floral dos citros em pétalas. Lesões necróticas de coloração róseo-alaranjada em pétalas (A); estrelinhas, estrutura típica da doença, formada após a queda precoce dos frutos (B). Fonte: FUNDECITRUS (2008)

2.2.5 Ciclo da doença

O ciclo das relações patógeno-hospedeiro é constituído de cinco processos básicos: sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução (AMORIM; PASCHOLATI, 2011). O desenvolvimento de doenças infecciosas é resultado desse conjunto de processos.

Em flores, a germinação dos conídios de *C. acutatum* se inicia após um período de molhamento de 12 a 24 h. A germinação dos conídios e a infecção das pétalas podem ocorrer em 24 a 48 h, havendo a formação de apressórios. Após quatro a cinco dias aparecem as lesões, quando novos conídios são produzidos (FEICHTENBERGER et al., 2005). Segundo Peres et al. (2005), o fungo coloniza as flores necrotroficamente, enquanto que em folhas, onde pode sobreviver entre estações, o patógeno atua biotroficamente.

Em pétalas infectadas, a produção de conídios em acérvulos é muito grande em condições de alta umidade (FEICHTENBERGER et al., 2005). Segundo os mesmos, a água promove a dissolução da mucilagem que envolve os conídios e os respingos de água, contendo os conídios, constituem a mais importante via de disseminação do patógeno. Para disseminação a maiores distâncias, o vento com chuvas desempenha papel importante (AGOSTINI; GOTTWALD; TIMMER, 1993). Segundo Feichtenberger et al. (2005), os insetos que visitam flores infectadas, os colhedores, os equipamentos e materiais de colheita também podem disseminar o fungo a longas distâncias.

A sobrevivência de *C. acutatum* é um dos aspectos intrigantes no ciclo do patógeno e desempenha papel fundamental no desenvolvimento da PFC. Trabalhos com morango têm mostrado que o fungo pode sobreviver de diferentes formas contribuindo como fonte de inóculo, porém suspeita-se que em citros o fungo sobreviva de maneira similar. Há relatos da sobrevivência do patógeno em plantas daninhas (PARIKKA; LEMMETTY, 2009; FREEMAN; HOROWITZ; SHARON, 2001) e hospedeiros alternativos (FREEMAN; HOROWITZ; SHARON, 2001). Em citros, *C. acutatum* já foi relatado sobrevivendo em folhas (AGOSTINI; TIMMER, 1994; ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996) e também em ramos, estrelinhas e outros órgãos verdes da planta na forma de apressórios ou hifas subcuticulares e intercelulares, os quais podem germinar em resposta aos nutrientes lixiviados das flores, produzindo conídios que podem iniciar novas infecções (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Neste sentido, Agostini e Timmer (1994) sugeriram o seguinte ciclo da PFC, na época, descrita como ocasionada pela estirpe SGO de *C. gloeosporioides*: conídios são produzidos em abundância em acérvulos, em pétalas infectadas durante a primavera. Estes conídios são lavados para tecidos vegetativos, onde podem germinar formando apressório e provavelmente algumas infecções quiescentes. Na próxima florada, pétalas que caem na superfície de folhas fornecem substâncias que estimulam a germinação dos apressórios, formando novos conídios na superfície. Estes conídios são dispersos por respingos de chuva para novas flores e reiniciam o ciclo. Peres et al. (2005) também descreveram o ciclo da doença de maneira similar (Figura 2).

Com base no exposto acima, pode-se supor que estas substâncias, oriundas de flores, também podem atuar de forma semelhante quando da sobrevivência de *C. acutatum* em plantas daninhas. Além disso, substâncias oriundas das folhas e botões florais também podem desempenhar papel similar. Dessa forma, está claro o papel das águas de lavagem no estímulo a estruturas de infecção do fungo, as quais darão origem a fonte de inóculo no próximo ciclo.

Figura 2 – Ciclo da podridão floral dos citros causada por *Colletotrichum acutatum*. Fase biotrófica longa em folhas e cálices persistentes. Fase necrotrófica ocorre somente em flores. a = apressório; c = conídio; sc = conídio secundário. Adaptado de Peres et al. (2005)

2.2.6 Controle

O controle da PFC é baseado em um conjunto de medidas. Todas as práticas que contribuem para antecipar o florescimento das plantas devem merecer especial atenção, tais como a irrigação, o uso de hormônios e a utilização de porta-enxertos. A irrigação por aspersão deve ser evitada durante o período de florescimento das plantas e plantas severamente atacadas devem ser eliminadas. Por sua vez, o controle químico da doença é difícil e algumas vezes inviável, devendo ser iniciado se o histórico da doença e as condições climáticas forem favoráveis à manifestação severa da doença, com pulverizações com fungicidas para a proteção das flores, realizada durante o período em que elas estão suscetíveis (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Os fungicidas registrados no Brasil para o controle de *Colletotrichum* spp. em citros são os benzimidazóis (carbendazim e tiofanato-metílico), triazóis (difenoconazole e tebuconazole), estrobirulinas + triazóis (trifloxistrobina + tebuconazole; azoxistrobina + difenoconazole), ditiocarbamatos (mancozebe), ditiocarbamato + oxazolidinadiona (mancozebe + famoxadona), captan (dicarboxamida) e cúpricos (BRASIL, 2011).

2.3 Substâncias vegetais exógenas e sua ação sobre patógenos

2.3.1 Substâncias solúveis em água

O ciclo das relações patógeno-hospedeiro compreende a sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução. A infecção é definida como um processo que tem início na pré-penetração, passando pela penetração e termina no estabelecimento das relações parasitárias estáveis entre o patógeno e o hospedeiro (AMORIM; PASCHOLATI, 2011). Para que esses processos ocorram, além de outros fatores, é necessário um grande aporte energético, o qual pode ser oriundo das reservas do patógeno (DIVON; FLUHR, 2007) e, também de nutrientes exógenos na forma de lixiviados presentes na superfície de folhas (TUKEY JR, 1971). Nutrientes lixiviados a partir de folhas saudáveis foram absorvidos pelos esporos de *Cochliobolus sativus* sendo utilizados para fornecer energia necessária para a penetração, uma vez que não haviam nutrientes suficientes nos esporos para o sucesso da penetração (YADAV, 1981).

Segundo Elad (1997), a interação entre o patógeno e o hospedeiro começa na filosfera, onde os conídios germinam na cutícula de plantas em uma camada de

água contendo nutrientes (exsudatos das plantas). Tyagi e Chauhan (1982) também afirmam que no filoplano, um importante aspecto, é a produção de compostos auto-inibidores e auto-estimuladores, como exudatos das folhas ou produzidos pelos microrganismos presentes na superfície da folha.

Tukey Jr (1970) menciona a utilização do termo “leaching”, que é definido como a remoção de substâncias a partir de plantas pela ação de soluções aquosas, como orvalho, chuva e neblina. Este mesmo autor, em sua revisão, relata que podem ser lixiviados nutrientes inorgânicos inclusive todos os minerais essenciais e alguns outros elementos comumente encontradas em plantas, incluindo os macro e microelementos. Além disso, grandes quantidades de substâncias orgânicas têm sido observadas, incluindo açúcares livres, substâncias pécticas e açúcares álcool. Todos os aminoácidos encontrados em plantas e muitos dos ácidos orgânicos têm sido detectados em lixiviados. Menciona também que diferentes autores têm encontrado reguladores de crescimento, como giberelinas, bem como vitaminas, alcalóides e substâncias fenólicas.

A maior parte dos compostos presentes nos lixiviados foliares é originária do interior da planta (GODFREY, 1976). No entanto, podem haver sedimentos trazidos juntos com a chuva, oriundos do solo ou de outras fontes que não a planta. Há também relatos da influência da microflora presente nas folhas sobre patógenos podendo, por exemplo, estimular a formação de apressórios em *C. acutatum* (BLAKEMAN; PAREERY, 1977) ou inibir o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* (EVUEH; OGBEBOR, 2008).

Entre os compostos lixiviados de folhas e outras partes da planta estão presentes substâncias estimuladoras e/ou inibidoras. Inúmeros trabalhos relatam a ação de lixiviados de diferentes partes vegetais contendo nutrientes no estímulo ao desenvolvimento de patógenos. Agrios (2005) menciona que a germinação de esporos é geralmente favorecida pela difusão de nutrientes a partir da superfície da planta; assim, quanto mais nutrientes (açúcares e aminoácidos) a planta libera, mais esporos germinam e mais rápido estes germinam.

Svedelius e Unestam (1978) demonstraram a importância de nutrientes externos no desenvolvimento das lesões por *Dydimella bryoniae* em pepino, através da aplicação de exudatos foliares e nutrientes (caseína hidrolisada e sacarose), os quais proporcionaram incremento no comprimento do tubo germinativo ou hifa. Resultados semelhantes foram demonstrados também por Svedelius (1990), bem

como um maior desenvolvimento do tubo germinativo de *D. bryoniae* próximo a hidatódios, aos vasos principais de folhas de pepino e em tecidos injuriados, possivelmente, relacionado com a presença de nutrientes nestes locais. Os autores não determinaram quais substâncias presentes nos exudatos foliares seriam as responsáveis por estes efeitos.

Yadav (1981) observou que lixiviados de folhas, contendo açúcares e aminoácidos, forneceram uma fonte de nutrientes adequada para o patógeno, visto que a penetração e colonização foram aumentadas na presença destes. As observações dos autores levaram à conclusão de que conídios de *C. sativus* requerem uma fonte exógena de nutrientes para que a penetração seja bem sucedida. Os autores sugerem que os nutrientes presentes nos conídios são suficientes para a germinação e formação de apressórios, no entanto, não o são para a penetração dos tecidos do hospedeiro.

Leandro et al. (2003) verificaram que extratos de flores de morangueiro aumentaram o número de conídios de *C. acutatum* *in vivo* e *in vitro*. A aplicação de extratos de flores resultou em aumento de 10 e 16 vezes nos conídios em folhas e *in vitro*, respectivamente, sendo que o número de conídios aumentou mais quando foram submetidos ao tratamento com extratos de flores do que com extratos de folhas. A produção de apressórios não foi afetada significativamente pelo extrato de flores ou folhas. Os autores concluíram que o inóculo de *C. acutatum* em folhas pode aumentar durante a floração do morangueiro.

Como já mencionado, epidemias de PFC estão associadas a períodos de alta pluviosidade durante a floração (AGOSTINI; GOTTWALD; TIMMER, 1993). Uma das hipóteses é que, a chuva atuaria lixiviando substâncias das pétalas de flores de citros, as quais atuariam estimulando a germinação de apressórios quiescentes presentes na superfície de folhas, galhos e cálices persistentes, levando a produção de conídios secundários, os quais seriam capazes de infectar novas flores (PERES et al., 2005). Agostini e Timmer (1994) encontraram que para a estirpe SGO de *C. gloeosporioides*, hoje *C. acutatum*, o tratamento com extrato floral proporcionou um incremento no número de conídios. Como já mencionado, resultados similares também foram obtidos por Zulfiqar; Brlansky; Timmer (1996).

Substâncias presentes em lixiviados de folhas, flores ou frutos, além de servirem como fonte de nutrientes para o patógeno, podem atuar como ativadoras de enzimas atuantes durante o processo de infecção. Lixiviados de flores de cártamo

(*Carthamus tinctorius*), contendo substâncias pécticas, induziram a produção da enzima poligalacturonase em conídios germinando de *Botrytis cinerea* (BARASH; KLISIEWICZ; KOSUGE, 1964). Além disso, os lixiviados melhoraram a germinação do patógeno.

Por outro lado, Irvine; Dix; Warren (1978) relataram que a superfície das folhas de *Acer platanoides* foi descrita como sendo um ambiente inóspito para o crescimento de fungos do filoplano durante o verão. Foram detectadas várias substâncias inibidoras, as quais foram ativas contra os fungos do filoplano em experimentos de campo e de laboratório. Um componente importante foi o ácido gálico, que pode ter sido responsável por cerca de metade da inibição observada mas, outros inibidores não identificados também estavam presentes. A atividade inibitória da lavagem diminuiu com o avanço nas estações do ano e a perda de atividade pode ser correlacionada com um aumento do crescimento de fungos na superfície das folhas.

Dessa forma, o desenvolvimento dos patógenos e, por conseguinte da doença, podem ser influenciados pelo balanço entre substâncias estimuladoras e inibidoras presentes na filosfera das plantas, as quais podem variar de acordo com fatores inerentes às plantas e ao ambiente acerca destas.

2.3.2 Compostos voláteis

As plantas são importantes fontes de moléculas biologicamente ativas (ALVES, 2001). Segundo o autor, as plantas sintetizam substâncias que realizam suas principais funções vitais através do metabolismo primário, tais como produção de celulose, lignina, proteínas, lipídios, açúcares, entre outras moléculas. No entanto, estas também apresentam o metabolismo secundário no qual, uma das principais funções, é a biossíntese de estruturas complexas como alcalóides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides. Tais moléculas, além de outras funções, funcionam como agentes de defesa na luta contra microrganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros (ALVES, 2001).

Dentre os compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados por plantas, os mais abundantes são os terpenóides, sendo que a maior parte das plantas que produzem essa classe de compostos pertence às famílias das coníferas e das mirtáceas e ao gênero *Citrus*, sendo que na atmosfera próxima de árvores de frutas cítricas, o principal é o limoneno (NUNES; PEREIRA; ANDRADE, 2000).

Os terpenóides podem ser mono, di, tri, tetra e sesquiterpenos (AGOSTINI-COSTA, 2011). Dentro desta classe de substâncias temos o linalol, um monoterpene alcoólico terciário de cadeia aberta (SILVA et al., 2003); o mirceno, um monoterpene acíclico (AGOSTINI-COSTA, 2011); e o limoneno, um terpenóide monocíclico (ROSA, 2010). Além destes, tem-se o nonanal, um aldeído alifático (DROBY et al., 2008). Estes quatro compostos voláteis já foram relatados devido a sua capacidade de estímulo sobre a germinação de conídios e desenvolvimento do tubo germinativo de fitopatógenos (DROBY et al., 2008).

Jabalpurwala; Smoot; Rouseff (2009) analisaram a composição de voláteis de flores de 15 cultivares de citros, de oito espécies diferentes. Um total de 70 compostos voláteis foram detectados a partir das flores cítricas analisadas. Em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck, variedades 'Valência' e 'Navel'), os compostos majoritários, em relação aos voláteis totais, foram linalol (21,84%), α -mirceno e β -mirceno (12,72 e 24,00%, respectivamente), limoneno (4,47%), além de (E)-ocimeno (8,20%) e metil antranilato (5,03%) (JABALPURWALA; SMOOT; ROUSEFF, 2009). Estes compostos também foram identificados por Flamini; Cioni; Morelli (2003) e Attaway; Pieringer; Barabas (1966), em diferentes espécies de citros. Dentre estes, linalol, limoneno e mirceno foram identificados por Vilela (2010) e utilizados no presente estudo, além do nonanal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA) e no Campo Experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, em Piracicaba, SP. A identificação das substâncias presentes nas águas de lavagem foi realizada no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos e no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química, da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, em São Carlos, SP, em colaboração com o Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e Prof.^a Dr.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e a aluna de doutorado Lívia Soman de Medeiros. A identificação dos compostos voláteis oriundos de plantas cítricas foi conduzida no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas, SP, em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Augusto e o aluno de doutorado Leandro Wang Hantao.

3.1 Obtenção dos isolados fúngicos

Para a obtenção do fungo *Colletotrichum acutatum* foram realizados isolamentos a partir de pétalas e botões florais de plantas de citros sintomáticas oriundas do município de Taquarituba, SP. Foram obtidos fragmentos do tecido lesionado, procedendo-se a assepsia em álcool 70% por 30 s e hipoclorito de sódio 1,5% por 60 s. Após, os fragmentos foram lavados em água destilada esterilizada para remoção do excesso de cloro e colocados em papel-filtro para retirada do excesso de umidade. A seguir, os segmentos de tecido foram acondicionados em meio de cultivo ágar-água e mantidos a 25°C, sob luz constante, durante 10 dias. Após este período, discos de micélio foram transferidos para meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), visando a obtenção de culturas puras, as quais foram mantidas a 25°C, sob fotoperíodo de 12 h.

Realizou-se teste de PCR, utilizando-se os primers Calnt2 e Cglnt, de acordo com a metodologia descrita por Freeman et al. (2001), a fim de confirmar se os isolados obtidos das plantas cítricas eram de *C. acutatum*. Os referidos testes foram realizados no Centro de Diagnóstico de Pragas e Doenças de Citros do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS, Araraquara, SP). Obtiveram-se dois isolados, o isolado I denominado de 61A e o isolado II identificado como 142. Os

isolados obtidos permaneceram preservados em óleo mineral, de acordo com a metodologia descrita por Romeiro (2010), adaptada para fungos.

Para confirmar os resultados obtidos com o isolado 61A, utilizado por Vilela (2010) e com o qual vinha-se trabalhando, alguns testes foram repetidos com o isolado 142. Além disso, os conídios do isolado 61A apresentaram problemas na germinação no decorrer dos testes, sendo necessária a utilização de um segundo isolado. Posteriormente, após a inoculação em flores e reisolamento, os conídios do isolado 61A voltaram a germinar, sendo novamente utilizado nos testes.

3.2 Obtenção das águas de lavagem brutas (ALBs)

Primeiramente, mudas de laranjeira 'Valência' com 1,5 anos de idade, cedidas pela Sanicitrus (Araras, SP), foram cultivadas em substrato comercial e mantidas, através de tratos culturais necessários ao seu adequado desenvolvimento, junto ao Campo Experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ - USP. Em abril de 2010, essas plantas foram submetidas a anelamento do caule e ramos (SIQUEIRA; SALOMÃO, 2002) e estresse hídrico (CRUZ et al., 2006), os quais são relatados como favoráveis a indução de floração. Após três meses do tratamento, as plantas iniciaram a floração. Essa prática foi necessária uma vez que no Estado de São Paulo, o período de floração de laranjeira 'Valência' concentra-se na primavera, o que resultaria em atraso na obtenção de flores e botões florais e, consequentemente, na obtenção da água de lavagem para a realização dos testes.

Para obtenção das ALBs, amostras frescas de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de plantas de laranjeira 'Valência' assintomáticas foram coletadas e levadas ao laboratório. Em seguida, as diferentes estruturas vegetais foram colocadas, separadamente, em funil contendo filtro Whatman®, sendo a água de lavagem coletada em um erlenmeyer mantido em isopor com gelo e novamente passada pelas diferentes partes vegetais (Figura 3). Esse procedimento foi repetido por 10 vezes. Utilizou-se a proporção de uma parte de cada estrutura vegetal para cinco partes de água ultra-pura (1:5; v/v). O produto da lavagem foi passado em membrana de celulose esterilizada, tipo Millipore® (0,2 µm), sob condições assépticas, sendo essa preparação considerada como ALB para uso posterior nos bioensaios e nos experimentos de identificação e isolamento (FIORI et al., 2000). Estas amostras foram acondicionadas em tubos para microcentrifuga e armazenadas em congelador a -18°C, para utilização em análises posteriores. Por

sua vez, as frações utilizadas nos experimentos de identificação e isolamento das substâncias foram liofilizadas.

Figura 3 – Esquema ilustrando a obtenção de água de lavagem a partir de folhas novas (A), folhas velhas (B), botões florais (C) e flores (D) de plantas de laranjeira 'Valência'

3.3 Efeitos das águas de lavagem brutas

3.3.1 Efeito *in vitro* das ALBs sobre a germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum acutatum*

Para a obtenção da suspensão de conídios foram utilizadas colônias de *C. acutatum*, isolados 61A e 142, crescidas em meio BDA por oito dias. Para desalojar os conídios, adicionaram-se 5 mL de água destilada esterilizada às placas de meio de cultivo contendo o patógeno, raspando-se em seguida com alça de Drigalski. A suspensão resultante foi filtrada através de duas camadas de gaze e a concentração ajustada para 1×10^5 conídios mL^{-1} , com auxílio de hemacitômetro e diluições seqüenciais em água quando necessário.

A partir das ALBs, alíquotas de 20 μL , oriundas das diferentes partes vegetais, foram retiradas e misturadas com 20 μL de suspensões de conídios, as quais foram colocadas em placas de poliestireno contendo um chumaço de algodão embebido em água destilada. Para o tratamento mistura utilizaram-se conjuntamente as frações de flores, botões, FV e FN, sendo as quatro frações na mesma proporção (v/v). Como controle foi utilizada água destilada esterilizada. As placas foram seladas com filme tipo PVC e incubadas em câmara de crescimento à temperatura

de 25°C, com luminosidade alternada (12 h claro/ 6 h escuro) por 18 h. Após este período, a germinação de conídios e formação de apressórios foram avaliados através de observação em microscópio óptico. Em cada repetição, foram contados 100 conídios escolhidos aleatoriamente, totalizando, dessa forma 500 conídios avaliados por tratamento. Para a interrupção do processo de germinação adicionaram-se 15 µL de lactoglicerol às gotículas, sendo considerados como germinados, os conídios com tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento dos conídios não germinados. Após, realizou-se a quantificação do comprimento do tubo germinativo depois da aplicação das ALBs, utilizando-se o Software AxionVision (CarlZeiss®). Para tanto, realizou-se a medição do comprimento do tubo germinativo de 10 conídios, utilizando-se cinco repetições, totalizando 50 conídios/tratamento.

3.3.2 Efeito *in vitro* das ALBs sobre conídios e apressórios quiescentes de *Colletotrichum acutatum*

Utilizaram-se placas de poliestireno para proporcionar uma superfície hidrofóbica, adequada para a formação de apressórios, conforme relatado por Staples; Laccetti; Yaniv (1976) e metodologia adaptada de Leandro et al. (2003). Para estudo do estímulo às estruturas quiescentes, como apressórios e conídios, as placas de poliestireno foram aspergidas com suspensão de conídios (1×10^5 conídios mL⁻¹). As placas inoculadas foram incubadas por 18 h em câmara com umidade relativa (UR) de 100%, a 25°C e fotoperíodo de 12 h, sendo em seguida, transferidas para uma câmara de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 12 h para a secagem das mesmas. Estas permaneceram em câmara de crescimento por duas e quatro semanas para expor as populações de *C. acutatum* à secagem, antes da aplicação das ALBs, de modo a deixar os conídios e apressórios em condições de quiescência. As condições secas foram representadas por ausência de água livre (condições de incubadora tipo BOD, com UR variando de 40 a 80%), no primeiro ensaio. No segundo ensaio, as placas foram acondicionadas em caixas plásticas contendo glicerol, de modo a atingir a UR de 30%. Após estes períodos, realizou-se a contagem do número de conídios germinados e apressórios formados em cinco quadrantes de cada placa de poliestireno (Figura 4). Após, 25 µL das ALBs das diferentes partes vegetais foram aplicados em cada um destes mesmos cinco quadrantes. As placas contendo um chumaço de algodão embebido com água foram

acondicionadas em caixas plásticas, contendo também algodão umedecido e, incubadas a 25°C por 12 h. Após, paralisou-se a germinação com lactoglicerol e a contagem foi realizada em microscópio. Para o cálculo do percentual de estímulo à germinação de conídios e formação de apressórios pelas ALBs utilizou-se a fórmula abaixo. Para o isolado 142 realizou-se o teste apenas com incubação por duas semanas na ausência de água livre.

$$\% \text{ de Estímulo} = \frac{\text{Número de conídios germinados após a aplicação da ALB} \times 100}{\text{Número de conídios germinados antes da aplicação da ALB}} - 100$$

Figura 4 – Placa de poliestireno com as subdivisões (azul) para contagem de conídios e apressórios quiescentes antes e após a aplicação das águas de lavagem. Tamanho de cada subdivisão (azul): 2 x 2 mm

Após a quantificação do estímulo às estruturas quiescentes (conídios germinados e apressórios), fez-se a quantificação do comprimento do tubo germinativo após a aplicação das ALBs, utilizando-se o Software AxionVision (CarlZeiss®), através da medição de 50 conídios/tratamento.

3.3.3 Efeito *in vitro* das ALBs sobre o micélio quiescente de *Colletotrichum acutatum*

Em placas de poliestireno adicionou-se meio de cultivo BDA e, após solidificado, adicionou-se uma membrana de celofane semipermeável sobre o meio. Sobre esta, colocou-se um disco de meio de 6 mm, contendo micélio e conídios do patógeno. Após oito dias, removeu-se a membrana de celofane e cortaram-se discos de micélio, os quais foram transferidos para placas de poliestireno esterilizadas.

Estas, foram acondicionadas por duas e quatro semanas, em estufa à 24°C, com o intuito de induzir as estruturas do fungo à quiescência.

Após esse período, sobre placas contendo meio BDA, adicionaram-se 400 µL das ALBs separadamente e em mistura, previamente filtradas através de membrana de celulose tipo Millipore® (0,22 µm), e espalhadas com auxílio de alça de Drigalski. Aguardaram-se 24 h para que o meio BDA absorvesse as preparações. Após, um disco de micélio quiescente de 6 mm de diâmetro de *C. acutatum*, isolados 61A e 142, foi colocado, separadamente, no centro de cada placa, sendo estas mantidas a 25°C e fotoperíodo de 12 h. A seguir, a avaliação do crescimento micelial foi realizada diariamente, com auxílio de paquímetro digital, até que uma das colônias atingisse o bordo da placa. Utilizou-se a média de duas medidas diametralmente opostas das colônias, previamente marcadas no fundo da placa, sendo os resultados expressos em mm.

3.3.4 Efeito das ALBs sobre estruturas quiescentes de *Colletotrichum acutatum* em folhas de laranjeira ‘Valência’

Folhas de plantas cítricas da cultivar ‘Valência’, com aproximadamente dois anos de idade, foram inoculadas, em local previamente marcado, com suspensão de conídios de *C. acutatum*, isolado 61A, na concentração de 1×10^5 conídios mL⁻¹. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 36 a 48 h, sendo então transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram durante 14 dias, com o intuito de deixar as estruturas do patógeno, anteriormente germinadas, sob condição de quiescência. Após esse período, as folhas inoculadas foram destacadas, levadas ao laboratório, realizada assepsia pela lavagem em álcool 70%, hipoclorito de sódio 0,5% e água destilada esterilizada, sendo após acondicionadas em placas de Petri.

No mesmo local onde foi realizada a inoculação, aplicou-se uma alíquota de 100 µL das ALBs de flores, botões, FV e FN, separadamente. Como controles, foram utilizadas folhas tratadas apenas com água destilada, folhas apenas inoculadas e folhas sadias. As placas foram incubadas em câmara úmida por 24 h, a 25°C e fotoperíodo de 12 h, sendo então acondicionadas em câmara com circulação de ar para a secagem das folhas. Após, utilizaram-se diferentes métodos de preparo das amostras foliares para visualização das estruturas fúngicas em microscópio eletrônico de varredura, conforme descrito abaixo. Estes quatro métodos foram

utilizados buscando o aprendizado das técnicas, bem como, para testar o melhor método para visualização das estruturas do patógeno. As imagens, geradas nos diferentes métodos, que permitiram uma melhor visualização e quantificação, foram selecionadas, sendo registradas cinco microfotografias/repetição para cada método. Após, realizou-se a contagem do número de conídios germinados.

3.3.4.1 Método 1

Segmentos de folhas de aproximadamente 25 mm² (5 mm x 5 mm) foram cortados, sendo transferidos para microtubos de 1,5 mL, contendo solução fixadora de Karnovsky modificada, por um período mínimo de 24 h. Após, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,05M (pH 7,2), por três vezes, durante 10 min. Subseqüentemente, as amostras foram imersas em solução de tetróxido de ósmio 1% em água destilada, por 60 min à temperatura ambiente. Após, as mesmas foram lavadas com água destilada por três vezes e desidratadas em série crescente de acetona 30%, 50%, 70% e 90% por 15 min. Ao final, as amostras foram colocadas em acetona 100%, por três vezes, para assegurar a completa desidratação dos tecidos.

Após esta etapa, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Balzers CPD 030), para completar a secagem pelo método do ponto crítico do CO₂. Em seguida, as amostras foram cuidadosamente montadas em *stubs* (suportes de alumínio) cobertos com papel alumínio, sendo fixadas com o auxílio de fita de carbono dupla face. Ao final, as amostras foram metalizadas com vapor de ouro (Baltec SCD 050), por 3 min a 50 mA, permanecendo em caixas com sílica até o momento da visualização. As amostras foram observadas e registradas no microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP (KITAJIMA; TANAKA, 2011).

3.3.4.2 Método 2

Segmentos de folhas de aproximadamente 25 mm² foram cortados, colocados sobre lamínula e fixados com fita adesiva dupla face. As amostras de folhas, depois de feita a aplicação da água de lavagem e secas, foram colocadas em placa de Petri contendo papel filtro umedecido e um recipiente contendo duas gotas de tetróxido de ósmio 1%, sendo após cobertas com papel alumínio, permanecendo em capela de exaustão por 12 h. Após esse período, sob ação do vapor de ósmio, foram transferidas para caixas tipo Gerbox[®], contendo sílica gel. Antes da visualização, as

amostras foram montadas em *stubs* e metalizadas com vapor de ouro, permanecendo em caixas com sílica até o momento da visualização. As amostras foram observadas e registradas no microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP (KITAJIMA; TANAKA, 2011).

3.3.4.3 Método 3

Nesse caso, o método foi similar ao descrito no item 3.3.4.1, no entanto, sem a utilização de tetróxido de ósmio antes da desidratação em série crescente de acetona.

3.3.4.4 Método 4

Após a secagem das ALBs, no mesmo local do tratamento, aplicaram-se 100 µL de solução fixadora Karnovsky, sendo as amostras de folhas levadas à geladeira. Após 2 h, o excesso de solução fixadora foi cuidadosamente removido com auxílio de papel filtro. A seguir, a metodologia utilizada foi similar a descrita no item 3.3.4.2.

3.3.5 Efeito das ALBs sobre a severidade da PFC em laranjeira ‘Valência’

Flores de laranjeira ‘Valência’, com aproximadamente dois anos de idade, foram inoculadas com suspensão de conídios de *C. acutatum*, isolado 61A, na concentração de 1×10^5 conídios mL⁻¹. Um tratamento consistiu de flores e botões florais inoculados apenas com suspensão de conídios, enquanto no outro as flores e os botões florais foram inoculados com suspensão de conídios preparada com ALB da mistura das frações de flores, botões, folha velha e folha nova, sendo as quatro frações na mesma proporção (v/v).

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h, sendo então transferidas para casa de vegetação. As avaliações foram realizadas após dois (1ª avaliação), quatro (2ª avaliação), seis (3ª avaliação) e oito dias (4ª avaliação). As avaliações de severidade da PFC foram realizadas através do uso de escala de notas que variaram de: 0 - ausência de sintomas; 1 - sintoma leve (apenas uma pétala com sintomas); 2 – sintoma moderado (de duas a três pétalas com sintomas); 3 - sintoma severo (mais de três pétalas com sintomas) (CINTRA, 2009).

3.4 Efeitos dos compostos voláteis (CVs)

3.4.1 Efeito *in vitro* dos compostos voláteis brutos (CVBs) oriundos de flores, botões, folhas velhas e folhas novas de laranjeira ‘Valência’ na germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum acutatum*

Para avaliar a ação dos CVBs, oriundos de laranjeira ‘Valência’, utilizaram-se placas de poliestireno divididas ao meio, sendo em um dos lados adicionada a suspensão de 1×10^5 conídios mL^{-1} de *C. acutatum*, isolados 61A ou 142 e, no outro as flores, botões, folhas velhas ou folhas novas (aproximadamente um grama das diferentes partes vegetais), separadamente. Para o tratamento mistura, adicionou-se um grama das diferentes partes vegetais conjuntamente. As condições de incubação e avaliação foram idênticas as descritas no item 3.3.1.

3.4.2 Efeito *in vitro* dos CVs identificados a partir de flores e botões de laranjeira ‘Valência’ na germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum acutatum*

Vilela (2010) identificou, a partir de flores e botões de laranjeira ‘Valência’, dentre outros compostos, os voláteis linalol, mirceno, limoneno e nonanal, os quais já foram relatados devido a sua capacidade de estímulo a fitopatógenos (DROBY et al., 2008). Dessa forma, a fim de avaliar o efeito desses sobre *C. acutatum*, padrões disponíveis comercialmente (SIGMA-ALDRICH®) dos quatro compostos foram utilizados nos bioensaios.

Utilizaram-se placas de Elisa, sendo em cada pocinho adicionada a suspensão de conídios de *C. acutatum* (1×10^5 conídios mL^{-1}) e as diferentes doses dos CVs separadamente. Para cada CVs utilizou-se uma placa de Elisa. As concentrações utilizadas foram 0,005, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar. Também utilizou-se a mistura dos CVs linalol, limoneno, mirceno e nonanal na proporção de 7:1:1:1 (v/v/v/v) respectivamente, de modo similar a obtida por Vilela (2010). Para o isolado 142 testou-se, além das doses acima, a dose de 0,0005 $\mu\text{L mL}^{-1}$. O tratamento controle consistiu de placas sem a adição dos CVs. Estas foram imediatamente vedadas com filme plástico tipo PVC, de modo a evitar o vazamento dos voláteis, sendo a seguir, incubadas em câmara tipo BOD, à 25°C e fotoperíodo de 12 h.

Após 18 h, paralizou-se a germinação com lactoglicerol. A porcentagem de conídios germinados e apressórios formados foi obtida através de contagem, com auxílio de microscópio de luz. Para a avaliação do comprimento do tubo germinativo, utilizou-se o software AxionVision (CarlZeiss®).

3.5 Identificação de substâncias oriundas de plantas cítricas

3.5.1 Substâncias solúveis em água

As amostras de ALBs foram obtidas conforme descrito no item 3.2, em março de 2011, sendo após liofilizadas. Devido a baixa massa obtida de alguns dos extratos, (inferior a 2 mg), os fracionamentos só foram possíveis com a ALB de flores. Com o intuito de separar e purificar as substâncias presentes nas ALBs, buscando-se verificar diferenças qualitativas com relação aos grupos químicos presentes nestas amostras, optou-se pelo fracionamento sequencial da amostra e das frações obtidas. Para tanto foram utilizadas Extração em Fase Sólida (SPE- *Solid Phase Extraction*), Cromatografia Líquida Clássica de Baixa Pressão e Cromatografia em Camada Delgada (CCD), sendo esta última para monitoramento das frações.

Para o fracionamento em SPE utilizou-se separação de fase reversa, com fase estacionária composta de sílica ligada a grupos octadecilsilano [Strata® C18-E (55µm, 70^Å), 1,5 cm x 1,0cm]. O termo fase reversa é empregado quando a fase estacionária é menos polar que a fase móvel, enquanto que o termo fase normal, de maneira análoga, quando a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel (LANÇAS, 2004).

A extração em fase sólida é uma das técnicas mais utilizadas para extração e pré-concentração de substâncias de amostras aquosas ou gasosas (BIAJOLI; AUGUSTO, 2005). Segundo Lanças (2004), a SPE é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia clássica líquida de baixa pressão, sendo que do ponto de vista prático, emprega-se uma pequena coluna aberta, comumente denominada de cartucho de extração, a qual contém a fase sólida (denominada de fase estacionária em cromatografia).

Todo o processo realizado em SPE consistiu em basicamente quatro etapas: ativação, condicionamento, adição da amostra e eluição. Primeiramente, a fase estacionária foi ativada com metanol (100%) (MeOH). Em seguida, condicionou-se o cartucho com a mistura MeOH:H₂O (9:1; v/v) e aplicou-se a amostra solubilizada em

H₂O (100%) ao cartucho de SPE. Na eluição das frações, foram utilizados, como fase móvel, os seguintes eluentes: MeOH:H₂O (9:1; v/v), MeOH:H₂O (1:1; v/v) e MeOH puro, sendo as diferentes frações coletadas, separadamente, em frascos de vidro e as amostras secas em capela.

Cada uma das frações anteriormente obtidas foram ressuspensas em H₂O (100%) e refractionadas em cartuchos de SPE. Como fase móvel, foram utilizados os eluentes: H₂O (100%), MeOH:H₂O (1:9; v/v), MeOH:H₂O (3:7; v/v), MeOH:H₂O (1:1; v/v), MeOH:H₂O (7:3; v/v) e MeOH puro. As frações foram recolhidas em frascos de vidro e o solvente evaporado em capela.

Posteriormente, com vistas à melhor purificação e fracionamento, os extratos obtidos em SPE foram separados com auxílio de Cromatografia Líquida Clássica de Baixa Pressão por mecanismo de exclusão molecular por tamanho, empregando-se o polímero Sephadex[®] LH-20 (polidextrano) como fase estacionária e como fase móvel diferentes proporções de MeOH:H₂O (Tabela 3). Neste processo de separação, a fase estacionária é acondicionada em tubos cilíndricos, comumente de vidro e, com diâmetros variados, os quais possuem uma torneira na sua base (DEGANI; QUEZIA; VIEIRA, 1998). Segundo os autores, a coluna é empacotada com a fase estacionária adequada e é conveniente que se passe certa quantidade da fase móvel a ser utilizada através da coluna antes da amostra ser introduzida. Isso é feito para condicionar a coluna, preparando a fase estacionária para a passagem e separação da amostra.

Como mencionado, utilizou-se coluna de vidro como suporte e como fase estacionária o gel de polidextrano (Sephadex[®]). Segundo Coelho e Amaral (2011) esta é uma técnica cromatográfica de gel-filtração, sendo o gel definido como uma matriz tridimensional, aberta, formada por ligações cruzadas, o qual contem poros de tamanhos variados que permitem a entrada de somente algumas moléculas. Nessa técnica, moléculas maiores movem-se mais rapidamente, enquanto que as moléculas menores, por terem um caminho maior a percorrer, são eluídas mais lentamente.

Todo o processo de separação empregando-se exclusão molecular por tamanho das frações trabalhadas, encontra-se descrito na Figura 5 e Tabelas 1, 2 e 3. Inicialmente, as águas de lavagem brutas foram submetidas a fracionamento utilizando SPE (a), sendo obtidas três frações diferentes (F1, F2 e F3). Em seguida estas foram submetidas a novo fracionamento em SPE (b) utilizando diferentes

proporções de eluente (Tabela 2). As frações oriundas deste fracionamento foram submetidas a Cromatografia Líquida Clássica de Baixa Pressão (c) utilizando o sistema de eluição descrito na Tabela 3.

Figura 5 – Etapas de fracionamento e concentração da amostra de ALB de flores, com as respectivas frações obtidas. (a) Cartucho SPE; (b) Cartucho SPE; (c) Sephadex (coluna: h = 16 cm e ϕ = 1,5 cm). Vide sistema de eluição nas Tabelas 1, 2 e 3. F: fração obtida após cada processo de separação.

Tabela 1 – Sistema de eluição para Cartucho de SPE (a)

Sistema de eluentes	Proporção (v/v)	Volume (mL)
H ₂ O:MeOH	1:9	6
H ₂ O:MeOH	1:1	6
H ₂ O:MeOH	0:1	6

Tabela 2 – Sistema de eluição para Cartucho de SPE (b)

Sistema de eluentes	Proporção (v/v)	Volume (mL)
H ₂ O:MeOH	1:0	6
H ₂ O:MeOH	9:1	6
H ₂ O:MeOH	7:3	6
H ₂ O:MeOH	1:1	6
H ₂ O:MeOH	3:7	6
H ₂ O:MeOH	0:1	6

Tabela 3 – Sistema de eluição para Cromatografia Líquida Clássica de Baixa Pressão (c)

Sistema de eluentes	Proporção (v/v)	Volume (mL)
H ₂ O:MeOH	1:1	80
H ₂ O:MeOH	4:6	80
H ₂ O:MeOH	3:7	80
H ₂ O:MeOH	0:1	80

Após secas, as frações recolhidas foram ressuspensas e analisadas com auxílio de Cromatografia de Camada Delgada (CCD ou TLC) buscando monitorar a

purificação realizada anteriormente. A CCD é uma técnica de adsorção líquido-sólido (DEGANI; QUEZIA; VIEIRA, 1998). Segundo os mesmos, a separação ocorre devido à diferença de afinidade das substâncias de uma amostra pela fase estacionária, sendo a sílica gel a fase estacionária mais utilizada.

As amostras foram aplicadas em cromatofolhas de sílica e de C₁₈, com auxílio de um capilar, a aproximadamente 0,5 cm da base inferior da placa, ficando assim a amostra adsorvida à fase estacionária. Após a aplicação da amostra e secagem desta, a placa foi introduzida em uma cuba contendo a fase móvel (eluente) representada por acetato de etila:MeOH em proporções variadas, para fase estacionária modo normal e H₂O:MeOH em variadas proporções, para fase estacionária modo reversa. A placa permaneceu na cuba para que o solvente ascendesse por capilaridade até aproximadamente 1 cm da porção superior da placa. Ao subir, a fase móvel arrasta mais as substâncias menos adsorvidas na fase estacionária, separando-as das mais adsorvidas (DEGANI; QUEZIA; VIEIRA, 1998). Após, a placa foi removida da cuba, seca e os resultados visualizados sob luz ultravioleta à 254 e 365 nm e em solução com vanilina sulfúrica, seguida de secagem com secador industrial.

As frações cujas CCDs apresentavam apenas um halo revelado, ou por UV ou vanilina ou ambos, foram submetidas a análise via Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e 2D ou Espectrometria de Massas.

As frações foram analisadas utilizando espectrometria de RMN em uma dimensão (1D). Os espectros de ¹H foram adquiridos em equipamento Bruker 400MHz. As amostras foram previamente secas em capela, solubilizadas em solvente deuterado e inseridas em tubos para análise de RMN de 5 mm de diâmetro. Os solventes deuterados utilizados nas análises foram metanol (CD₃OD) e água (D₂O).

As análises via Espectrometria de Massas de baixa resolução foram realizadas em equipamento triplo-quadrupolo QuattroLC-MICROMASS. Os parâmetros utilizados nestas análises encontram-se listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições do espectrômetro de massas (ESI (+))

Temperatura da fonte (°C)	90
Temperatura do probe (°C)	300
Capilar (kV)	3,9
Cone (V)	20
Extrator (V)	4
Lentes RF (V)	0,70

Para a análise das frações via Cromatografia Líquida de Alta Performance e Espectrometria de Massa (HPLC- MS) e Cromatografia Líquida de Alta Performance e Espectrometria de Massa em tandem (HPLC-MS/MS) foram necessárias otimizações de métodos cromatográficos visando a obtenção de melhores resultados. O método de melhor resultado obtido foi o com fluxo de 0,3 mL min⁻¹, utilizando como fase móvel água e acetonitrila (Tabela 5) e fase estacionária a coluna HILIC XBridge Amide Waters® 250 X 4,60 mm e λ : 190 nm à 600 nm.

Tabela 5 - Condições de eluição do método cromatográfico

Tempo (min)	Acetonitrila (%)
0,01	90
5	80
10	80
30	70
31	10

As substâncias identificadas foram testadas de modo a verificar seu efeito sobre *C. acutatum*, em teste de germinação, conforme metodologia descrita no item 3.3.1.

3.5.2 Identificação de variação na composição das ALBs

Para estudar uma possível diferença na composição das diferentes ALBs, utilizou-se a técnica da CCD. Utilizaram-se 30 mL das ALBs liofilizadas, as quais foram maceradas, separadamente, em 0,5 mL de extrator (água ou metanol). Empregaram-se cromatofolhas de sílica de 5 x 6 cm, sendo na base marcados dois pontos, distantes 1 cm da base inferior da placa. Nesses pontos, foram aplicados 30

μL das ALBs de flores, botões, FV e FN, separadamente. Aplicaram-se frações de 5 em 5 μL, aguardando a secagem, até completar o volume final de 30 μL.

Como fase móvel (eluente), utilizaram-se três solventes, separadamente. O primeiro, um solvente polar ácido (acetato de etila: ácido fórmico: água; 88:6:6; v/v/v); o segundo, um solvente polar básico (tolueno: acetato de etila: dietilamina; 70:20:10; v/v/v); e o terceiro, um solvente apolar (tolueno: acetato de etila; 93:7; v/v). As cromatoplasmas foram cuidadosamente colocadas em bequeres contendo os solventes e, esperado o tempo para corrida. Após, as mesmas foram secas e observadas sob luz UV à 254 e 365 nm.

Finalmente, a fim de se avaliar a variação na composição das ALBs em diferentes coletas, amostras coletadas em julho de 2010 e em março de 2011 foram colocadas em espectrofotômetro, onde realizou-se varredura na faixa espectral de 240 a 700 nm.

3.5.3 Compostos voláteis

Esta etapa foi realizada com vistas à identificação de outros compostos presentes em plantas cítricas e em função da técnica utilizada no presente estudo ser mais sensível do que a utilizada por Vilela (2010).

Flores, botões florais, FV e FN de laranjeira 'Valência' foram coletadas em maio de 2011. As plantas apresentavam aproximadamente dois anos de idade, sendo cultivadas em vasos com substrato comercial no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ - USP. Para avaliação dos compostos voláteis presentes nas diferentes partes vegetais, as amostras foram acondicionadas, separadamente, em frascos de 20 mL, contendo um septo de silicone. As amostras permaneceram por aproximadamente 30 min nos frascos fechados para que ocorresse o equilíbrio dos analitos entre a matriz e a fração gasosa do frasco (*headspace*). A seguir, para extração e pré-concentração dos compostos voláteis, utilizou-se a técnica de Microextração em Fase Sólida (SPME). O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida de 100 μm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade com revestimento. Adicionalmente, este revestimento pode ser um filme fino de um polímero como poli(dimetilsiloxano) (PDMS), poli(acrilato) ou Carbowax; ou de um sólido adsorvente como por exemplo, carvão ativo microparticulado (CAR) ou poli(divinilbenzeno) (DVB) (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

A extração foi realizada perfurando-se o septo do frasco e expondo o revestimento da fibra do amostrador (espécie de seringa) ao *headspace*. Utilizou-se fibra revestida com PDMS/DVB/CAR, com espessura de 75 μm . Esta permaneceu em contato com o *headspace* por 30 min de modo a atingir o equilíbrio do analito entre fibra-*headspace*-amostra. Realizada a extração através do *headspace*, a fibra foi retirada da amostra e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso, onde os analitos foram termicamente desorvidos, sob fluxo do gás de arraste (gás hidrogênio) e carregados para a coluna cromatográfica (VALENTE; AUGUSTO, 2000). Utilizou-se protótipo de Cromatógrafo a Gás Bidimensional Abrangente com detecção Espectrométrica de Massas (-qMS). O equipamento GC $\times$ GC-qMS foi projetado e desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Fabio Augusto (Unicamp), sendo utilizada como plataforma o equipamento comercial GC-qMS, modelo QP2010Plus (Shimadzu, Tokyo, JPN). A fibra permaneceu no injetor por 5 min à 250 °C para se evitar o efeito memória – contaminação entre corridas. A programação de temperatura utilizada foi de 60 °C até 225 °C a uma taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹. A fonte de ionização e linha de transferência foram mantidas a 250 °C e 270 °C, respectivamente. A faixa de varredura utilizada foi de 50-294 Th, a uma frequência de 33 Hz. O período de modulação utilizado foi de 6 s. O conjunto de colunas utilizado para a separação bidimensional dos compostos consistiu de uma coluna convencional de 95% poli(dimetilsiloxano) conectada em série a uma segunda coluna curta e eficiente de poli(etilenoglicol). Na Figura 6, pode-se visualizar um esquema ilustrando o processo de extração e análise cromatográfica. Finalmente, os compostos presentes nas diferentes partes vegetais de laranjeira ‘Valência’ foram identificados com auxílio de biblioteca NIST 08 (NIST, Washington, EUA), que contém espectros de massas e índices de retenção.

Figura 6 - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e de dessorção do material extraído para análise por Cromatografia Gasosa. Fonte: Valente e Augusto (2000)

3.6 Análise dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em todos os experimentos. Utilizaram-se cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando constatado efeito significativo, realizou-se comparação das médias através do teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para avaliação do crescimento do micélio quiescente, os tratamentos foram organizados em esquema fatorial tratamento x tempos, com regressão polinomial para o fator tempo. Para os CVs puros os tratamentos foram organizados em esquema fatorial voláteis x doses. Para as análises estatísticas utilizou-se o Programa SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Águas de lavagem brutas (ALBs)

4.1.1 Efeito *in vitro* das ALBs sobre a germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum acutatum*

Estudando a atividade das ALBs *in vitro*, sobre a germinação de conídios, formação de apressórios e comprimento do tubo germinativo de *C. acutatum*, isolado 61A, verificou-se que todas as frações estimularam a germinação dos conídios do fungo, sendo que a ALB de flores apresentou o maior estímulo, assim como para o comprimento do tubo germinativo (Figura 7). Para formação de apressórios o estímulo foi menor. Ao comparar o efeito das ALBs sobre as variáveis analisadas para os isolados 61A e 142, a tendência geral mostrou efeito semelhante (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Germinação de conídios, formação de apressórios e comprimento do tubo germinativo de *Colletotrichum acutatum*, isolado 61A, quando submetido aos tratamentos com água de lavagem de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de laranjeira 'Valência' e mistura das frações de flores, botões florais, FV e FN. Como controle utilizou-se apenas água. Avaliações efetuadas 18 h após o tratamento com as ALBs. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Figura 8 - Germinação de conídios, formação de apressórios e comprimento do tubo germinativo de *Colletotrichum acutatum*, isolado 142, quando submetido aos tratamentos com água de lavagem de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de laranja 'Valência' e mistura das frações de flores, botões florais, FV e FN. Como controle utilizou-se apenas água. Avaliações efetuadas 18 h após o tratamento com as ALBs. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Acredita-se que a água de lavagem pode atuar de quatro formas isoladamente ou em conjunto, resultando no estímulo às estruturas quiescentes de

C. acutatum e aumento da severidade da podridão floral dos citros. Uma, seria a presença de fatores nutricionais para o patógeno, como açúcares, aminoácidos, vitaminas, dentre outros. A segunda forma estaria associada a alguma substância específica que atuaria induzindo a germinação ou estimulando a quebra de dormência do patógeno. A terceira refere-se a remoção da mucilagem pela água, reduzindo a presença de compostos auto-inibidores, estimulando assim o fungo a se desenvolver. Finalmente, outra razão estaria relacionada a maior suscetibilidade da planta pela perda de nutrientes através da ação da chuva ou irrigação lavando os diferentes órgãos da mesma.

Parker e Blakeman (1984), utilizando lixiviados obtidos de gotas de água depositadas em folhas de fava (*Vicia fava*), verificaram estímulo no crescimento dos tubos germinativos dos uredósporos de *Uromyces viciae-fabae* de forma semelhante ao causado por baixas concentrações de glicose e aminoácidos. Altas concentrações de glicose tenderam a reduzir/inibir a germinação e o crescimento dos tubos germinativos. Em dados não mostrados, os autores afirmaram que, utilizando outras soluções de nutrientes, obtiveram padrão similar de estímulo à germinação e crescimento dos tubos germinativos em baixas concentrações e inibição desses processos em altas concentrações. Fatores de crescimento e hormônios tiveram pequeno efeito na germinação dos uredósporos e no crescimento dos tubos germinativos. Com relação ao possível segundo efeito das ALBs, a cafeína pode ser uma das moléculas atuantes na quebra de dormência de agentes patogênicos (LEE; D'SOUZA; KRONSTAD, 2003), tópico que será abordado em detalhe no item 4.3.1.

Com relação ao terceiro efeito das ALBs, Parker e Blakeman (1984) verificaram aumento na germinação, quando uredósporos de *U. viciae-fabae* oriundos tanto de pústulas jovens, quanto de pústulas velhas, foram lavados e quando esporos velhos foram lentamente lixiviados. Isso pode ter ocorrido devido a remoção de auto-inibidores, como demonstrado por Marte (1971). Portanto, as ALBs poderiam atuar de forma semelhante.

Tukey Jr (1970) menciona que a composição de nutrientes do hospedeiro também afeta a suscetibilidade a patógenos. Com nutrientes minerais sendo lixiviados da planta, o equilíbrio nutricional desta pode ser afetado, tornando-a mais predisposta a doenças.

4.1.2 Efeito *in vitro* das ALBs sobre conídios e apressórios quiescentes de *Colletotrichum acutatum*

Na Figura 9 são apresentados os dados de estímulo a conídios e apressórios quiescentes para o isolado 61A, após duas semanas. Para apressórios quiescentes, o maior estímulo foi verificado nos tratamentos com ALBs de botões e da mistura sem diferir, no entanto, dos demais tratamentos. Para conídios germinados o maior estímulo foi observado na mistura. Os maiores valores de tubo germinativo foram nos tratamentos com a mistura, FN e botões. Após quatro semanas de exposição a condições secas foi verificado estímulo, mas sem diferença estatística entre os tratamentos (Figura 10).

Figura 9 - Estímulo à germinação de conídios e apressórios quiescentes e comprimento do tubo germinativo de *Colletotrichum acutatum*, isolado 61A, quando submetidos aos tratamentos com água de lavagem de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de laranja 'Valência' e mistura das frações de flores, botões florais, FV e FN, após duas semanas de exposição a condições secas (ausência de água livre; UR de 40 a 80%). Como controle utilizou-se apenas água. Avaliações efetuadas 12 h após o tratamento com as ALBs. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Figura 10 - Estímulo à germinação de conídios e apressórios quiescentes de *Colletotrichum acutatum*, isolado 61A, quando submetidos aos tratamentos com água de lavagem de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de laranjeira 'Valência' e mistura das frações de flores, botões florais, FV e FN, após quatro semanas de exposição a condições secas (ausência de água livre; UR de 40 a 80%). Como controle utilizou-se apenas água. Avaliações efetuadas 12 h após o tratamento com as ALBs. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os relatados por Leandro et al. (2003) que verificaram, após duas semanas de exposição a condições secas, estímulo na germinação de *C. acutatum*, em folhas e lâminas, com aplicação de extratos de flores e folhas de morango, sendo que o mesmo não foi verificado após quatro semanas. Segundo os mesmos autores, a habilidade de extratos florais de estimular conídios de *C. acutatum* diminui com a duração das condições secas, possivelmente, devido à redução na capacidade de sobrevivência do fungo. No entanto, apressórios permanecem aderidos nas folhas e lâminas tanto antes quanto após os tratamentos, apesar de sua produção não ter sido afetada significativamente pelos extratos. Portanto, estes poderiam funcionar como estruturas de sobrevivência do patógeno (MUIRHEAD, 1998).

Leandro et al. (2003) afirmam que esse estímulo sugere que conídios não germinados, expostos ao extrato de flores, têm uma grande capacidade de produzir inóculo secundário em folhas de morangueiro, quando comparado a conídios germinados somente em água. Segundo Timmer et al. (1994), em estudo do

patossistema citros-*C. acutatum*, esses novos conídios produzidos podem servir de inóculo para a infecção de flores na primavera. O aumento no número de conídios causado pelo extrato de folhas não foi tão pronunciado como o causado pelo extrato de flores (LEANDRO et al., 2003), discordando em parte dos resultados obtidos no presente trabalho.

O efeito inibitório de substâncias presentes na folha pode ser contrabalanceado por substâncias estimulatórias, resultando em estímulo à produção de conídios secundários em alguns casos (LEANDRO et al., 2003). Dessa forma, o efeito das ALs é resultante do conjunto de substâncias, tanto estimulatórias quanto inibitórias.

Aliado a este fato, tem-se ainda a possível variação na composição das ALBs durante as diferentes coletas, uma das hipóteses levantadas no decorrer dos experimentos devido a variação observada no estímulo ocasionado pelas diferentes frações destas. Como já mencionado, as propriedades da superfície de folhas e outros órgãos vegetais não são estáveis, variando constantemente devido a fatores inerentes as condições de cultivo (solo, nutrição da planta), fatores inerentes a planta (estádio de desenvolvimento, idade), e sua interação com o ambiente (elementos oriundos da atmosfera e depositados sobre as plantas), dentre outros fatores (ALVES, 2001; ATTAWAY; PIERINGER; BARARAS, 1967; BLAKEMAN, 1973). Tyagi e Chauhan (1982) verificaram que o número de aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos e fenóis aumenta a medida que a planta cresce, do estágio de plântula ao florescimento.

Tyagi e Chauhan (1982) observaram que a germinação de esporos dos fungos isolados de pimentão como, *Nigrospora oryzae*, *Aspergillus sydowi*, *Penicillium rubrum*, *P. rugulosum*, *Cladosporium oxysporum*, *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Trichotecium roseum* e *Fusarium oxysporum* foi maior nos exsudatos de folhas da cultivar suscetível (Malwa) do que nos exsudatos foliares da moderadamente resistente (Patna) e resistente (Simla), indicando haver diferença na composição das substâncias presentes, de acordo com a variedade.

No presente trabalho, após duas e quatro semanas de exposição a UR de 30% e posterior aplicação das ALBs, não foi verificado estímulo significativo sobre os conídios e apressórios quiescentes para o isolado 61A de *C. acutatum* (dados não mostrados). O estímulo à germinação de conídios e a formação de apressórios nos tratamentos com as ALBs foi semelhante ao tratamento apenas com água (controle).

Para o isolado 142 (Figura 11), o estímulo proporcionado pelas águas de lavagem na germinação de conídios e formação de apressórios quiescentes foi maior quando comparado ao isolado 61A (Figura 9). Os maiores valores foram observados nos tratamentos com FN e botões, quando comparados ao controle. Para esse isolado realizou-se apenas a quantificação do estímulo a conídios e apressórios quiescentes após duas semanas e não utilizou-se o tratamento mistura, uma vez que, este experimento foi realizado apenas para se confirmar os resultados obtidos para o isolado 61A.

Figura 11 - Estímulo à germinação de conídios e apressórios quiescentes de *Colletotrichum acutatum*, isolado 142, quando submetido aos tratamentos com água de lavagem de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de laranjeira 'Valência', após duas semanas de exposição a condições secas (ausência de água livre; UR de 40 a 80%). Como controle utilizou-se apenas água. Avaliações efetuadas 12 h após o tratamento com as ALBs. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tukey Jr (1970) menciona que há muitos fatores que influenciam a quantidade e a qualidade das substâncias liberadas por folhas. Por exemplo, tecidos jovens, em crescimento ativo, apresentam reduzidas perdas de nutrientes minerais e carboidratos, enquanto que tecidos mais maduros, próximos da senescência, são muito suscetíveis à lixiviação. Essa maior perda pode resultar em concentrações muito altas de determinadas substâncias, o que segundo Parker e Blakeman (1984) resultaria em inibição dos processos de germinação. Esse fato poderia explicar o

maior estímulo proporcionado pela ALB de FN em praticamente todos os testes realizados no presente trabalho, o que não foi verificado para a ALB de FV.

4.1.3 Efeito *in vitro* das ALBs sobre micélio quiescente de *Colletotrichum acutatum*

Não houve interação entre os fatores tratamentos e tempos para os isolados 61A e 142, após duas semanas de exposição a condições secas. O crescimento do fungo ao longo do tempo apresentou comportamento linear para ambos os isolados (Figura 12), não havendo diferença entre os tratamentos. Resultados semelhantes foram observados após quatro semanas de exposição a condições secas (dados não mostrados). Observaram-se ainda diferenças morfológicas entre os isolados (dados não mostrados) e na velocidade de crescimento dos mesmos (Figura 12). Vilela (2010), de modo similar, verificou que as ALBs não interferiram no crescimento micelial do patógeno. No entanto, o estudo foi conduzido com micélio não quiescente (recém coletado) e não com micélio quiescente (armazenado), como neste trabalho.

Neste teste utilizou-se meio de cultivo BDA, o qual é rico em nutrientes para o desenvolvimento do fungo. Dessa forma, o efeito de nutrientes presentes nas águas de lavagem pode ter sido mascarado. Testes futuros poderão ser conduzidos com meio de cultivo pobre em nutrientes, como Ágar-Água, tornando assim possível uma melhor mensuração do efeito dos nutrientes presentes nas águas de lavagem sobre *C. acutatum*.

Figura 12 – Crescimento micelial médio de *Colletotrichum acutatum* isolado 61A (A) e *C. acutatum* isolado 142 (B) quando submetidos aos tratamentos com água de lavagem de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de laranjeira ‘Valência’ e mistura das frações de flores, botões florais, FV e FN. Como controle utilizou-se apenas água

4.1.4 Efeito das ALBs sobre estruturas quiescentes de *Colletotrichum acutatum* em folhas de laranjeira ‘Valência’

Além do efeito das ALBs sobre as estruturas quiescentes do patógeno no tocante a germinação de conídios e crescimento de hifas, procurou-se observar também as diferentes estruturas formadas durante a germinação dos conídios em folhas de laranjeira, com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O conídio de *C. acutatum* é asseptado, porém após a germinação, há formação de septo (Figuras 13A e 13B), tornando-o bicelular, como relatado em outros trabalhos (PERES et al., 2005; LINS; ALVES; ABREU, 2007; MORAES, 2009). No entanto, vários conídios não formam septo após a germinação (LEANDRO et al., 2001). Com o desenvolvimento do apressório, o material celular do conídio migra para essa estrutura, permanecendo o conídio sem o conteúdo celular, originando a estrutura conhecida como “ghost” (Figura 13C). Toda a formação do tubo germinativo ocorre às expensas da migração do protoplasto do esporo para essas estruturas (AMORIM; PASCHOLATI, 2011). Até esse momento, portanto, o fungo encontra-se na fase de pré-penetração, não havendo parasitismo, sendo o desenvolvimento do fungo dependente das reservas presentes no conídio. Nesse momento, nutrientes presentes na superfície das folhas, oriundos desta ou de outras partes vegetais, poderiam auxiliar no desenvolvimento do patógeno. Após, o fungo penetraria nos tecidos e passaria a retirar nutrientes do hospedeiro. Estas estruturas foram observadas utilizando o método 1, conforme descrito na página 39.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura de *Colletotrichum acutatum* em folhas de laranjeira 'Valência' 14 dias após a inoculação e 24 h após o tratamento com água (A), ALBs de folha velhas (B) e flor (C). A. Septo formado no conídio após a germinação e material adesivo extracelular (seta) próximo aos conídios germinados; B. Septo formado no conídio após a germinação; C. Conídio germinando com transferência do conteúdo celular para o apressório. a = apressório; c = conídio; tg = tubo germinativo; st = septo. Barra = 10µm

Na Figura 14, pode-se observar a formação de conídio secundário a partir do conídio original, bem como a partir do apressório. O mesmo foi observado no tratamento com as ALBs de flores e folhas velhas, bem como no tratamento com água. O método utilizado foi o 4 (pg. 40). A conidiação secundária, também conhecida como conidiação microcíclica ou precoce, é definida como a que ocorre imediatamente após a germinação de conídios com pouco ou nenhum crescimento micelial (SMITH et al., 1981). O fenômeno já foi descrito por outros autores para *C. acutatum*, em resposta ao tratamento com extrato floral e, estes conídios parecem ser a fonte primária de inóculo para a infecção de novos tecidos (LEANDRO et al., 2001; TIMMER et al., 1994).

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura de *Colletotrichum acutatum* em folhas de laranja 'Valência' 14 dias após a inoculação e 24 h após o tratamento com água (A), ALBs de flor (B) e folha velha (C). A. Formação de conídio secundário, a partir do conídio principal; B. Conídio secundário. C. Formação de conídio secundário, a partir do apressório. a = apressório; c = conídio; cs = conídio secundário; tg = tubo germinativo. Barra = 10µm

Após a inoculação e aplicação das ALBs em folhas de laranja Valência, observou-se que o incremento no número de conídios germinados foi significativo apenas no tratamento com a ALB oriunda de botões (Figura 15). Pode-se observar

que mesmo com a aplicação de água apenas, houve estímulo na germinação dos conídios quando comparado a folha apenas inoculada, a qual foi destacada da planta após 14 dias da inoculação e submetida ao preparo para MEV, sem nenhum tipo de tratamento. No entanto, apesar de não haver incremento na germinação dos conídios nos demais tratamentos, quando comparados com a água, pode-se verificar aumento na ramificação das hifas após a aplicação das ALBs, principalmente, nas oriundas de botões e flores (Figura 16). Para quantificação, os melhores métodos foram o 2 e 4, pois nestes as amostras não são imersas em fixador ou desidratadas em acetona, o que pode remover estruturas fúngicas presentes na superfície das folhas.

Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, Zulfiqar; Brlansky; Timmer (1996) também verificaram a produção de conídios após o tratamento com extrato floral e umidade, 30 dias após a inoculação, sendo que o número de conídios novos de *C. acutatum* formados após a aplicação de água foi de 14 ± 4 cm⁻² de folha, enquanto que para o extrato floral foi de 217 ± 15 cm⁻² de folha.

Figura 15 – Número de conídios germinados em folhas de laranja 'Valência', 14 dias após a inoculação e 24 h após a aplicação de água de lavagem de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN). Como controle utilizou-se água e folhas apenas inoculadas. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Figura 16 – Ramificação das hifas de *Colletotrichum acutatum* sobre folhas de laranja 'Valência', 24 h após a aplicação de água (A), água de lavagem bruta de flores (B) e botões (C e D), transcorridos 14 dias após a inoculação. Barra = 100 μm

Parker e Blakeman (1984) observaram que lixiviados produzidos a partir de gotas de água depositadas em folhas de fava por 48 h, reduziram a germinação, mas aumentaram o crescimento de tubos germinativos de uredósporos de *U. viciae-fabae*. Estes resultados e os do presente trabalho demonstram que o efeito de substâncias presentes nas ALBs não é padrão, não havendo estímulo em todos os processos. No entanto, como na natureza o que afeta o desenvolvimento do patógeno e o progresso da doença é um conjunto dos fatores, a ação das ALBs resultaria em estímulo na germinação, formação de apressórios e/ou crescimento das hifas de *C. acutatum*, o que poderia agravar a ocorrência da doença no campo.

4.1.5 Efeito das ALBs sobre a severidade da PFC em laranja 'Valência'

Pode-se observar uma maior severidade final nas plantas tratadas com a ALB da mistura (Figura 17). Ao final da 4ª avaliação, 59% das flores apresentaram a nota 3 no tratamento apenas inoculado, enquanto que nas plantas inoculadas com ALB, 90% das flores apresentaram a referida nota. Dessa forma, além das águas de lavagem atuarem no estímulo a produção de estruturas de infecção, elas podem aumentar a severidade da doença, possivelmente, devido a presença de nutrientes

para o patógeno. No entanto, alguns aspectos merecem ser mencionados neste teste. O número de flores e botões florais inoculados não foi contabilizado, condição necessária para avaliação posterior da severidade. O experimento não pode ser repetido, pois as plantas não floresceram mais. A 1ª avaliação não foi considerada pois, não foram contabilizadas as flores sadias. No entanto, como o resultado foi julgado interessante, optou-se por incluí-lo na dissertação.

Figura 17 – Percentual de flores com sintomas da podridão floral dos citros nos tratamentos com plantas apenas inoculadas (Inoc.) e plantas inoculadas juntamente com a mistura da água de lavagem (Inoc. + ALB). Nota 0 – ausência de sintomas; 1 – sintoma leve (apenas uma pétala com sintomas); 2 – sintoma moderado (de duas a três pétalas com sintomas); 3 – sintoma severo (mais de três pétalas com sintomas). Avaliações: 2ª – 4 dias; 3ª – 6 dias; 4ª – 8 dias

4.2 Compostos voláteis (CVs)

4.2.1 Efeito *in vitro* dos compostos voláteis brutos (CVBs) oriundos de flores, botões, folhas velhas e folhas novas de laranjeira ‘Valência’ na germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum acutatum*

Sob a ação dos CVBs, o comportamento do isolado 61A foi diferenciado quando comparado ao isolado 142 (Figuras 18 e 19). Para o isolado 61A, os compostos voláteis, de forma geral, reduziram o percentual de conídios germinados e apressórios formados, de modo mais significativo no tratamento com CVBs de flores. Para comprimento do tubo germinativo todos os CVBs reduziram

significativamente esta variável. Para o Isolado 142, os CVBs apresentaram efeito apenas sobre o comprimento do tubo germinativo.

Avaliando o efeito conjunto das águas de lavagem e compostos voláteis observou-se que as ALBs atuam no estímulo a conídios e apressórios do patógeno, enquanto que os CVs atuam, de forma geral, inibindo o desenvolvimento dos mesmos. Dessa forma, os compostos voláteis atuariam como um mecanismo de regulação, impedindo a germinação de todas as estruturas quiescentes ao mesmo tempo. Exemplos existem com CVs oriundos de plantas inibindo a germinação de fitopatógenos (YAMASAKI et al., 2007; HAMILTON-KEMP et al., 1992). Dessa forma, a ação conjunta das águas de lavagem e dos compostos voláteis, permitiria o estímulo de uma parte das estruturas quiescentes enquanto que outras permaneceriam em estado de dormência, garantindo a sobrevivência do fungo caso as condições ambientais posteriores não fossem adequadas ao desenvolvimento do patógeno.

Figura 18 - Germinação de conídios, formação de apressórios e comprimento do tubo germinativo de *Colletotrichum acutatum*, isolado 61A, quando submetidos aos voláteis oriundos de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de laranjeira 'Valência' e mistura destas. Como controle utilizou-se algodão embebido com água. Avaliações efetuadas 18 h após o tratamento com os CVBs. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Figura 19 - Germinação de conídios, formação de apressórios e comprimento do tubo germinativo de *Colletotrichum acutatum*, isolado 142, quando submetidos aos voláteis oriundos de flores, botões florais, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de laranja 'Valência' e mistura destas. Como controle utilizou-se algodão embebido com água. Avaliações efetuadas 18 h após o tratamento com os CVBs. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

4.2.2 Efeito *in vitro* dos CVs identificados a partir de flores e botões de laranjeira 'Valência' na germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum acutatum*

Para o isolado 61A, conídios expostos aos CVs linalol e nonanal, mesmo na dose de $0,005 \mu\text{L mL}^{-1}$, apresentaram germinação inferior a testemunha (Figura 20A). A mistura dos CVs apenas na menor dose manteve a germinação semelhante a testemunha. Nas demais doses da mistura, linalol e nonanal a germinação foi completamente inibida. O mirceno manteve a germinação semelhante a testemunha em todas as doses testadas, assim como o limoneno nas doses de $0,005$ a $0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$. A partir da dose de $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ de limoneno verificou-se uma redução significativa na germinação, chegando a inibição completa na maior dose. Já para os apressórios houve estímulo apenas nas doses até $0,1 \mu\text{L mL}^{-1}$ dos CVs mirceno e limoneno (Figura 20C). Por sua vez, todos os voláteis reduziram significativamente o comprimento do tubo germinativo do patógeno (Figura 20E). As equações e respectivos coeficientes de determinação encontram-se na Tabela 6.

Para o isolado 142 optou-se por testar a dose de $0,0005 \mu\text{L mL}^{-1}$, além das testadas para o Isolado 61A. No caso do Isolado 142, o comportamento de *C. acutatum* foi similar ao observado acima, no entanto, aparentemente mais drástico do que para o primeiro isolado (Figuras 20B, D e F). Todas as doses testadas de todos os CVs reduziram o número de conídios germinados e apressórios formados de *C. acutatum*. Todos os voláteis, exceto a menor dose de mirceno, reduziram significativamente o comprimento do tubo germinativo (Figura 20F).

Figura 20 - Germinação de conídios, formação de apressórios e comprimento do tubo germinativo de *Colletotrichum acutatum* (A, C e E – isolado 61A e B, D e F – isolado 142), quando submetidos aos compostos voláteis linalol, limoneno, mirreno, nonanal e mistura destes. As concentrações utilizadas para o isolado 61A foram: 0,005, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e para o isolado 142, foram: 0,0005, 0,005, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$. O gráfico menor corresponde ao intervalo de doses de 0 a 0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Como controle utilizou-se algodão embebido com água. Avaliações efetuadas 18 h após o tratamento com os CVs. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 6 – Equações e coeficiente de determinação (R^2) para produção de apressórios (A), germinação de conídios (C) e comprimento do tubo germinativo (Tg) de *Colletotrichum acutatum* isolados (Is.) 61A e 142 quando exposto aos voláteis linalol, limoneno, mirceno, nonanal e mistura destes

Is.	Voláteis	Variável	Equação	R^2
61A	linalol	A (%)	$y = 20,80e^{-651,61x}$	0,99
		C (%)	$y = 110,80e^{-75,30x}$	0,94
		Tg (μm)	$y = 260,18e^{-247,12x}$	0,99
	limoneno	A (%)	$y = 43,78e\{-0,5[(x-0,04)/0,05]^2\}$	0,95
		C (%)	$y = -112x + 104,28$	0,86
		Tg (μm)	$y = 47,63 + 180,52e^{-49,37x}$	0,82
	mirceno	A (%)	$y = 39,02e\{-0,5[(x-0,06)/0,20]^2\}$	0,77
		C (%)	$y = -2,12x + 100,06$	0,80
		Tg (μm)	$y = 97,56 + 161,82e^{-193,21x}$	0,93
	nonanal	A (%)	$y = 26,45e^{-60,65x}$	0,83
		C (%)	$y = 100,04e^{-183,97x}$	0,99
		Tg (μm)	$y = 260,18e^{-370,24x}$	0,99
	mistura	A (%)	$y = 22,38e^{-81,42x}$	0,96
		C (%)	$y = 112,31e^{-73,06x}$	0,93
		Tg (μm)	$y = 260,18e^{-262,60x}$	0,99
142	linalol	A (%)	$y = 25,00e^{-4526,72x}$	0,99
		C (%)	$y = 62,01e^{-1479,27x}$	0,99
		Tg (μm)	$y = 85,80e^{-954,38x}$	0,99
	limoneno	A (%)	$y = 24,97e^{-1457,13x}$	0,97
		C (%)	$y = -176,40x^2 + 135,46x + 43,14$	0,81
		Tg (μm)	$y = -1,11 + 63,91e^{-9,24x}$	0,86
	mirceno	A (%)	$y = 24,99e^{-2434,34x}$	0,69
		C (%)	$y = -40,23x + 53,74$	0,87
		Tg (μm)	$y = 45,72 + 52,92e^{-300,73x}$	0,85
	nonanal	A (%)	$y = 25,00e^{-4860,83x}$	0,99
		C (%)	$y = 62,56e^{-690,05x}$	0,99
		Tg (μm)	$y = 85,75e^{-1207,44x}$	0,99
	mistura	A (%)	$y = 25,00e^{-6884,03x}$	0,99
		C (%)	$y = 62,01e^{-1045,43x}$	0,99
		Tg (μm)	$y = 85,97e^{-812,94x}$	0,99

Droby et al. (2008) apresentam um estudo amplo sobre voláteis de plantas cítricas e seus efeitos sobre patógenos e não patógenos de citros. No trabalho destes autores foram identificados, a partir do óleo comercial oriundo da casca de frutos de pomelo, tangerina e laranja, entre outros, os CVs limoneno, mirceno e linalol. Os mesmos autores, avaliando a germinação e o comprimento do tubo germinativo, verificaram, de modo geral, que o CV limoneno, nas doses de 0,5 a 60 $\mu\text{L/placa}$, e os voláteis mirceno, α -pineno e β -pineno, nas doses de 5 a 40 $\mu\text{L/placa}$, mostraram efeito estimulatório sobre *P. digitatum* e *P. italicum*, patogênicos a citros, mas inibitório ou não tiveram efeito sobre *P. expansum* e *B. cinerea*, não patógenos

de citros. Os dados destes autores demonstraram também uma sensibilidade diferenciada dos fungos, o que pode explicar em parte o efeito inibitório observado no presente trabalho para limoneno e mirceno, de modo particular para o isolado 142. Para o isolado 61 A, apenas nas menores doses, verificou-se a manutenção da germinação e estímulo na formação de apressórios. Estudos posteriores devem ser conduzidos nesta linha, a fim de se testar doses inferiores as utilizadas. Yamasaki et al. (2007) também verificaram que os CVs limoneno e mirceno não inibiram a germinação e o comprimento de hifas de *Alternaria alternata*, mesmo na dose de 1 mmol L⁻¹ de ar.

Droby et al. (2008) observaram que os compostos citral e linalol foram estimulantes sobre a germinação de conídios e comprimento do tubo germinativo em concentrações relativamente baixas, mas altamente inibitórios nas concentrações que foram estimulantes para os outros voláteis testados. O linalol estimulou significativamente a germinação de *P. digitatum* e *P. italicum* em quantidades de até 2 µL/placa. O efeito inibitório do linalol sobre o *P. expansum* e *B. cinerea* foi evidente em concentrações de 0,5 µL/placa e superiores. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, uma vez que a concentração de 0,005 µL mL⁻¹ de ar (equivalente a 0,3 µL/placa) foi a única que apresentou germinação quando do tratamento com linalol, mas ainda assim, inferior a testemunha. O mesmo foi observado para o comprimento do tubo germinativo. De modo similar, Yamasaki et al. (2007) verificaram inibição de 97% na germinação de esporos e 98% no crescimento das hifas de *A. Alternata*, após exposição ao composto linalol na dose de 1 mmol L⁻¹ de ar. No entanto, após remoção do CV, os autores verificaram que esse efeito foi fungistático, pois o fungo retomou o crescimento. Ao se pensar em questão de ambiente de crescimento de plantas cítricas e de desenvolvimento do patógeno, no entanto, os voláteis estão presentes durante todo o ciclo, atuando assim sobre o patógeno de forma contínua.

Concentrações muito baixas de nonanal estimularam o crescimento do tubo germinativo e não afetaram ou até estimularam a germinação de conídios de *P. digitatum* e *P. italicum* (DROBY et al., 2008). Porém, em concentrações mais elevadas (0,5 µL/placa), o composto foi inibitório. *P. expansum* e *B. cinerea* não foram afetados por dose menor do que 0,1 µL/placa de ambos os compostos, mas 0,5 µL/placa inibiu completamente a germinação de *P. expansum* e inibiu significativamente a germinação de *B. cinerea*. De modo similar, neste trabalho, para

C. acutatum, a dose de 0,005 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ar (0,3 $\mu\text{L/placa}$) de nonanal afetou negativamente a germinação e o comprimento do tubo germinativo.

Apesar de vários trabalhos relatarem a ação de voláteis no estímulo de estruturas de patógenos, como o citral e o nonanal estimulando *P. digitatum* e *P. italicum* (FRENCH et al., 1978), os sulfuretos *n*-propil e alil na germinação de escleródios de *Sclerotium cepivorum* (COLEY-SMITH; KING, 1969) e voláteis oriundos de frutos de damasco na ativação de infecções quiescentes de *Monilinia fructicola* (CRUICKSHANK; WADE, 1992), no presente trabalho, as doses testadas não foram estimulatórias sobre *C. acutatum*.

Os trabalhos encontrados na literatura demonstram um efeito mais acentuado dos CVs linalol e nonanal sobre o desenvolvimento de fungos, quando comparados aos CVs mircenol e limoneno. Estes últimos, de maneira geral, não inibem a germinação, ao passo que, linalol e nonanal mostram-se inibitórios em doses muito baixas. Desta maneira, estes dados reforçam os obtidos no presente trabalho. Além disso, de acordo com os dados obtidos por Vilela (2010), o CV linalol é o mais abundante nas ALBs de flores e botões florais, perfazendo aproximadamente 70% dos CVs, sendo este possivelmente, o mais atuante sobre o patógeno na natureza. No entanto, estudos posteriores devem ser conduzidos com doses inferiores as utilizadas neste estudo, a fim de se elucidar o comportamento do fungo frente aos CVs.

4.3 Identificação de substâncias oriundas de plantas cítricas

4.3.1 Substâncias solúveis em água

O extrato bruto obtido a partir das flores de *Citrus sinensis*, assim como as respectivas frações oriundas dos sucessivos fracionamentos em cromatografia líquida (item 3.5.1), foram monitoradas e analisadas via Ressonância Magnética Nuclear 1D (RMN) e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS). Devido à reduzida massa de extrato bruto obtida (5,83 mg), apenas o isolamento da cafeína foi factível (Figura 21). No entanto, frações ricas em glicosídeos, flavonóides e possíveis peptídeos, foram detectadas via análise por LC-MS/MS (Figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28). Avaliou-se o efeito da cafeína e da hesperidina sobre a germinação de *C. acutatum* (Figura 30).

Na Figura 21, encontram-se os espectros de massa da cafeína. Com a análise do espectro de *full scan* da substância pura obtida, detectou-se a *m/z* 195 no

modo positivo de ionização, ou seja $[M+H] = 195$, o que é condizente à massa da cafeína acrescida a um próton (oriundo do processo de ionização). O espectro de íons produtos também mostrou-se coerente à substância proposta, devido às fragmentações características à estrutura molecular da mesma.

Figura 21 - Espectros *full scan* referente à cafeína isolada, m/z 195 (A) e espectro de íons produtos *ESI*, modo positivo, 25eV, m/z 195 $[M+H]^+$, da cafeína (B), detectada na fração referente a água de lavagem de flores de laranjeira 'Valência'

Stewart (1985) também observou a presença de cafeína em extrato de flores e folhas de várias espécies de *Citrus*, inclusive laranjeira 'Valência'. Similarmente, Kretschmar e Baumann (1999) detectaram cafeína em flores de várias plantas cítricas, estando a maior quantidade confinada nos estames. Os resultados destes autores confirmam os obtidos no presente trabalho, uma vez que, ao preparar a ALB de flores, ocorre a lixiviação de substâncias presentes nos estames.

A cafeína pode desempenhar importante papel no desenvolvimento de fitopatógenos. Lee; D'Souza; Kronstad (2003) apresentam uma revisão sobre o sistema de sinalização AMPc (adenosina monofosfato cíclico) em fungos fitopatogênicos. Segundo estes, durante o processo de infecção há a produção pelo fungo de estruturas especializadas, como apressórios e haustórios, dentre outros. Os mecanismos de sinalização que regulam a proliferação do fungo e a diferenciação incluem a MAP kinase e a cascata de sinalização AMPc, sendo que, esta última tem importante papel na regulação da morfogênese e patogênese de fitopatógenos. Dependendo do fungo, a AMPc atuaria na morfogênese de hifas,

formação de estruturas de infecção, formação de escleródios, esporulação e germinação de esporos.

O nível celular de AMPc é dependente da atividade das enzimas de biossíntese e degradação (fosfodiesterases). A biossíntese de AMPc ocorre em células eucarióticas em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares como nutrientes, luz, temperatura e hormônios e regula uma variedade de processos fisiológicos (LEE; D'SOUZA; KRONSTAD, 2003). Rollins e Dickman (1998) verificaram que o desenvolvimento de escleródios em *Sclerotinia sclerotiorum* é inibido pela AMPc. Especificamente, os níveis de AMPc são elevados pelo tratamento do micélio com cafeína, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), ou NaF, sob condições de crescimento que permitem o desenvolvimento de escleródios. Por sua vez, a cafeína e o IBMX são inibitórios da atividade da fosfodiesterase que inativa a AMPc. Em *Colletotrichum*, agentes farmacológicos que elevaram os níveis endógenos de AMPc foram hábeis em induzir a diferenciação de apressórios em ágar-água (1,5%), uma superfície não indutora (LEE; D'SOUZA; KRONSTAD, 2003). Dessa forma, a cafeína ou alguma outra substância exógena, oriunda das ALBs, poderia atuar na cascata de sinalização da AMPc, desencadeando mecanismos que resultariam na passagem da condição quiescente para a retomada do crescimento ativo de *C. acutatum*. No entanto, sobre a germinação de *C. acutatum* a cafeína não mostrou-se estimulatória (Figura 30).

Nas frações de maior polaridade foram detectados peptídeos. Por possuírem vários possíveis sítios ionizáveis, proteínas e peptídeos apresentam um grande número de cargas quando analisados no espectrômetro de massas. Como os analisadores dos espectrômetros não analisam a massa propriamente dita, mas sim a razão massa/carga (m/z) dos íons, o espectro de massas obtido (no modo *full scan*) para tais macromoléculas, corresponde à distribuição de sinais consecutivos que referem-se às populações de íons com diferentes cargas obtidas por protonação $[M+zH]^{z+}$ ou desprotonação $[M-zH]^{z-}$ (KLITZKE, 2011). Por essa característica, de modo geral, o espectro de *full scan* para tais moléculas, apresenta um perfil de uma curva gaussiana, como ilustra a Figura 22 e 23.

Figura 22 – Espectros de *full scan ESI*, modo positivo referente a banda cromatográfica em 5,86 minutos encontradas no cromatograma de íons totais referente a F 1.1-14

Figura 23 - Espectros de *full scan ESI*, modo positivo referente respectivamente às bandas cromatográficas em 5,22 (A) e 5,74 minutos (B) encontradas no cromatograma de íons totais relativo a F 1.1-5

Embora a confirmação da identidade dos peptídeos detectados não tenha sido possível devido à necessidade de outro tipo de analisador de massas (Time-of-flight, por exemplo), e também ferramentas analíticas mais elaboradas (softwares adequados para a análise de biomoléculas), houve a constatação da existência de peptídeos nas frações devido às características espectrais já mencionadas. A existência de tais moléculas sugere a presença de fontes nitrogenadas no extrato da flor, as quais podem atuar como fonte nutricional para o fungo (WIAME; GRENSON; ARST, 1985), uma vez que peptídeos são compostos por sequências de aminoácidos (STEEN; MANN, 2004).

Ao se realizar a lavagem de flores e botões florais, tem-se a remoção de substâncias presentes no pólen e néctar, as quais podem servir de nutrientes para o desenvolvimento do fungo. Nesse sentido, Marchini; Reis; Moreti (2006) identificaram em pólen, dentre outros compostos, em média, 21,5% de proteínas e 28,4% de açúcares totais. Blakeman (1973) afirma que, pelo menos, uma parte do efeito estimulante do pólen sobre o crescimento de fungos é provavelmente associado com a liberação de nutrientes. Os peptídeos identificados podem ser oriundos do pólen.

Além disso, o pólen pode também afetar a interação patógeno-hospedeiro. A fitoalexina wierona, formada em fava em resposta à infecção por *B. cinerea*, restringe o crescimento do patógeno *in vitro* e *in vivo* (MANSFIELD; DEVERALL, 1971). No entanto, na presença de pólen e wierona, os mesmos autores observaram que os esporos germinam bem e apresentam comprimento do tubo germinativo similar ao observado apenas em extrato de feijão e pólen, e superior a água. Os autores observaram que o pólen não inibia o acúmulo de wierona e nem degradava a mesma. Aparentemente, os esporos se tornaram de alguma forma insensíveis a fitoalexina pela presença do pólen.

Através das análises via LC-MS/MS das frações obtidas, identificaram-se carboidratos nas ALBs (Figuras 24, 25, 26 e 27). Embora nenhuma substância de tal classe tenha sido determinada efetivamente, os espectros de íons produtos de várias frações analisadas, trazem o aparecimento de perdas características de unidades glicosiladas, (perdas de água, 18u, seguidas de perdas de 180 e 162u, por exemplo). Além dos oligossacarídeos, há indícios da existência de outras classes de compostos contendo unidades glicosídicas ligadas às mesmas, justamente com relação ao aparecimento de tais perdas como, por exemplo, a ocorrência de flavonóides glicosilados que será discutida à seguir.

Figura 24 - Espectro de íons produtos de m/z 328, relativo a F 1.1-3. ESI/ positivo 20 eV

Figura 25 - Espectro de íons produtos de m/z 295, relativo a F 1.1-14. ESI/ positivo 20 eV

Figura 26 - Espectro de íons produtos de m/z 384, relativo a F 1.1-8. ESI positivo 20 eV

Figura 27 - Espectro de íons produtos de m/z 266, relativo a F 2.4-5. ESI positivo 20 eV

Oligossacarídeos são moléculas formadas pela ligação de dois ou mais monossacarídeos, através de ligações conhecidas como glicosídicas, ocorrendo entre a hidroxila ligada ao carbono anomérico (carbonos 1 ou 2 dependendo do tipo de monossacarídeo) de uma unidade e qualquer outra hidroxila livre da outra unidade, com conseqüente perda de uma unidade de água (STANEK; CERNY; PACAK, 1965). Os oligossacarídeos podem estar na sua forma livre ou, ainda, conjugados com diversos outros compostos, como flavonóides, lipídeos, proteínas, entre outros.

Os polifenóis na natureza geralmente ocorrem conjugados com açúcares, normalmente, do tipo *O*-glicosídeos (SANTOS-BUELGA; GARCÍA-VIGUERA;

TOMÁS-BARBERÁN, 2003). Na análise de espectrometria de massa, a clivagem da ligação glicosídica com concomitante rearranjo H leva à eliminação do resíduo de açúcar, ou seja, 162u (hexose, glicose ou galactose), 146u (deoxihexose ou ramnose), 132u (pentose, xilose ou arabinose), e 176u (ácido glicurônico) (AABY; EKEBERG; SKREDE, 2007), características estas que podem ser visualizadas nas Figura 24, 25, 26 e 27. Como já mencionado, açúcares podem servir como nutrientes para o desenvolvimento de fungos (YADAV, 1981; AGRIOS, 2005).

O espectro da Figura 28A refere-se ao flavonóide glicosilado hesperidina. Zhou et al. (2006) descrevem os quatro íons predominantes observados quando da fragmentação da molécula: a molécula protonada m/z 611, o fragmento m/z 449 correspondente à perda de uma molécula de glicose (162 u), e uma aglicona protonada (m/z 303) correspondente à perda da molécula ramnosil-glicose (308u) (Figura 29).

Figura 28 – Espectros de íons produtos *ESI*, modo positivo, 20eV, m/z 611 e m/z 581 $[M+H]^+$, da hesperidina (A) e naringina (B), detectada na fração referente a água de lavagem de flores de laranja ‘Valência’

Figura 29 - Espectro de íons produtos para m/z 611 (hesperidina). Fonte: Zhou et al. (2006)

Também detectou-se a presença do flavonóide glicosilado naringina (Figura 28B) (MA et al., 2000). Não foi possível observar o pico do íon molecular 581, pois a energia necessária para a fragmentação foi muito intensa. No entanto, pode-se afirmar que é a molécula naringina, pois houve pico característico da aglicona protonada (naringenina) caracterizada pelo íon produto m/z 273 (MA et al., 2000).

Tripoli et al. (2007) abordam várias informações relacionadas aos flavonóides de *Citrus*. As flavanonas, uma das classes de flavonóides, estão presentes em formas glicosiladas e como agliconas. Dentre as formas não glicosiladas, naringenina e hesperitina são as mais importantes. Com relação as formas glicosiladas, há dois tipos: neohesperidosídeos e rutinosídeos (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990). Os neohesperidosídeos, flavanonas, naringina, neohesperidina e neoeriocitrina consistem de uma flavanona com neohesperidose (ramnosil- α -1,2 glicose), enquanto rutinosídeos (flavanonas, hesperidina, narirutina e didimina) apresentam uma flavanona e como resíduo, um dissacarídeo, por exemplo, rutinose (ramnosil- α -1,6 glicose).

Castillo; Benavente; Del Rio (1992) verificaram a presença dos flavonóides glicosilados naringina e neohesperidina durante o desenvolvimento das folhas, flores e frutos de *C. aurantium*. A partir de extração em DMSO das diferentes partes vegetais, identificaram picos característicos de naringina e neohesperidina. Após hidrólise destes compostos, identificaram como açúcares resultantes da hidrólise, ramnose e glicose. Análises de RMN confirmaram a presença dessas flavononas glicosiladas. Estes autores também verificaram variação na concentração, de acordo com as fases de desenvolvimento de cada parte vegetal. Flavonóides glicosilados e outros flavonóides também foram identificados por Manthey et al. (2000) em folhas de *C sinensis*.

A presença de compostos glicosilados também está de acordo com os resultados obtidos por Vilela (2010), quando foram encontradas altas concentrações de carboidratos nas ALBs, particularmente, nas oriundas de flores. No entanto, estas concentrações podem variar conforme a época do ano e estágio fenológico da planta, como já demonstrado, resultando nos estímulos diferenciados observados ao longo das avaliações. Outro aspecto importante a ser mencionado, refere-se ao fato dos flavonóides glicosídeos serem mais solúveis em água do que as agliconas (ALMEIDA, 2006), o que explicaria a presença desses compostos nas ALBs.

Apesar de flavonóides glicosilados serem relatados como inibitórios à fitopatógenos (ORTUÑO et al. 2006), há relato destes compostos como estimulatórios a patógenos de plantas (KALINOVA; RADOVA, 2009). Além disso, de alguma forma, o patógeno pode quebrar a molécula e utilizar apenas as moléculas de glicose para o seu desenvolvimento. No presente estudo, a hesperidina não

apresentou estímulo sobre *C. acutatum* (Figura 30). Embora a naringina tenha sido identificada ela não foi testada devido a indisponibilidade da mesma no país.

Figura 30 – Germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum acutatum*, isolado 61A, quando submetidos as substâncias cafeína e hesperidina, identificadas a partir da água de lavagem de flores de laranjeira ‘Valência’. Avaliações efetuadas 24 h após o tratamento com a cafeína e a hesperidina. Os valores são médias de cinco repetições $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Mackenzie; Peres; Timmer (2010) verificaram que a aplicação de sacarose em folhas inoculadas com o agente da PFC aumentou o número de propágulos recuperados das folhas, sugerindo que a resposta do extrato de flores de citros é

nutricional. No entanto, os autores não realizaram estudos sobre a composição da água de lavagem.

Parker e Blakeman (1984) depositaram gotas de água sobre folhas e monitoraram durante 24 h a concentração de nutrientes nas gotas. Houve uma grande transferência inicial de nutrientes para a água. As análises feitas nas primeiras 24 h mostraram uma tendência geral de aumento da liberação de carboidratos e aminoácidos das folhas para as gotas de água com o tempo. Assim, têm-se relatos de substâncias solúveis em água oriundas de plantas, as quais podem atuar sobre o patógeno. Tukey Jr (1970) também menciona a lixiviação de açúcares, aminoácidos e proteínas, entre outras substâncias.

Tyagi e Chauhan (1982) verificaram maior germinação de alguns patógenos em cultivar suscetível de pimentão, conforme relatado no item 4.1.2. Em análise dos compostos químicos presentes nos exudatos de folhas de pimentão, verificaram a ocorrência de maior quantidade de aminoácidos e açúcares na cultivar suscetível. Estes compostos apresentam papel na suscetibilidade e resistência, de acordo com o trabalho de Hadwiger e Hall (1961). Por outro lado, a presença de maior concentração de fenóis na cultivar resistente e medianamente resistente é atribuída a maior resistência. Além disso, Blakeman (1973) afirma que a saída de nutrientes de esporos de fungos patogênicos em superfícies de folhas, pode contribuir significativamente para o enriquecimento de gotículas de infecção.

Além de nutrientes disponíveis para o desenvolvimento do patógeno e/ou substâncias atuantes na passagem da condição quiescente para o crescimento ativo, os lixiviados podem atuar ainda na remoção da mucilagem. Este seria mais um dos mecanismos que resultaria em uma maior agressividade do patógeno.

4.3.2 Identificação de variação na composição das ALBs

Com a utilização de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) pode-se observar uma possível variação na composição das ALBs de flores, botões, FV e FN, devido as diferentes bandas observadas (Figura 31). Com a utilização do eluente polar básico há bandas coincidentes nas quatro ALBs (R_f 0,6). No entanto, podem ser observadas bandas que aparecem apenas nas ALBs de flores e botões (R_f 0,64) (Figura 31A). Com a utilização do eluente polar ácido há bandas (R_f 0,84) semelhantes nas frações flor, botão e FV, sendo que na FN há duas bandas (R_f 0,37 e 0,57) que não aparecem nas outras frações. Como já detectado em RMN, as ALBs

possuem substâncias bastante polares, ficando essas presas na base da cromatoplaça de sílica. Com a utilização do eluente apolar não foi possível observar bandas. No comprimento de onda de 254 nm foram observadas apenas algumas bandas, as quais eram equivalentes às observadas no comprimento de 365 nm.

Figura 31 – Perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia de Camada Delgada das águas de lavagem de flores, botões florais, folhas velhas e folhas novas de laranja 'Valência'. Bandas observadas sob luz UV (365 nm). A. Eluente polar básico. B. Eluente polar ácido

Na Figura 32 encontram-se os espectros de absorção no ultravioleta e no visível das diferentes ALBs, referentes às coletas de julho de 2010 e março de 2011. Com base nos dados não é possível diferenciar os compostos presentes em cada ALB, mas diferenças na quantidade de acordo com a coleta podem ser visualizadas. Na ALB de flores e FN, nas coletas de março observaram-se maiores valores de absorbância, diferentemente, da ALB de botões. Na ALB de FV não foi verificada variação nos valores de absorbância para as coletas analisadas. Essas variações estão associadas a fatores inerentes a planta, condições de cultivo e ambiente, como já mencionado. No presente estudo, as ALBs foram armazenadas por no máximo um mês em congelador, sendo utilizadas ALBs de diferentes épocas para os estudos. Dessa forma, a variação encontrada em alguns resultados, possivelmente,

seja devida as variações na composição das substâncias presentes nestas, de acordo com as épocas do ano, fato este que deve ser considerado em estudos futuros. As ALBs não podem ser armazenadas por longos períodos em congelador sob risco de perda da atividade biológica, ficando inviável a realização de todos os testes com as ALBs da mesma época. Dessa forma, a liofilização de maiores quantidades de ALBs e padronização da utilização de ALBs da mesma época, realizando a caracterização dos componentes destas, tornam-se fatores importantes a serem considerados.

Figura 32 – Espectros de absorção no ultravioleta e no visível das águas de lavagens de flores, botões, folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de laranjeira 'Valência' nos meses de julho de 2010 e março de 2011

Observou-se absorbância das ALBs entre 240 e 400 nm, sendo que alguns compostos que absorvem nessa faixa são ácidos fenólicos (ROBINS, 2003) e proteínas (HAGEL, 2011). De modo similar, Aaby; Ekeberg; Skrede (2007) relataram que, dentre os polifenóis, os flavonóis tem absorção máxima a 280 nm e a maioria dos compostos fenólicos absorvem a 260 nm. Nesta faixa podemos encontrar também as flavononas glicosiladas, como naringenina triglicosídeo e hesperitina

triglicosídeo ($\lambda_{\max}$ 286 nm, 336 sh) e naringenina 7-O- rutinosídeo, hesperidina e didimina ($\lambda_{\max}$ 284 nm, 336 sh), diosmetina 7-O-rutinosídeo ($\lambda_{\max}$ 252, 268, 348 nm), apigenina 6-C-glicosídeo ($\lambda_{\max}$ 270, 338 nm), dentre outras (LIN; HARNLY, 2007). Finalmente, os resultados obtidos na identificação das substâncias presentes nas ALBs estão de acordo com os encontrados na literatura.

4.3.3 Compostos voláteis

Foram identificados 54 compostos voláteis oriundos de flores, botões florais, FV e FN (Figura 33 e Tabela 7), com base no índice de similaridade e no índice de retenção.

Figura 33 – Espectros de protótipo de Cromatógrafo a Gás Bidimensional Abrangente com detecção Espectrométrica de Massas (GC×GC-qMS) obtidos dos voláteis oriundos de flores (A), botões (B), folhas velhas (C) e folhas novas (D) de plantas de laranjeira ‘Valência’ com aproximadamente 2 anos de idade

Tabela 7 – Compostos voláteis identificados à partir de flores (F), botões (B), folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de plantas de laranjeira ‘Valência’. 1D: 1ª dimensão (coluna) e 2D: 2ª dimensão (coluna), indicam o tempo de retenção na primeira coluna e segunda coluna, respectivamente (continua)

Composto	Tempo de Retenção		Amostras			
	1D (min)	2D (s)	F	B	FV	FN
4,5-Dietiloctano	6,30	0,78	+	+	+	+
trans-4-Metil-4-Deceno	7,00	0,84	+	+	+	+
1-Undeceno	7,20	0,81	+	+	+	+
(E)-5-Undeceno	7,60	0,84	+	+	+	+
4-Metil-1-undeceno	8,30	0,87	+	+	+	+
Citronelal	8,60	0,96	+	+	+	+
(4E)-3-Metil-4-undeceno	8,70	0,90	+	+	+	+
1-Etil-2-heptilciclopropano	9,40	0,96	+	+	+	+
n-Octil formato	9,40	3,33	+	-	-	-
1-Nitro-1-feniletano	10,40	1,59	+	+	+	-
(3E)-3-Dodeceno	10,80	1,05	+	+	+	+
3,3-Dimetilundecano	11,30	0,87	+	+	+	+
3-Dodecino	11,40	1,08	+	+	+	+
2-Indanol	11,50	1,80	+	-	+	-
1-Butoxi-1-isobutoxi-butano	11,60	3,03	+	+	-	-
(E)-5-Dodecen-7-ino	11,70	1,23	+	+	+	+
Ionano	11,70	0,96	+	+	+	+
Pulegona	11,70	1,05	+	+	+	+
(2E)-4-Metil-2-dodeceno	12,20	0,93	+	+	+	+
Neobergamato	12,30	1,35	+	+	+	+
benzenoacetato de etila	12,30	5,43	+	-	-	-
(4Z)-4-Decen-1-ol	12,70	1,08	+	+	+	+
Bergamol	12,80	1,26	+	+	+	+
1,3,3-Trimetilbiciclo[2.2.1]hept-2-il acetato	13,10	2,28	+	+	-	-
Undecanol-4	13,10	1,92	+	+	+	-
Pentilalil butirato	13,20	2,07	+	+	-	-
4,5-dihidro-4-(2-metil-3-metilenebut-4-il)-2(3H)-Furanona	13,50	1,02	+	+	+	+
2,4,6,8-Tetrametil-1-undeceno	13,70	0,93	+	+	+	+
acetato (E,Z)-2,6-Nonadien-1-ol	13,90	3,03	+	-	+	-
7-isopropilideno-biciclo[3.3.0]octan-2-ona	14,00	1,32	+	+	+	+
2-(phenilmethyl)-1,3-dioxolano	14,60	2,04	+	+	+	-
1-Hidroxi-4,4-dimetilciclohexanocarbonitrila	14,60	3,33	+	+	+	+
acetato de (2E)-3,7-dimetil-2,6-octadienil (acetato geraniol)	15,20	2,55	+	+	+	-
trans-8a-metilperhidroazulen-4(1H)-ona	15,90	2,67	+	+	+	-
1,1-Dimetil-2-nonilciclopropano	16,10	0,96	+	+	-	-
Hidroxicitronelal	16,40	2,58	+	+	+	-
(2E)-2-Undecen-1-ol	16,50	2,25	+	+	+	-

Tabela 7 – Compostos voláteis identificados à partir de flores (F), botões (B), folhas velhas (FV) e folhas novas (FN) de plantas de laranjeira ‘Valência’. 1D: 1ª dimensão (coluna) e 2D: 2ª dimensão (coluna), indicam o tempo de retenção na primeira coluna e segunda coluna, respectivamente (conclusão)

Ciclododecanol	17,60	3,06	+	-	-	-
acetato 5-decen-1-ol	17,80	2,64	+	+	-	-
linalil isobutirato	18,40	3,54	+	+	+	-
3-Metiltetradecano	20,50	0,90	+	+	-	+
2-Metil-6-propildodecano	22,10	0,90	+	+	+	+
4,11-Dimetiltetradecano	22,20	1,14	+	+	+	+
1-Octil-1-ciclohexeno	22,50	1,14	+	+	+	+
1,7,7-Trimetilbicyclo[2.2.1]hept-2-il 2-butirato	22,60	1,80	+	-	-	-
Pentadecano	23,00	0,99	+	+	+	+
4-Isopropil-1,7-dimetilciclododecano	23,80	1,05	+	+	+	+
7-Hexadeceno	28,20	0,96	+	+	+	+
(1-Ciclohexil-1-metilpropil)ciclohexano	29,20	1,11	+	+	+	+
3-Hexadecanona	33,00	1,83	+	-	-	-
Fitano	33,10	0,99	+	+	+	+
2-Pentadecin-1-ol	33,80	2,73	+	-	-	-
2,6-Dimetiloctadecano	37,50	1,02	+	+	+	+
1-Nonadeceno	38,00	1,14	+	+	+	+

* + indica a presença e – a ausência do composto na respectiva fração.

Os compostos presentes em maior quantidade foram 4-Metil-1-undeceno, Citronelal, (4E)-3-Metil-4-undeceno, 1-Etil-2-heptilciclopropano, 1-Nitro-1-feniletano, (3E)-3-Dodeceno, (E)-5-Dodecen-7-ino, Neobergamato, 2-(fenilmetil)-1,3-dioxolano, 1-Hidroxi-4,4-dimetilciclohexanocarbonitrila, trans-8a-metilperhidroazulen-4(1H)-ona e Hidroxicitronelal. A maioria dos compostos foi identificada nas quatro partes vegetais, no entanto, seis compostos identificados estavam presentes apenas nas flores. Pode-se observar variação na composição entre as partes vegetais.

Alissandrakis et al. (2003), analisando o extrato de flores de quatro espécies de *Citrus*, observaram que o linalol foi o composto predominante. Droby et al. (2008) identificaram o limoneno como o componente mais abundante, perfazendo 88,9, 86,8 e 92,34% dos voláteis totais em óleo de tangerina, laranja e pomelo, respectivamente. O mirceno, juntamente com o α -pineno, compuseram a segunda e terceira maior quantidade de voláteis encontrados nestes óleos, variando de 2,12 a 2,33% e 0,71 a 1,25%, respectivamente. Por sua vez, o linalol representou menos de 0,57% do total da área de pico da GC.

Como já mencionado, Jabalpurwala; Smoot; Rouseff (2009) verificaram a presença de 70 compostos voláteis em flores de 15 cultivares de citros. Os observados no presente estudo, em comum com o trabalho de Jabalpurwala; Smoot; Rouseff (2009) foram citronelal e pentadecano. Porém, não foram encontrados compostos semelhantes aos identificados por Vilela (2010). Estudos futuros poderão ser conduzidos com esses compostos.

5 CONCLUSÕES

As águas de lavagem brutas (ALBs) de flores, botões, folha nova e mistura das mesmas apresentam efeito estimulatório *in vitro* sobre a germinação de conídios e desenvolvimento do tubo germinativo de conídios e apressórios quiescentes de *Colletotrichum acutatum*. Em folhas, a ALB de botões estimula a germinação de conídios sendo, no entanto, o efeito das ALBs mais pronunciado sobre a ramificação de hifas. As ALBs estão, possivelmente, relacionadas a maior severidade da podridão floral dos citros. Dessa forma, as ALBs podem atuar estimulando estruturas de infecção quiescentes, contribuindo para aumento do inóculo, bem como fornecendo nutrientes que serão utilizados pelo patógeno, agravando a ocorrência da doença no campo.

Há variações e semelhanças na composição das ALBs entre as frações, bem como variações entre as épocas de coleta, explicando em parte a variação na capacidade de estímulo ao longo dos ensaios. As substâncias identificadas nas ALBs são cafeína, hesperidina, naringina, compostos glicosilados e peptídeos. A cafeína e hesperidina, nas doses testadas, são inibitórias sobre *C. acutatum*. Portanto, a atividade indutora das ALBs está relacionada, em parte, possivelmente, a presença de compostos glicosilados e peptídeos.

Os compostos voláteis (CVs) linalol, limoneno, mircenol e nonanal, bem como a mistura destes, nas doses testadas, são de maneira geral, inibitórios ao desenvolvimento *in vitro* de *C. acutatum*.

Há diferença na sensibilidade aos CVs e ALBs para os dois isolados de *C. acutatum* avaliados. O isolado 142, de forma geral, é mais afetado pelos tratamentos tanto com CVs, como com ALBs, indicando haver variação na resposta de acordo com o isolado.

REFERÊNCIAS

- AABY, K.; EKEBERG, D.; SKREDE, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria X ananassa*) fruits by different hplc detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 55, n. 11, p. 4395-4406, 2007.
- AGOSTINI-COSTA, T.S. **Metabolismo Secundário**. Disponível em: <http://snt.sede.embrapa.br:8080/html/gerencias/gpt/proatec_plantas_medicinais/Me tab%F3litos%20secund%E1rios.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2011.
- AGOSTINI, P.J.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of *Colletotrichum gloeosporioides*, the cause of citrus postbloom fruit drop. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 1084, 1992.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 11, p. 1377-1382, 1992.
- AGOSTINI, J.P.; GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 5, p. 485- 490, 1993.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 420-425, 1994.
- AGRIOS, G. **Plant pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- ALISSANDRAKIS, E.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P.C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. **Food Chemistry**, Boston, v. 82, n.4, p. 575–582, 2003.
- ALMEIDA, L.F.R. **Composição química e atividade alelopática de extratos foliares de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae)**. 2006. 107p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Botucatu, 2006.
- ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.3, p. 10-15. 2001. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/divers.pdf>>. Acesso em: 01 maio 2011.
- ALVES, R.C.; DEL PONTE, E.M. Podridão Floral. In: DEL PONTE, E.M. (Ed.) **Fitopatologia.net - herbário virtual**. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/fitopatologia/ficha.php?id=294>>. Acesso em: 29 ago. 2011.
- ALVES, P.R.B.; MELO, B. **Cultura dos Citros**. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros>>. Acesso em: 23 jul. 2010.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S.F. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 59-99.

ATTAWAY, J.A.; PIERINGER, A.P.; BARABAS, L.J. Origin of citrus flavor components. II. Identification of volatile components from citrus blossoms. **Phytochemistry**, Oxford, v. 5, p. 1273–1279, 1966.

ATTAWAY, J.A.; PIERINGER, A.P.; BARARAS, L.J. The origin of citrus flavor components-III. A study of the percentage variations in peel and leaf oil terpenes during one season. **Phytochemistry**, Oxford, v. 6, p. 25-32, 1967.

BARASH, I.; KLISIEWICZ, J. M.; KOSUGE, T. Biochemical factors affecting pathogenicity of *Botrytis cinerea* on safflower. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 54, p. 923-927, 1964.

BIAJOLI, A.F.P.; AUGUSTO, F. Estudo e aplicação em extração em fase sólida de ormosils preparados a partir de pdms. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 13., 2005, Campinas. **Resumos...** Campinas: Unicamp, 2005. p. 137.

BLAKEMAN, J.P. The chemical environment of leaf surfaces with special reference to spore germination of pathogenic fungi. **Pesticide Science**, New York, v. 4, p. 575-588, 1973.

BLAKEMAN, J.P.; PAREERY, D.G. Stimulation of appressorium formation in *Colletotrichum acutatum* by phylloplane bacteria. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, p. 313-325, 1977.

BOTEON, M. **Perspectivas da Citricultura Paulista 2011-2012**. Disponível em: <http://www.centrodecitricultura.br/userfiles/file/33a%20Semana%20da%20Citricultura/9_6_9_00_Margarete_Boteon.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://www.extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 fev. 2011.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul v. 86, n. 5, p. 523-527, 1996.

CASTILLO, J.; BENAVENTE, O.; DEL RIO, J.A. Naringin and neohesperidin levels during development of leaves, flower buds, and fruits of *Citrus aurantium*. **Plant Physiology**, Austin, v. 99, p. 67-73, 1992.

CINTRA, G.S. **Podridão Floral dos Citros: variabilidade, sobrevivência e controle do agente causal, *Colletotrichum acutatum***. 2009. 103 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

COELHO, M.A.Z.; AMARAL, P.F.F. **Técnicas de Purificação**. Disponível em: <http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Enzimol%20Aplic/eqb706_aula_08.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2011.

COLEY-SMITH, J.R.; KING, J.E. The production by species of *Allium* of alkyl sulphides and their effect on germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 64, p. 289-301, 1969.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim agrometeorológico: abril 2009**. Brasília: Conab, 2009. 31 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/geotecnologia/monitoramento_agroclimatico/geote_abr09.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Safra agrícola de laranja no Estado de São Paulo - Safra 2011**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_05_16_03_20_relatorio_laranja_safra_2011_mai_2011..pdf>. Acesso em: 29 ago. 2011.

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

CRUZ, M.C.M.; SIQUEIRA, D.L.; SALOMÃO, L.C.C.; CECON, P.R. Florescimento da tangerineira 'ponkan' e da limeira ácida 'tahiti' submetidas ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 360-364, 2006.

DEGANI, A.L.G.; QUEZIA, B.C.; VIEIRA, P.C. Cromatografia – Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 7, p. 21-25, 1998.

DIVON, H.H.; FLUHR, R. Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. **FEMS Microbiology Letters**, Holanda, v. 266, n. 1, p. 65–74, 2007.

DROBY S.; EICK A.; MACARISIN D.; COHEN L.; RAFAEL G.; STANGE R.; MCCOLUM G.; DUDAI N.; NASSER A.; WISNIEWSKI M.; SHAPIRA, R. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 49, p. 386–396, 2008.

ELAD, Y. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 72, p. 381-422, 1997.

EVUEH, G.A.; OGBEBOR, N.O. Use of phylloplane fungi as biocontrol agent against *Colletotrichum* leaf disease of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 7, n. 15, p. 2569-2572, 2008.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop: a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 91, n. 1, p. 13-20, 1979.

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

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 239-269.

FIORI, A.C.G.; SCHWANESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 148, n. 7/8, p. 483-487, 2000.

FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen. **Journal of Chromatography**, Boston, v. 998, n. 1/2, p. 229–233. 2003.

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

FREEMAN, S.; MINZ, D.; MAYMON, M.; ZVEIBIL, A. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 6, p. 586-592, 2001.

FRENCH, R.C.; LONG, R.K.; LATTERELL, F.M.; GRAHAM, C.L.; SMOOT, J.J.; SHAW, P.E. Effect of nonanal, citral, and citrus oils on germination of conidia of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 877-882, 1978.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA – FUNDECITRUS. Araraquara, 2008. Disponível em: <<http://fundecitrus.com.br/doencas>>. Acesso em: 20 mar. 2009.

GODFREY, B.E.S. Leachates from aerial parts of plants and their relation to plant surface microbial populations. In: DICKINSON, C.H.; PREECE, T.F. (Ed.). **Microbiology of aerial plant surfaces**. London: Academic Press, 1976. p. 433-440.

HADWIGER, L.A.; HALL, C.V. The relationship of pigmentation and free aminoacids content with resistance to *Colletotrichum lagenarium* in watermelon. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 45, p. 373-374, 1961.

HAGEL, L. Gel filtration: size exclusion chromatography. In: JANSON, J. (Ed.). **Protein purification – principles, hight resolution, methods and applications**. New Jersey: John Wiley, 2011. p. 51-91.

HAMILTON-KEMP, T.R.; MCCracken, C.T.; LOUGHRIN, J.H.; ANDERSEN, R. A.; HILDEBRAND, D.F. Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. **Journal of Chemical Ecology**, Holanda, v. 18, n. 7, p. 1083-1091, 1992.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:

<<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=283033>>.

Acesso em: 29 ago. 2011.

IRVINE, J.A.; DIX, N.J.; WARREN, R.C. Inhibitory substances in *Acer platanoides* leaves: seasonal activity and effects on growth of phylloplane fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 70, n. 3, p. 363-371, 1978.

JABALPURWALA, F.A.; SMOOT, J.M.; ROUSEFF, R.L. A comparison of citrus blossom volatiles. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, n.11-12, p. 1428–1434, 2009.

KALINOVA, J.; RADOVA, S. Effects of rutin on the growth of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, Budapest, v. 44, n. 1, p. 39-47, 2009.

KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Piracicaba: NAP/MEPA ESALQ, 2011. 1 CD-ROM.

KLITZKE, C. **Técnicas de Ionização: Electrospray (ESI)**. Disponível em:

<<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=4&codassunto=19&numero=2>>. Acesso em: 09 nov. 2011.

KRETSCHMAR, J.A; BAUMANN, T.W. Caffeine in citrus flowers. **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, n.1, p.19-23, 1999.

LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida**. São Carlos: Editora RiMa, 2004. 96p.

LEANDRO, L.F.S; GLEASON, M.L.; NUTTER JR, F.W.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n.7, p. 659-664, 2001.

LEANDRO, L.F.S.; GLEASON, M.L.; NUTTER, F.W., JR.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Strawberry plant extracts stimulate secondary conidiation by *Colletotrichum acutatum* on symptomless leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 10, p. 1285-1291, 2003.

LEE, N. D'SOUZA, C.A.; KRONSTAD, J.W. Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 399–427, 2003.

LIMA, W.G.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; MELO DE FILHO, P.A. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 1, p. 157-165, 2011.

LIN, L.; HARNLY, J.M. A Screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 55, n.4, p. 1084-1096, 2007.

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

LINS, S.R.O.; ALVES, E.; ABREU, M. S. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum spp.* em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n.6, p. 488-495, 2007.

MA, Y.; VEDERNIKOVA, I.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Internal glucose residue loss in protonated *O*-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, Santa Fé, v. 11, n. 2, p. 136–144, 2000.

MACHEIX, J.J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. The main phenolics of fruits. In: MACHEIX, J.J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. (Ed.). **Fruit phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 1–103.

MACKENZIE, S.J.; PERES, N.A.; TIMMER, L.W. Colonization of citrus leaves and secondary conidiation response to citrus flower extracts by non-postbloom fruit drop strains of *Colletotrichum acutatum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 333-342, 2010.

MANSFIELD, J.W.; DEVERALL, B.J. Mode of action of pollen in breaking resistance of *Vicia faba* to *Botrytis cinerea*. **Nature**, London, v. 232, p. 339, 1971.

MANTHEY, J.A.; GROHMANN, K.; BERHOWB, M.A.; TISSERATB, B. Changes in citrus leaf flavonoid concentrations resulting from blight-induced zinc-deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, Bari, v. 38, n. 4, p. 333–343, 2000.

MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

MARTE, M. Studies on self-inhibition of *Uromyces fabae* (Pers.) de Bary. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 72, p. 335-343, 1971.

MASSOLA JR N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 149-206.

MORAES, S.R.G. **Infecção e colonização de *Colletotrichum gloesporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros**. 2009. 114p. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

MUIRHEAD, I. F. The role of appressorial dormancy in latent infection. In: BLAKEMAN, J.P. **Microbial Ecology of the Phylloplane**. New York: Academic Press, 1998. p. 155-167.

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

NUNES, F.M.N.; PEREIRA, P.A.P.; E ANDRADE, J.B. Reações de ozonólise de olefinas em fase gasosa. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 794-804, 2000.

ORTUÑO, A.; BÁIDEZ, A.; GÓMEZ, P.; ARCAS, M.C.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A.; DEL RÍO, J.A. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, Boston, v. 98, n.2, p. 351–358, 2006.

PARIKKA, P.; LEMMETTY, A. *Colletotrichum acutatum*: survival in plant debris and infection of some weeds and cultivated plants . IN: INTERNATIONAL STRAWBERRY SYMPOSIUM,6., 2009, Huelva. **Anais...** Huelva: Acta Horticulturae, 2009. p. 307-310.

PARKER, A.; BLAKEMAN, J.P. Nutritional factors affecting the behaviour of *Uromyces viciae-fabae* uredospores on broad bean leaves. **Plant Pathology**, London, v. 33, n.1, p. 71–80, 1984.

PERES, N.A.R. **Caracterização patogênica, morfológica, cultural e molecular de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum* spp. em frutas pós-colheita**. 1998. 91p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 1998.

PERES, N.A.R. **Modelo de previsão e controle da podridão floral dos citros causada por *Colletotrichum acutatum***. 2002. 128p. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de Concentração: Horticultura.) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. 2002.

PERES, N.A.; TIMMER L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 8, p. 784-796, 2005.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p. 39-60.

POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo State. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Anais...** Bebedouro: EECB, 2001. p. 75-82.

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

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

ROLLINS, J.A.; DICKMAN, M.B. Increase in endogenous and exogenous cyclicAMP levels inhibits sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 7, p. 2539–2544, 1998.

ROMEIRO, R.S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni11.pdf>> Acesso em: 10 out. 2010.

ROSA, J.D. **Atividade repelente e sistemas nanoestruturados desenvolvidos com limoneno**: revisão. 2010. 20 p. Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

SANTOS-BUELGA, C.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. On-line identification of flavonoids by hplc coupled to diode array detection. In: SANTOS-BUELGA, C., WILLIAMSON, G.(Ed.), **Methods in polyphenol analysis**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. p. 92-127.

SILVA, D.D.; CHIERICE, G.O.; GALHIANE, M.S.; CHAAR, J.S.; MOUCHREK-FILHO, V.E. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* Korstermans utilizando uma nova coluna capilar polyh4-md em cromatografia gasosa. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 461-465, 2003.

SIQUEIRA, D.L.; SALOMÃO, L.C.C. Efeitos do paclobutrazol no crescimento e florescimento dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 355-369, 2002.

SMITH, J.E.; ANDERSON, J.G.; DEANS, S.G.; BERRY, D.R. Biochemistry of microcycle conidiation. In: COLE, G. T.; KENDRICK, B. (Ed.). **Biology of Conidial Fungi**. New York: Academic Press, 1981. p. 329-356.

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

STANEK, J.; CERNY, M.; PACAK, J. **The oligosaccharides**. New York: Academic Press, 1965. 567 p.

STAPLES, R.C.; LACCETTI, L.; YANIV, Z. Appressorium formation and nuclear division in *Colletotrichum truncatum*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 109, n.1/2, p. 75-84, 1976.

STEEN H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

STEWART, I. Identification of caffeine in citrus flowers and leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 33, n. 6, p. 1163-1165, 1985.

SVEDELIUS, G.; UNESTAM, T. Experimental factors favouring infection of attached cucumber leaves by *Didymella bryoniae*. **Transactions of the British Mycological Society**, Grã-Bretanha, v. 71, n. 1, p. 89-97, 1978.

SVEDELIUS, G. Effects of environmental factors and leaf age on growth and infectivity of *Didymella bryoniae*. **Mycological Research**, Grã-Bretanha, v. 94, n. 7, p. 885-889, 1990.

SWINGLE, W.T. REECE, R.C. The Botany of Citrus and its wild Relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER H.J.; BATCHELOR L.D. (Ed.). **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California, 1967. p. 190-430.

TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus – symptoms, disease cycle and control. **Proceedings of the Florida State Horticulture Society**, Winter Haven, v. 106, p. 102-105, 1993.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p. 329-334, 1994.

TRIPOLI, E.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, Boston, v. 104, n.2, p. 466–479, 2007.

TUKEY JR., H.B. Leaching of substances from plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 21, p. 305-324, 1970.

TUKEY JR, H.B. Leaching of substances from plants. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H. (Eds). **Ecology of Leaf Surface Microorganisms**. New York: Academic Press, 1971. p. 67-80.

TYAGI, V.K.; CHAUHAN, S.K. The effect of leaf exudates on the spore germination of phylloplane mycoflora of chilli (*Capsicum annuum* L.) cultivars. **Plant and Soil**, Crawley, v. 65, p. 249-256, 1982.

VALENTE, A.L.P; AUGUSTO, F. Microextração por Fase Sólida. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n.4, p. 523-530, 2000.

VILELA, A.E. **Identificação de substâncias biologicamente ativas, produzidas por laranjeira valência (*Citrus sinensis*), envolvidas na ativação de estruturas de infecção de *Colletotrichum acutatum***. 2010. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

WHARTON, P.S.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v. 61, n. 1, p. 3-22, 2004.

WIAME, J.M.; GRENSON, M.; ARST, H.N. Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. **Advances in Microbial Physiology**, Sheffield, v.26, p. 1-35, 1985.

YADAV, B.S. Behaviour of *Cochliobolus sativus* during its infection of barley and wheat leaves. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 29 n. 1, p. 71 – 79, 1981.

YAMASAKI, Y.; KUNOH, H.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. **Journal of General Plant Pathology**, Kyoto, v. 73, n. 3, p. 168-179, 2007.

ZHOU, D.; XU, Q.; XUE, X.; ZHANG, F.; LIANG, X. Identification of *O*-diglycosyl flavanones in *Fructus aurantii* by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.42, n., p. 441–448, 2006.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, New York, v. 88, n.1, p. 121-128, 1996.