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

**Identificação de substâncias biologicamente ativas, produzidas por
laranja Valência (*Citrus sinensis*), envolvidas na ativação de
estruturas de infecção de *Colletotrichum acutatum***

Ariana Elisei Vilela

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

**Piracicaba
2010**

Ariana Elisei Vilela
Engenheiro Agrônomo

**Identificação de substâncias biologicamente ativas, produzidas por laranja
Valência (*Citrus sinensis*), envolvidas na ativação de estruturas de infecção de
*Colletotrichum acutatum***

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

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

**Piracicaba
2010**

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

Vilela, Ariana Elisei

Identificação de substâncias biologicamente ativas, produzidas por laranjeira valência (Citrus sinensis), envolvidas na ativação de estruturas de infecção de *Colletotrichum acutatum* / Ariana Elisei Vilela . - - Piracicaba, 2010.
83 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Águas 2. Compostos voláteis 3. Fungos fitopatogênicos 4. Germinação 5. Laranja
Podridão (Doença de planta) I. Título

CDD 634.31
V699i

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio Ary e Ana, exemplos da minha vida

Ao Rafael, por seu amor, apoio e paciência incondicional

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre guiar meus passos.

Ao professor Sérgio F. Pascholati, pela orientação, incentivo, paciência, amizade, oportunidade e confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Mário César Guerreiro do Centro de Análise de Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras e seu aluno de doutorado Cleiton Nunes por me auxiliarem durante as análises cromatográficas.

Aos professores Ricardo Magela de Souza e Paulo Estevão de Souza do Departamento de Fitopatologia da UFLA pela gentileza em ceder-me espaço para a realização de parte do meu trabalho.

A funcionária da Clínica Fitossanitária do Departamento de Fitopatologia da UFLA, Eliane, por me auxiliar.

Aos queridos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ/USP, André, Leonardo, Marisa, Josué, Luciana, Fúvia, Nícolas, Cíntia, Luiz Rafael, Simone e Sílvia Blumer pela ajuda e amizade.

Em especial aos meus amigos Maurício, Ely e Nívea pela grande amizade.

A querida Marizete (*in memoriam*) pelos conhecimentos compartilhados.

As minhas amigas Greicy, Bárbara, Ana Carolina por sempre estarem presentes nos momentos de alegria e dificuldades e a Juliana Ramiro por sua amizade tão acolhedora.

Aos todos os amigos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, em especial a Maria Cândida, Geraldo, Júlio, Alécio, Ana Raquel, Thaïs, Débora, Daniela, Pedro, Wagner, Mauro e Maria Cristina.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESAQL/USP, Sílvia, Carmem, Angélica, Sirlene, Jeferson, Fabiana, Vera, Fernanda, Rodolfo, Heloisa e Edvaldo.

A minha grande amiga e companheira de república Ester, por me aturar nos momentos de dificuldade e pela companhia nos momentos de descontração.

Aos meus irmãos Antonio Augusto, meu grande companheiro, e Ari, a quem eu admiro tanto pela grande força.

Ao meu sobrinho Gabriel e minha cunhada Andréia pela alegria.

A minha avó Júlia, e as minhas tias Said e Terezinha pelas orações.

As minhas irmãs de coração, Ana Paula e Carmem Rose e as minhas sobrinhas de coração Tereza Maria e Ana Vitória pelo apoio.

As minhas grandes amigas Rosana, Cristiane e Débora, que mesmo de tão longe sempre estiveram presentes comigo.

Ao Bill, meu grande companheiro.

Ao Prof. Dr. Marcel Bellato Spósito pelo auxílio no começo deste trabalho.

A FUNDECITRUS e ao Dr. Jorgino Pompeu Júnior, pesquisador do APTA – Centro de Citricultura Sylvio Moreira pelo fornecimento das flores.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta fizeram parte desta minha longa jornada.

MUITO OBRIGADA, DE CORAÇÃO!

“Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo.
Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo.
Não viva de fotografias amareladas...
Continue, quando todos esperam que desistas.
Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.
Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você.
Quando não conseguir correr através dos anos, trote.
Quando não conseguir trotar, caminhe.
Quando não conseguir caminhar, use uma bengala.
Mas nunca se detenha.”

Madre Tereza de Calcutá

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Revisão Bibliográfica	19
2.1.1 Ocorrência e importância da Podridão Floral dos Citros no Brasil e no mundo	19
2.1.2 Etiologia.....	20
2.1.3 Sintomatologia.....	22
2.1.4 Epidemiologia.....	22
2.1.5 Ciclo de vida e sobrevivência de <i>Colletotrichum acutatum</i>	24
2.1.6 Controle.....	25
2.1.7 Ativação de estruturas de infecção por nutrientes exógenos	26
2.1.8 Compostos voláteis produzidos por plantas	28
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.2.1 Cultivo e obtenção dos conídios.....	31
2.2.2 Obtenção da água de lavagem	32
2.2.3 Análises Bioquímicas	33
2.2.3.1 Determinação de carboidratos totais.....	33
2.2.3.2 Determinação de açúcares redutores.....	34
2.2.3.3 Determinação de proteínas totais.....	34
2.2.4 Análises Cromatográficas.....	34
2.2.4.1 Identificação de compostos voláteis liberados pelas águas de lavagem das flores e botões.....	34
2.2.4.2 Fracionamento dos compostos voláteis liberados pelas águas de lavagem das flores e botões	35
2.2.5 Bioensaios <i>in vitro</i>	36
2.2.5.1 Preparo da suspensão de esporos de <i>C. acutatum</i>	36

2.2.5.2 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas, com ou sem autoclavagem, sobre a germinação e formação de apressórios.....	36
2.2.5.3 Efeito de substâncias voláteis liberadas pelas águas de lavagem de flores e botões de laranjeira, sobre a germinação e formação de apressórios	38
2.2.5.4 Efeito de frações voláteis obtidas das águas de lavagem de flores e botões sobre a germinação e formação de apressórios.....	38
2.2.5.5 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas sobre o crescimento micelial de <i>C. acutatum</i>	39
2.2.6 Estabelecimento de metodologia para observação de estruturas de infecção produzidas por <i>C. acutatum</i>	40
2.2.6.1 Preparação do material foliar e inoculação.....	40
2.2.6.2 Clareamento do tecido foliar	41
2.2.6.3 Coloração do tecido foliar para observação sob microscópio óptico	42
2.3 RESULTADOS	43
2.3.1 Análises bioquímicas	43
2.3.2 Identificação de compostos voláteis liberados pelas águas de lavagem de flores e botões	44
2.3.2.1 Voláteis identificados a partir das flores.....	44
2.3.2.2 Voláteis identificados a partir dos botões florais	46
2.3.3 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas sobre a germinação e formação de apressórios por <i>C. acutatum</i>	49
2.3.4 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas, com ou sem autoclavagem, sobre a germinação e formação de apressórios por <i>C. acutatum</i>	52
2.3.5 Efeito dos compostos voláteis liberados pelas águas de lavagem de flores, botões e folhas sobre a germinação e formação de apressórios por <i>C. acutatum</i>	55
2.3.6 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas sobre o crescimento micelial de <i>C. acutatum</i>	57
2.3.7 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas, com ou sem autoclavagem, sobre o crescimento micelial de <i>C. acutatum</i>	59
2.3.8 Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem de flores e botões, sobre a germinação e formação de apressórios por <i>C. acutatum</i>	61

2.3.8.1 Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem das flores.....	61
2.3.8.2 Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem dos botões.....	63
2.3.9 Visualização de conídios e apressórios no tecido foliar	65
2.4 DISCUSSÃO	66
2.4.1 Análises bioquímicas.....	66
2.4.2 Efeito das águas de lavagem sobre a germinação e formação de apressórios por <i>C. acutatum</i>	66
2.4.3 Efeito dos compostos voláteis das águas de lavagem sobre a germinação e formação de apressórios por <i>C. acutatum</i>	68
2.4.4 Efeito das águas de lavagem sobre o crescimento micelial de <i>C. acutatum</i>	70
2.4.5 Visualização de conídios e apressórios no tecido foliar	70
3 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75

RESUMO

Identificação de substâncias biologicamente ativas, produzidas por laranja Valência (*Citrus sinensis*), envolvidas na ativação de estruturas de infecção de *Colletotrichum acutatum*

A Podridão Floral dos Citros é uma doença que tem limitado a produção citrícola em várias regiões produtoras do mundo. A sintomatologia esta associada principalmente quando coincide alta pluviosidade e intensa florada. O fungo se encontra na forma quiescente em órgãos vegetais e na presença de nutrientes exógenos reinicia o processo de infecção. Os objetivos do trabalho foram: (i) avaliar o efeito das águas de lavagem bruta (ALB) obtidas a partir de flores, botões e folhas de laranja Valência, sobre o crescimento micelial, germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*; (ii) avaliar o efeito dos compostos voláteis liberados pelas ALB e as frações produzidas a partir das águas de lavagem de flores e botões sobre a germinação e formação de apressórios; (iii) estabelecer uma metodologia para observação de estruturas de infecção em folhas de citros. Foram realizados dois bioensaios de germinação e formação de apressórios e crescimento micelial para as águas de lavagem bruta. O primeiro representado pelos tratamentos: testemunha (T), água de lavagem das flores (F), botões (B), folhas novas (FN), folhas velhas (FV) e a diluição da água das flores em 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 (v/v). O segundo por testemunha (T), água de lavagem das flores (F), botões (B), folhas novas (FN), folhas velhas (FV) e a autoclavagem destes mesmos tratamentos. Os voláteis liberados pelas águas de lavagem de flores e botões primeiramente foram identificados por SPME-CG-MS e logo após as frações foram obtidas de acordo com o tempo de retenção de cada pico encontrado, totalizando 5 frações para cada amostra. Realizou-se um bioensaio de germinação e formação de apressórios com as frações obtidas em contato direto com os esporos. Para a observação de estruturas de infecção, discos foliares de plantas cítricas foram inoculados, submetido a clareamento e posterior coloração para a observação ao microscópio. Os resultados das ALB mostraram que todos os tratamentos estimularam a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*. Os voláteis não apresentaram efeito indutor sobre os esporos, porém quando fracionados e colocados em contato direto com as estruturas, as frações botão apresentaram uma maior atividade indutora quando comparada a testemunha. Nenhum tratamento alterou o crescimento micelial do fungo. A melhor visualização dos esporos nas folhas ocorreu 48 horas após a inoculação. Com base nesses resultados, pode-se concluir que as águas de lavagem estimulam a germinação e formação de apressórios, e apenas os voláteis presentes nas frações botão estimularam a germinação de *C. acutatum*.

Palavras-chave: Águas de lavagem; Nutrientes; Voláteis; Germinação

ABSTRACT

Identification of biologically active substances, produced by citrus Valência (*Citrus sinensis*), involved in the activation of infection structures of *Colletotrichum acutatum*

The Post Bloom Fruit Drop is a limiting disease in citrus production around the world and the symptoms are associated to high rainfall and intense blooming. The fungus is found in a quiescent state in plant organs and under the presence of exogenous nutrients it restarts the infection process. Thus, the objectives of the work were: (i) evaluate the direct effect of washing crude water (WCW) obtained from flowers, flower buds and leaves of Valencia orange trees on the mycelial growth, germination and appressorium formation by *C. acutatum*; ii) evaluate the effect of volatile compounds released by the WCW and the fractions obtained from the washing water from flower and flower buds in the germination and appressorium formation, and (iii) establish a methodology for observing structures of fungal infection in citrus leaves. Two bioassays were carried out to evaluate germination, appressorium formation and mycelial growth in the presence of WCW. The first one was represented by the treatments: control (C), washing water from flowers (F), flowers buds (FB), young leaves (YL), old leaves (OL), and dilution (1:10, 1:100, 1:1000 and 1:10000; v/v) from the flower washing water. The second one included control (C), washing water from flowers (F), flowers buds (FB), young leaves (YL), old leaves (OL) and all of washings autoclaved. The volatiles released by the washing water from flowers and flowers buds were first separated and identified by SPME-GC-MS and then fractions were obtained according to the retention time of each peak found, making up five fractions for each sample. A bioassay for germination and appressorium formation was carried out by using the fractions obtained and placed into direct contact with the spores. To observe the fungal infection structures, leaf discs from citrus plants were inoculated, subject to bleaching and then stained for observation under a microscope. The results obtained by using the WCW samples showed that all treatments stimulated spore germination and appressorium formation by *C. acutatum*. The volatiles did not show any inductive effect on the spores, but when fractionated and placed into direct contact with the fungal structures, the fractions from the flowers buds showed a higher inducing activity when compared to the control. None treatment changed the *in vitro* mycelial growth of the fungus and the best visualization of spores in the leaves occurred 48 hours after inoculation. Based upon on these results, it can be concluded that the crude washing water stimulated germination and appressorium formation, and only the volatiles present in the fraction flowers buds were able to stimulate the germination of *C. acutatum* spores.

Keywords: Washing water, Nutrients, Volatile; Spore germination

1 INTRODUÇÃO

A cultura dos citros (*Citrus* spp.) no Brasil representa mais de 1 milhão de hectares e, desde a década de 80, o país é considerado o maior produtor mundial. Em termos globais, as regiões de clima tropical e subtropical apresentam os pomares com maior produtividade, destacando-se o Brasil, Estados Unidos, México, China e África do Sul, sendo que os estados de São Paulo, no Brasil, e Flórida, nos Estados Unidos, são considerados as duas principais regiões produtoras do mundo. Apesar de serem ótimas regiões para a produção de citros, estas apresentam condições climáticas favoráveis à ocorrência de doenças fúngicas na cultura. A doença conhecida como podridão floral do citros é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, que ao afetar as flores induz a abscisão de frutos jovens, podendo ocasionar perdas na produção em até 100%. Esta doença vem sendo considerada um sério problema na maioria das áreas úmidas onde se produz citros nas Américas (PERES, 2002).

A doença esta relacionada principalmente com a alta precipitação pluviométrica em época de floradas intensas, quando surgem os primeiros sintomas. A presença de inóculo viável seria uma das hipóteses que justificam a ocorrência generalizada da podridão floral em um pomar, podendo estar presente em plantas assintomáticas ou mesmo em ervas 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, ramos e cálices retidos, ou ainda na condição de infecção quiescente. Os mesmos autores relataram também que a presença de nutrientes exógenos, provindos das flores cítricas são capazes de estimular estas estruturas a produzirem de conídios secundários.

Zulfiqar et al. (1996) relataram que o inóculo proveniente do micélio quiescente ou mesmo dos apressórios aderidos às folhas foram estimulados ao desenvolvimento pela presença de extrato floral, que induziu o patógeno a produzir conídios. Pouco se sabe sobre quais substâncias estariam presentes neste extrato e qual seria a substância ou substâncias específica(s) atuante(s) na quebra da condição quiescente de *C. acutatum*. Há na literatura relatos sobre lixiviados de

plantas capazes de induzir a germinação e formação de apressórios por fungos. Nesse sentido, no presente estudo onde, procurou-se identificar substâncias envolvidas na ativação das estruturas de infecção quiescentes ou não do patógeno.

Os objetivos do trabalho foram: (i) avaliar o efeito das águas de lavagem bruta (ALB) obtidas a partir de flores, botões e folhas de laranjeira Valência sobre o crescimento micelial, germinação e formação de esporos por *C. acutatum*; (ii) avaliar o efeito dos compostos voláteis liberados pelas ALB e as frações produzidas pelas águas de lavagem de flores e botões sobre a germinação e formação de apressórios; (iii) estabelecer uma metodologia para observação de estruturas de infecção em folhas de citros

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Ocorrência e importância da Podridão Floral dos Citros no Brasil e no mundo

A Podridão Floral dos Citros (PFC), também conhecida como Queda Prematura de Frutos Jovens foi reportada pela primeira vez na América Central, mais precisamente em Belize, em meados da década de 50, embora a causa da doença só tenha sido esclarecida no final da década de 1970 (FAGAM, 1979).

Vários são os países do continente americano onde a doença já foi relatada, entre eles Argentina, Brasil, Colômbia, México, Panamá, República Dominicana, Trindade e Estados Unidos (FEICHTENBERGER, 1994). Além desses países, a doença também ocorre na Costa Rica e Jamaica (TIMMER et al., 1994).

Nos Estados Unidos, a PFC foi observada pela primeira vez em 1983, no sul da Flórida, afetando plantas de lima ácida Tahiti, mantendo-se restrita a essa região até 1987 (MacMILLAN; TIMMER, 1989). A partir daquele ano, foi encontrada em pomares de laranja doce na região sudoeste do estado da Flórida e na primavera do ano seguinte, em muitos pomares de laranja de umbigo e Valência (TIMMER et al., 1994).

O primeiro relato da PFC no Brasil foi efetuado por Porto et al. (1979) no estado do Rio Grande do Sul, danificando plantas de lima ácida Thaiti. No mesmo período, a doença também foi constatada no estado de São Paulo, nos municípios de Limeira, Araraquara, Taquaritinga e Cândido Rodrigues, ocasionando perdas relevantes na safra 1977/1978 (GOES; KIMATI, 1997b). Nos anos de 1990/1991, foram verificadas perdas de produção em pomares localizados nas regiões de Limeira, Campinas, Mogi Guaçu, Araras e Pirassununga, enquanto que nas safras de 1992/93 e 1993/94 a enfermidade afetou de forma severa as principais regiões produtoras paulistas (FEICHTENBERGER, 1994; PRATES et al., 1995). Na região de Itapetininga, o patógeno provocou perdas significativas na safra 96/97, resultando em redução de até 80% da produção.

Atualmente, a doença ocorre em todos os municípios produtores de citros do estado de São Paulo e também nos demais estados onde há a cultura, como Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Sergipe, Bahia, Goiás, Pará e Amazonas (GALLI et al. 2002), causando perdas variáveis na produção, principalmente quando o florescimento da planta coincide com períodos de prolongada pluviosidade e alta umidade relativa do ar (GOES; KIMATI, 1997a).

Segundo CONAB (2009), nos últimos 4 anos, a incidência da doença vem causando vultuosos prejuízos aos citricultores, da ordem de 20 a 30 milhões de dólares/ano. No sul do cinturão citrícola paulista, a estabilidade da terceira florada, ocorrida em janeiro de 2009, teria sido limitada pela incidência da PFC nesta região.

2.1.2 Etiologia

O primeiro relato do agente causal da PFC foi feita por Fagam (1979), o qual o descreveu como sendo uma estirpe virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Em 1981, Rosseti et al. relataram a existência de raças patogênicas e não patogênicas de isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de flores e frutos afetados, sendo que estas raças apresentavam características diferentes quanto a morfologia, coloração das colônias, crescimento micelial e patogenicidade. Essa alta variabilidade dos isolados de *C. gloeosporioides* e sua aparente dissociação entre presença de inóculo nas folhas e a incidência dos sintomas em flores, despertou maior interesse aos pesquisadores que passaram a investigar com maiores detalhes o agente causal da PFC (AGOSTINI et al., 1992; PORTO, 1993).

Em um minucioso estudo sobre isolados de *C. gloeosporioides* retirados de plantas cítricas, Agostini et al. (1992) identificaram três estirpes com características morfológicas e patogênicas distintas que foram denominadas de FGG (“fast-growing gray”), SGO (“slow-growing orange”), KLA (“Key lime anthracnose”). A linhagem FGG apresenta crescimento rápido em meio de cultura e coloração acinzentada, conídios grandes com as extremidades arredondadas e, geralmente, está presente na forma de infecção latente, causando infecções em ramos, folhas e em frutos tanto em pré como em pós-colheita. A linhagem SGO apresenta crescimento lento em meio de cultura, colônias com pigmentação alaranjada, conídios menores com as extremidades

pontiagudas e apressórios clavados, enquanto a linhagem KLA, associada à antracnose do limão 'Galego', apresenta características semelhantes à SGO, porém com apressórios menores e arredondados e conídios de dimensões intermediárias.

Em 1992, Liyanage et al., através da utilização de marcadores moleculares, verificaram características genéticas distintas entre as duas populações de *C. gloeosporioides* presentes em laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e lima ácida 'Tahiti' (*C. aurantifolia* Osbeck). Gantotti e Davis (1991) observaram diferenças entre diversas enzimas presentes nas raças SGO e FGG, assim como Liyanage et al. (1993) observaram diferenças na enzima cutinase destas mesmas raças.

Para facilitar a distinção entre as estirpes SGO e KLA da linhagem FGG, devido a dificuldade para se distinguir as mesmas, Agostini e Timmer (1992) desenvolveram um meio semi-seletivo. Para isso, foi adicionado ao meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) hidróxido de cobre e estreptomicina, seguido de incubação das colônias a 18° C por quatro dias, e mais um dia a 27° C. Os autores puderam verificar um maior desenvolvimento de colônias alaranjadas com esporulação abundante pela linhagem SGO, facilitando assim a separação das duas linhagens.

Para verificar a patogenicidade, Brown et al. (1996) inoculou os isolados em diferentes plantas cítricas. Desta forma, os autores constataram que os isolados de SGO infectavam somente flores de laranja doce, os isolados de KLA afetavam tanto flores de laranja doce como folhas de limão 'Galego', enquanto que os isolados de FGG não causavam infecção em nenhum dos hospedeiros. Através de PCR com "primers" específicos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, e através do sequenciamento da região ITS do rDNA, os isolados SGO e KLA, causadores da podridão floral, foram então reclassificados como *C. acutatum*, e os isolados FGG como *C. gloeosporioides*.

Em estudo com isolados de *Colletotrichum* spp. de citros provenientes de várias regiões do Brasil, Goes e Kimati (1997a) verificaram a existência das mesmas linhagens descritas por Agostini et al. (1992), constatando que o formato predominante dos apressórios constituiu-se em estrutura viável para a distinção dos três grupos. Em relação às características patogênicas, Goes e Kimati (1997b) confirmaram que apenas os isolados SGO e KLA causaram sintomas de podridão floral quando inoculados em flores de laranjeira 'Pêra'.

2.1.3 Sintomatologia

Os sintomas da PFC aparecem como pequenas manchas de tonalidades marrom ou róseo-alaranjada, que posteriormente se tornam de coloração salmão devido à formação de acévulos na superfície das pétalas (TIMMER et al., 1994). Essas lesões podem se ampliar rapidamente cobrindo a maioria do tecido floral num período de 24 horas. As pétalas tornam-se totalmente necrosadas e secas, permanecendo firmemente aderidas ao disco basal, ao contrário das pétalas florais sadias, que caem rapidamente (FAGAN, 1979). Geralmente, as lesões aparecem após a abertura dos botões florais, pois é nesse estágio que eles são mais suscetíveis ao ataque do fungo. Já em ataques severos, aliados as condições ambientais favoráveis, a doença pode ocorrer antes da abertura das flores, provocando a completa podridão dos botões florais (FEICHTENBERGER, 1994).

A infecção pelo fungo tem como resultado o amarelecimento de frutos recém formados, que se destacam da base do ovário e caem, ficando os cálices aderidos aos ramos da planta, estrutura comumente conhecida como “estrela” ou “estrelinha”. Comparada à queda fisiológica dos frutos jovens, há na base do pedúnculo, uma abscisão que deixa apenas uma pequena cicatriz no ramo (FEICHTENBERGER, 1994). As “estrelinhas” podem permanecer retidas nos ramos por até 18 meses, sendo que estes, quando ficam com muitos cálices do ano anterior, comportam-se como se estivessem suportando frutos. As folhas ao redor da inflorescência doente são frequentemente pequenas, deformadas, com nervuras grossas, dando aos ramos uma aparência de roseta (TIMMER et al., 1994; TIMMER E BROWN, 2000).

2.1.4 Epidemiologia

Epidemias de PFC são esporádicas na maior parte das áreas citrícolas e, na maioria das vezes, o aparecimento da doença em áreas onde ela ainda não havia sido relatada é repentino, causando perdas próximas a 100% (TIMMER et al., 1994).

A doença PFC esta associada à alta pluviosidade. Quanto mais distribuídas forem as chuvas durante a floração, maior a incidência da doença; as chuvas com ventos carregam as gotas de água juntamente com os conídios, aumentando assim a

dispersão. Outros fatores ambientais que também são importantes para o desenvolvimento da doença são o orvalho e a neblina, que nestes casos, resultam em infecção localizada de flores, a partir de folhas ou outras flores infectadas, aumentando assim a disponibilidade de inóculo. Porém, mesmo com extensos períodos de molhamento, sem a força da chuva, as infecções ficam geralmente localizadas (AGOSTINI et al., 1993).

Outro fator importante que deve ser mencionado são as variedades que florescem mais de uma vez por ano, que favorecem a ocorrência da doença. As perdas são geralmente mais severas em regiões tropicais e em variedades com múltiplas floradas. No Brasil, a severidade da doença ocorre principalmente em plantas de limões verdadeiros, limas ácidas ('Tahiti' e 'Galego') e a laranja 'Pêra', que são variedades que apresentam vários surtos de floração, pois as infecções provocadas pelo fungo em floradas precoces contribuem para um aumento exponencial do inóculo que virá a atacar as floradas principais (TIMMER et al., 1994; FEICHTENBERGER, 1991), principalmente quando o período de florescimento é prolongado (PERES, 2002).

Quanto à temperatura, verifica-se que esta não é tão importante quanto às precipitações para o desenvolvimento da doença. A faixa ótima de temperatura para o crescimento de *C. acutatum in vitro* está entre 23 e 27 °C (AGOSTINI et al., 1992; PERES, 1998), porém, o fungo desenvolve-se bem mesmo em temperaturas abaixo de 15 °C. Apesar das baixas temperaturas reduzirem o desenvolvimento da doença em condições de campo, estas reduzem também o desenvolvimento da florada, podendo prolongar o período em que as flores estão suscetíveis às infecções (TIMMER, 1993; TIMMER et al., 1994).

No Estado de São Paulo, as epidemias são freqüentes e podem causar perdas em quase todos os anos (PERES et al., 2002). Na Flórida, a doença pode causar sérias epidemias em alguns anos e praticamente nenhuma perda em outros anos, enquanto que em áreas de clima tropical úmido, como Belize, sul do México e Costa Rica, a doença chega a ser um fator limitante para a produção dos citros (FAGAN, 1979; OROZCO SANTOS E GONZÁLES GARZA, 1986; TIMMER E BROWN, 2000; PERES et al., 2002).

2.1.5 Ciclo de vida e sobrevivência de *Colletotrichum acutatum*

O ciclo de vida de *C. acutatum* dá-se com a formação abundante de conídios nas superfícies das pétalas infectadas em estruturas denominadas de acérvulos. Os conídios formados são dispersos pelos respingos de chuva para outras flores durante o período de floração causando infecção nas mesmas (PERES et al., 2005).

A sobrevivência de *C. acutatum* se apresenta de forma bem diversificada. Dentre essas, pode-se mencionar a sobrevivência em tecidos vivos das plantas (AGOSTINI et al., 1992; AGOSTINI E TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996; ADASKAVEG E FÖRSTER, 2000; LEANDRO et al., 2001; DeMARSAY E OUDEMANS, 2003; LEANDRO et al., 2003a; LEANDRO et al., 2003b; DeMARSAY E OUDEMANS, 2004), em hospedeiros alternativos (FREEMAN et al., 2000; FREEMAN et al., 2001; HOROWITZ et al., 2002) e no ambiente (EASTBURN E GUBLER, 1990; NORMAN E STRANDBERG, 1997; UREÑA-PADILLA et al., 2001; FREEMAN et al., 2002).

No caso da PFC, a sobrevivência do patógeno dá-se por meio de apressórios formados na superfície de folhas, ramos e cálices retidos. Desta forma, *C. acutaum* comporta-se em citros como necrotrófico durante o curto período de florescimento, no entanto, por muitos anos, o fungo pode viver biotroficamente na forma de apressórios, como infecções quiescentes em tecidos vegetais (AGOSTINI E TIMMER, 1994; ZULFIQAR et al., 1996; PERES et al., 2005). Com o surgimento de novas flores, em condições de prolongado molhamento e presença de nutrientes encontrados em pétalas, o apressório germina e emite uma hifa sobre a cutícula da folha, dando origem aos primeiros conídios, sem a formação de acérvulo (TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Colletotrichum acutatum*. a=apressório; c=conídio; cs=conídio secundário (Adaptado de Peres et al., 2005)

2.1.6 Controle

A PFC é uma doença de difícil controle. Todas as práticas que contribuem para antecipar o florescimento das plantas devem merecer especial atenção. A irrigação, o uso de hormônios e a utilização de porta-enxertos que induzem florescimento precoce podem ser alternativas para evitar a florada no período chuvoso (PERES, 2002).

O controle químico tem sido a opção mais utilizada no Estado de São Paulo no combate à podridão floral. As pulverizações com fungicidas visam proteger as flores durante o estágio em que elas são suscetíveis ao fungo. O número de aplicações pode variar em função das condições climáticas e da uniformidade e duração do período de florescimento das plantas. Segundo Roberto e Borges (2001), a época ideal para a aplicação de fungicidas é o estado intermediário em que a flor se encontra entre botões fechados brancos, no início do desenvolvimento das pétalas ou quando do seu tamanho final.

Um modelo de previsão para determinar a possibilidade de ocorrência da doença e auxiliar na aplicação de fungicidas foi desenvolvido na Flórida (TIMMER E ZITKO,

1993). O modelo baseia-se, originalmente, no número de flores com sintomas por árvores e na quantidade de chuva durante os últimos cinco dias. Posteriormente, este modelo foi modificado para incluir a quantidade de horas de molhamento foliar após a ocorrência de chuvas (TIMMER E BROWN, 2000; TIMMER et al., 2002). PERES et al. (2002) também desenvolveram um modelo de previsão para controle da podridão floral nas condições de Itapetininga/SP, Brasil, visando, essencialmente, a quantidade de inóculo disponível no pomar.

Atualmente, os fungicidas registrados para o controle de *C. acutatum* são os pertencentes aos grupos químicos dos fungicidas benzimidazóis (carbendazim e tiofanato metílico), triazóis (difenoconazole e tebuconazole), dicarboximida (folpet) e misturas formuladas (estrobilurinas + triazol; oxazolidinadiona + ditiocarbamato) (BRASIL, 2010).

2.1.7 Ativação de estruturas de infecção por nutrientes exógenos

Vários fatores de natureza biótica ou abiótica podem interferir na interação planta-patógeno. Entre eles, estão a temperatura, a umidade, a aeração, estrutura e nutrição do solo (AGRIOS, 2005). Segundo Amorim (1995), o movimento de zoósporos, bactérias e nematóides fitopatogênicos na solução do solo não ocorre de maneira casual. De modo geral, este movimento é orientado em direção às raízes das plantas, graças à liberação de exsudatos por estas últimas. No caso de fitopatógenos habitantes da superfície das folhas, fluidos de gutação com elevadas concentrações de aminoácidos e carboidratos são atrativos a bactérias e fungos.

A infecção é um processo multicomponente que inclui a germinação dos esporos, formação de apressórios, a penetração e a colonização. Cada fase é distinguida por sua morfologia, sensibilidade a fatores ambientais, ou ambos (AGRIOS, 2005). A germinação de esporos é influenciada por vários fatores, incluindo nutrientes (YADAV, 1981). Os apressórios são formados pela maioria dos fungos, e o estímulo a sua formação se dá pelo contato com a superfície do hospedeiro (AGRIOS, 2005). Nos processos seguintes ocorre o envolvimento de um arsenal enzimático, para que o patógeno possa vencer as barreiras impostas pelo hospedeiro, iniciando a penetração e

colonização do tecido vegetal (PASCHOLATI, 1995). Estes processos requerem pelo patógeno, uma grande quantidade de energia (BLAKEMAN 1971), sendo que esta pode ser derivada de nutrientes exógenos na forma de lixiviados presentes nas superfícies foliares (TUKEY, 1971). Estes lixiviados podem apresentar em sua composição minerais, açúcares, aminoácidos, hormônios e vitaminas (BLAKEMAN, 1975).

Por exemplo, uma das fases mais críticas do ciclo de vida das ferrugens ocorre durante a formação dos tubos germinativos dos esporos sobre a superfície das folhas do hospedeiro (PARKER; BLAKEMAN, 1984). Alguns fungos fitopatogênicos, como o *Botrytis cinerea* Pers. necessitam da presença de nutrientes exógenos para a germinação de seus esporos e, portanto, a severidade da doença esta relacionada com os nutrientes disponíveis em lixiviados foliares (BRODIE; BLAKEMAN, 1976).

O fungo *Didymella bryoniae* Rehm, causador da doença conhecida por crestamento gomoso em Curcubitaceas, demonstrou um maior desenvolvimento de lesões nas folhas de plantas de pepino, e uma maior porcentagem de germinação *in vitro* na presença de lixiviados foliares das mesmas plantas. Neste trabalho o autor não identificou quais as possíveis substâncias estimulantes presentes nos lixiviados foliares (SVEDELIUS, 1990).

O estímulo para a germinação de esporos por nutrientes exógenos, não fica restrito somente a lixiviados foliares, pois, lixiviados de flores e frutos também podem conter substâncias estimulantes. Em frutos de maçã, os compostos ácido *p*-coumarínico, ácido clorogênico e ácido caféico foram identificados em lixiviados e possuem a capacidade de estimular a germinação e a formação de apressórios do fungo *Diaporthe pernicioso* (BROWN; SWINBURNE, 1978).

Outro fator que pode ser mencionado seria a resistência ou suscetibilidade das plantas a fitopatógenos. Lixiviados de plantas suscetíveis de pimentão foram capazes de estimular a germinação de esporos do fungo *Alternaria solani*, enquanto que os das plantas resistentes inibiram a germinação dos esporos (TYAGI; CHAUHAN, 1982).

Para o fungo *C. acutatum*, causador da PFC, como já comentado, as epidemias são associadas à alta pluviosidade durante o período de floração (AGOSTINI et al., 1993). Presume-se que, na natureza, os lixiviados das pétalas das flores de citros produzidos durante as chuvas são capazes de estimular a germinação de apressórios

quiescentes presentes na superfície de folhas, galhos, e cálices persistentes, e que os conídios secundários produzidos a partir desses apressórios seriam capazes de infectar novas flores (PERES et al., 2005). Porém, pouco se sabe sobre quais seriam as substâncias presentes nestes lixiviados capazes de quebrar a condição quiescente do fungo.

Em um estudo do comportamento quiescente por *C. acutatum* em folhas de citros, Zulfiqar et al. (1996) puderam demonstrar que a aspersão de extratos florais em diferentes diluições, obtidos a partir da maceração de flores cítricas, fez com que estruturas quiescentes de *C. acutatum* presentes sobre folhas assintomáticas de citros formassem novos conídios e novas hifas sobre a superfície, quando comparado somente a aspersão com água.

Em morangueiro, Leandro et al. (2003b) demonstraram que a aplicação de extratos produzidos a partir de flores de morango eram capazes de quebrar a condição quiescente de estruturas de sobrevivência de *C. acutatum* presentes em folhas assintomáticas do morangueiro. Porém, nestes dois trabalhos mencionados, os autores aplicaram sobre os conídios extratos de flores obtidos através de maceração do tecido, e não lixiviados produzidos apenas pela lavagem das flores.

2.1.8 Compostos voláteis produzidos por plantas

Os compostos voláteis são produzidos pelas plantas através do seu metabolismo secundário, os quais se apresentam na forma de gases ou possuem alta pressão de vapor, e em condições normais são liberados da célula (TARKKA; PIECHULLA, 2007). A maioria dos compostos possui grupos estruturalmente diferentes, porém com propriedades físicas semelhantes. São todos hidrocarbonetos, mas também podem conter oxigênio, nitrogênio e enxofre em diferentes grupos reativos, como hidroxila (OH), carbonila (C=O), carboxila (COOR), aminas (NR₂), sulfidrilas (SH), entre outros. Compostos orgânicos voláteis formados por cadeias curtas de carbonos possuem grande solubilidade em água. À medida que aumenta o número de carbonos na molécula diminui a solubilidade em água e aumenta a solubilidade em solventes orgânicos. Essa solubilidade em água é importante, pois pode afetar a interação dos

compostos químicos com outros propágulos biológicos, como por exemplo, esporos de diversas espécies de fungos (FRENCH, 1985; FRENCH, 1992).

São vários os relatos na literatura de substâncias voláteis produzidas por plantas capazes de induzir e/ou inibir a germinação de esporos e o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Porém, os mecanismos que governam as etapas que vão desde ao reconhecimento do volátil pelo microrganismo até a expressão da resposta não foram claramente explicados. O fenômeno de estímulo e/ou inibição do crescimento micelial e germinação de esporos fúngicos por compostos presentes na fase gasosa parece ser de caráter multifuncional, ou seja, depende de uma série de eventos somados. Mas a complexidade destas relações entre microrganismos patogênicos e plantas tem sido meramente especulatórias (FRENCH, 1992).

O primeiro fator a ser considerado para o entendimento da vulnerabilidade de estruturas fúngicas aos compostos voláteis é a relação destas estruturas com o meio onde estão inseridos. Geralmente, os fungos possuem cada uma de suas células vegetativas expostas ao meio ambiente onde vivem desenvolvendo parte do micélio e porções consideráveis dos órgãos reprodutivos no ar (FRIES, 1973). Estas características determinam uma relação superfície/volume bastante alta. A interação via aérea tem se mostrado bastante eficiente, visto que muitos compostos lipofílicos liberados diretamente no ar podem acumular-se mais rapidamente na membrana plasmática de uma célula receptora do que se estivesse na fase líquida (STOTZKY; SCHENCK; PAPAIVAS, 1976).

Várias são as substâncias voláteis que foram isoladas e identificadas como indutoras de germinação de esporos. O nonanal é o exemplo de uma substância volátil sintetizada por diversas plantas e também por fungos capaz de estimular a germinação de estruturas fúngicas. Os urediniósporos de *Puccinia coronata* var. *avenae* e teliósporos de *Ustilago avenae* são estimulados por nonanal produzidos por folhas de aveia (*Avena sativa* L.) (FRENCH et al., 1975a; FRENCH et al., 1975b), assim como os urediniósporos de *P. graminis* e *P. recondita* e os teliósporos de *U. tritici* produzidos em folhas de trigo (*Triticum aestivum* L.) (FRENCH; GALLIMORE, 1971, 1972). Em citros, além da substância volátil nonanal, foi relatada a presença do volátil citral

exibindo efeito indutor em conidióforos de *Penicillium digitatum* e *P. italicum* (FRENCH; SCHIMITT, 1980).

Segundo Eckert e Ratnayake (1994), a exposição de conidióforos de *P. digitatum* a frutos de laranjas com pequenas injúrias, fez com que ocorresse uma maior germinação dos esporos em comparação à testemunha. Neste trabalho, as substâncias foram isoladas a partir dos frutos, por cromatografia gasosa e identificadas, sendo que testes *in vitro* foram realizados com as substâncias obtidas, puras e em misturas, em diferentes concentrações. Neste caso, os autores concluíram que ao aumentar a concentração dos compostos, os esporos expostos a estes voláteis exibiam menor porcentagem de germinação, e concluíram que o estímulo só ocorria em baixas concentrações.

Coley-Smith e King (1969) estudaram a interação entre os voláteis sulfuretos n-propil e alil, produzidos por cebola e dentes de alho respectivamente, com escleródios de *Sclerotium cepivorum*. Os resultados mostraram um efeito positivo na germinação dos escleródios. Em outro trabalho, King e Coley-Smith (1969) adicionaram ao solo, que continha escleródios de *S. cepivorum*, as substâncias sintéticas alilcisteína e n-propilcisteína e também puderam comprovar a estimulação da germinação daqueles.

A maioria das perdas em pós-colheita por frutos de damascos são ocasionadas pelo fungo *Monilinia fructicola*. Este permanece em frutos verdes em estado quiescente, e a doença se manifesta na medida em os frutos ficam maduros. A quebra de dormência do estado quiescente do fungo esta ligada aos compostos voláteis produzidos pelos frutos de damascos conforme estes amadurecem. Este fato foi comprovado por Cruickshank e Wade (1994), que relataram que ao expor os esporos de *M. fructicola* aos compostos voláteis produzidos pelos frutos de damascos, tiveram como resultado uma maior germinação dos esporos.

Em vista do exposto acima, este trabalho visa isolar e identificar compostos capazes de induzir a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*.

2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica do Departamento de Fitopatologia e Nematologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, em Piracicaba, SP, e na Clínica Fitossanitária do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.2.1 Cultivo do fungo e obtenção dos conídios

Para a obtenção do fungo *C. acutatum* foram realizados isolamentos a partir de pétalas e botões florais de plantas de citros sintomáticas provindos da Região do Município de Taquarituba-SP. Foram obtidos fragmentos do tecido lesionado, procedendo-se a assepsia em álcool etílico 70% durante 30 segundos, e hipoclorito de sódio 1,5% por 60 segundos. Os fragmentos foram lavados em água destilada esterilizada e colocados em papel-filtro para retirada do excesso de umidade. A seguir, os segmentos de tecido foram colocados na superfície de 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 horas.

Os testes que confirmaram se os isolados obtidos das plantas cítricas eram de *C. acutatum* foram realizados no Centro de Diagnósticos de Pragas e Doenças de Citros do Fundo de Defesa da Citricultura, (FUNDECITRUS, Araraquara, SP), onde foram feitos testes de PCR, utilizando-se os primers Calnt2 e CgInt, de acordo com a metodologia adotada por Freeman et. al. (2001).

Os isolados obtidos foram mantidos de duas formas diferentes, sendo a primeira representada pelo método do óleo mineral, onde discos de micélio foram repicados para tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado e incubados até se obter a total colonização do meio, inclusive esporulação. Após esse procedimento, as colônias foram recobertas com óleo mineral esterilizado e armazenadas a temperatura ambiente. O segundo método utilizado para o armazenamento dos isolados empregou tiras de papel de filtro. Este método baseou-se na utilização de tiras esterilizadas de papel de filtro,

espalhadas sobre a superfície de placas de Petri contendo meio BDA e um disco de micélio do fungo no centro. Após a colonização das tiras de papel pelo fungo, estas foram transferidas para tubos tipo Eppendorf, contendo em seu interior sílica gel, sendo os mesmos armazenados a 4 °C (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2007).

2.2.2 Obtenção da água de lavagem

Para obtenção da água de lavagem, foram utilizados ramos frescos de mudas de laranjeira Valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), com aproximadamente dois anos de idade. Estes ramos continham flores já abertas, botões florais em vários estádios e folhas que foram classificadas de acordo com a posição nos ramos: folhas novas, todas as folhas que se encontravam junto ao ramo da inflorescência e folhas velhas as demais. As flores, botões e folhas foram destacados dos ramos com auxílio de uma tesoura e separados (Figura 2).

Figura 2 – Obtenção do material vegetal: a) Flores; b) Botões; c) Folhas Novas; d) Folhas Velhas. Em e) aspecto do material final coletado

Logo após, o material vegetal foi pesado em balança digital, adotando-se a proporção 1:5 (material vegetal:água; m/v). Para se realizar a lavagem, utilizou-se um funil de porcelana, contendo em seu interior papel de filtro (gramatura: 8g/cm²) para reter impurezas e como suporte para o funil, utilizou-se um erlenmeyer, onde a água era coletada. O material vegetal foi colocado no interior do funil e lavado com água ultra-

pura (Milli-Q) de forma mais uniforme possível e o processo de lavagem foi repetido por 10 vezes. Após este processo, a água de lavagem foi filtrada em membrana tipo Millipore estéril (0,2 μ m) e o filtrado obtido foi acondicionado em tubos tipo Eppendorf, sendo os mesmos congelados a -4°C para análises futuras (Figura 3).

Figura 3 – Obtenção da água de lavagem do material vegetal

2.2.3 Análises bioquímicas

2.2.3.1 Determinação de carboidratos totais

Os teores de carboidratos totais das amostras, obtidas em 2.2.2, foram determinados pelo método de Dubois et al. (1956). Para tanto, em cada 0,5 mL de amostra, foram adicionados 0,5 mL de fenol (5%) e rapidamente 2,5 mL de ácido sulfúrico. Após 30 minutos de incubação, a temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância a 490 nm, tendo como referência a reação de 0,5 mL de água destilada com 0,5 mL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico. A concentração de carboidratos, expressa em termos de equivalente μg de glicose por mL de amostra (μg carboidrato

mL^{-1}), foi determinada usando-se curva padrão de concentrações de glicose, variando de 0 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.2.3.2 Determinação de açúcares redutores

Para a quantificação de açúcares redutores nas amostras, foi utilizado o método de Miller (1959). Para tanto, foram adicionados em tubos Eppendorf, $125 \mu\text{L}$ das amostras e junto às mesmas $125 \mu\text{L}$ do reagente ADNS. Os mesmos foram levados a banho-maria por 5 minutos, resfriados e adicionados em todos os tudo $1250 \mu\text{L}$ de água destilada. Foi realizada a leitura de absorbância a 540 nm . A concentração de açúcares redutores, expressa em termos de equivalente μg de glicose por mL de amostra (μg carboidrato mL^{-1}), foi determinada usando-se curva padrão de concentrações de glicose, variando de 0 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.2.3.3 Determinação de proteínas totais

O método de Bradford (1976) foi empregado para se quantificar proteínas totais nas preparações obtidas das flores, botões, folhas novas e folhas velhas. Para tanto, foram adicionados a cada $800 \mu\text{L}$ das amostras, $200 \mu\text{L}$ do reagente de Bradford. Após 5 minutos, foi efetuada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas, expressa em termos de equivalente μg de albumina de soro bovino (ASB) por mL de amostra (μg proteína mL^{-1}), foi determinada usando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a $9 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.2.4 Análises cromatográficas

2.2.4.1 Identificação de compostos voláteis liberados pelas águas de lavagem das flores e botões

A identificação foi realizada no Centro de Análise de Prospeção Química (CAPQ) do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, sob supervisão do Prof. Dr. Mário César Guerreiro. As análises cromatográficas foram

realizadas apenas para as águas de lavagem de flores e botões de laranjeira Valência, devido estes materiais possuírem alta quantidade de compostos aromáticos.

Processo de extração: As águas de lavagem de flores e botões obtidas conforme o item 2.2.2, foram acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e levadas ao cromatógrafo a gás para a realização de um pré tratamento por 10 minutos a 60 °C, para a concentração dos analitos. Após esse tempo, foi inserido pelo septo do tudo, um injetor de microfibra SPME (*Solid Phase Microextraction*) revestido de carboxen, onde a fibra foi exposta a fase gasosa por 10 minutos e após esse tempo levada até o cromatógrafo a gás acoplado a espectro de massa (GC-MS) para dessorção dos analitos (tempo de dessorção = 1 min), separação e detecção.

Condições cromatográficas: Foi empregado o cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massas modelo CGMS-2010 plus (Shimadzu), uma coluna capilar EQUITY-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O injetor foi operado no modo “splitless” em todas as corridas cromatográficas e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do injetor foi mantida a 220 °C e a temperatura inicial da coluna foi de 40° C, sendo acrescidos 4 °C a cada minuto até atingir 200 °C. A faixa de massas do MS foi ajustada entre 35 e 350. A identificação das espécies detectadas foi feita através da comparação com a biblioteca de espectros de massas Wiley 8 e FFNSC 1.2.

2.2.4.2 Fracionamento dos compostos voláteis liberados pelas águas de lavagem das flores e botões

Após a identificação dos compostos voláteis presentes nas amostras de flores e botões, as mesmas foram fracionadas de acordo com o tempo de retenção de cada pico. Para tanto, as amostras foram submetidas as mesmas condições citadas no item anterior, porém foi utilizado somente o cromatógrafo a gás – CG. A coluna capilar foi desacoplada do espectro de massa e deixada do lado de fora do cromatógrafo. As coletas foram feitas manualmente através da imersão da coluna dentro de frascos de vidro contendo 500 µL de água ultra pura (Milli-Q), e a cada intervalo de tempo referente as frações, os frascos eram trocados e o processo foi repetido por oito vezes para cada fração (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Intervalos de tempo para a coleta das frações da amostra flor e picos presentes em cada fração, gerados através da análise em cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS)

Fração	Picos	Intervalos de Tempo (min)
I	1 – 6	10,8 – 13,4
II	7 – 12	15,2 – 18,5
III	13 – 16	20,5 – 22
IV	17 – 21	23,3 – 28,3
V	22	30,3 – 30,46

Tabela 2 – Intervalos de tempo para a coleta das frações da amostra botão e picos presentes em cada fração, gerados através da análise em cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS)

Fração	Picos	Intervalos de Tempo (min)
I	1 a 4	15,0 – 18,5
II	5 a 7	21,1 – 22,0
III	8 a 11	27,1 – 28,82
IV	12 a 13	29,18 – 30,36
V	14 a 18	31,3 – 41,8

2.2.5 Bioensaios *in vitro*

2.2.5.1 Preparo da suspensão de esporos de *C. acutatum*

Para a obtenção da suspensão de esporos foram utilizadas colônias puras do patógeno, crescidas em meio BDA, com 7 a 15 dias de idade, que tiveram água ultra pura (Milli-Q) esterilizada adicionada a sua superfície e os esporos foram removidos com o auxílio de uma alça de Drigalski. As suspensões obtidas foram filtradas em gaze e a concentração ajustada para 5×10^4 esporos mL^{-1} (com o auxílio de hemacitômetro) e utilizadas nos bioensaios de germinação de esporos e formação de apressórios.

2.2.5.2 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas, com ou sem autoclavagem, sobre a germinação e a formação de apressórios

Foram utilizadas placas de Petri de poliestireno, com 9 cm de diâmetro. Em cada placa, foram adicionadas quatro alíquotas contendo 20 μL da suspensão de esporos juntamente com 20 μL da água de lavagem dos diferentes tratamentos. As placas foram

acondicionadas em potes plásticos e colocadas em incubadora tipo BOD, a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 6 horas. Após 12 horas, foi adicionada em cada gota uma alíquota de 20 µL de lactoglicerol para cessar a germinação. Foram realizados dois ensaios, sendo que o primeiro envolveu, além dos quatro tratamentos obtidos, a diluição da água de lavagem das flores. No segundo ensaio, os tratamentos foram submetidos a autoclavagem por 20 minutos a 121 °C. A testemunha de ambos os ensaios, constou apenas de água ultra-pura (Mili-Q) autoclavada (Tabela 3).

Tabela 3 – Tratamentos com água de lavagem (AL), obtida de órgãos de laranjeiras, utilizados no primeiro e segundo testes *in vitro*, envolvendo a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*

Tratamentos	Primeiro Teste	Segundo Teste
1	AL Flores	AL Flores
2	AL Botões	AL Botões
3	AL Folhas Novas	AL Folhas Novas
4	AL Folhas Velhas	AL Folhas Velhas
5	AL Flores 1:10 (m/v)	AL Flores autoclavada
6	AL Flores 1:100 (m/v)	AL Botões autoclavada
7	AL Flores 1:1000 (m/v)	AL Folhas Novas autoclavada
8	AL Flores 1:10000 (m/v)	AL Folhas Velhas autoclavada
9	Testemunha	Testemunha

A avaliação foi realizada através da observação do material ao microscópio ótico, com aumento de 400 vezes. Contou-se 100 esporos por repetição, totalizando-se 800 esporos por tratamento. Foram considerados como esporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo igual ou maior do que o tamanho do esporo. Em cada tratamento utilizou-se quatro repetições.

2.2.5.3 Efeito de substâncias voláteis liberadas pela água de lavagem de flores e botões de laranjeira, sobre a germinação e a formação de apressórios

Foram utilizadas placas de poliestireno (60 mL de volume) disponíveis comercialmente e divididas ao meio. Em um dos lados da placa, foram depositadas três alíquotas de 20 µL da suspensão de esporos de *C. acutatum* e do outro lado um chumaço de algodão, onde foi adicionado 800 µL de cada preparação. Os controles consistiram de placas com um chumaço de algodão com 800 µL de água ultra-pura (Milli-Q) esterilizada, somente o chumaço de algodão ou sem o chumaço de algodão. As placas foram lacradas com filme de PVC (poli cloreto de vinila), acondicionadas em pote de plástico e mantidas em BOD a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas, foi adicionada em cada gota uma alíquota de 20 µL de lactoglicerol para cessar a germinação. A avaliação foi realizada através da observação do material ao microscópio ótico, com aumento de 400 vezes. Contou-se 100 esporos por repetição, totalizando-se 600 esporos por tratamento. Foram considerados como esporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo igual ou maior que o tamanho do esporo. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento.

2.2.5.4 Efeito das frações voláteis, obtidas das águas de lavagem de flores e botões, sobre a germinação e formação de apressórios

Para isso, foram utilizadas placas de Petri de poliestireno, com 9 cm de diâmetro. Em cada placa, foram adicionadas quatro alíquotas contendo 20 µL da suspensão de esporos juntamente com 20 µL de cada fração obtida da água de lavagem de flores, botões e folhas de laranjeira Valência. As placas foram acondicionadas em potes plásticos e colocadas em incubadora tipo BOD, a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 6 horas. Após 12 horas, foi adicionada em cada gota uma alíquota de 20 µL de lactoglicerol para cessar a germinação. A avaliação foi realizada através da observação ao microscópio ótico com aumento de 400 vezes. Contou-se 100 esporos por repetição, totalizando-se 800 esporos por tratamento. Foram considerados como esporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo igual ou maior que o tamanho do esporo. Em cada tratamento utilizou-se 4 repetições.

2.2.5.5 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*

Foram utilizadas placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo 25 mL de meio BDA, sendo adicionadas as mesmas alíquotas de 500 µL das preparações, filtradas através do sistema Millipore estéril (filtro de 0,2 µm) e espalhadas com o auxílio de alça de Drigalski. Aguardou-se 36 horas para que o meio BDA absorvesse as preparações, sendo que um disco de micélio de cinco mm de diâmetro foi colocado no centro das placas, que foram mantidas a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Foram realizados dois ensaios, sendo que no primeiro, além dos quatro tratamentos já mencionados na Tabela 4, efetuou-se também a diluição da água de lavagem das flores. No segundo ensaio, as preparações foram submetidas a autoclavagem por 20 minutos a 121 °C. A testemunha de ambos os ensaios, constou apenas de água ultra-pura (Mili-Q) autoclavada (Tabela 4).

Tabela 4 – Tratamentos com água de lavagem (AL), obtida de órgãos de laranjeiras, utilizados no primeiro e segundo testes *in vitro*, envolvendo o crescimento micelial de *C. acutatum*

Tratamentos	Primeiro Teste	Segundo Teste
1	AL Flores	AL Flores
2	AL Botões	AL Botões
3	AL Folhas Novas	AL Folhas Novas
4	AL Folhas Velhas	AL Folhas Velhas
5	AL Flores 1:10 (m/v)	AL Flores autoclavada
6	AL Flores 1:100 (m/v)	AL Botões autoclavada
7	AL Flores 1:1000 (m/v)	AL Folhas Novas autoclavada
8	AL Flores 1:10000 (m/v)	AL Folhas Velhas autoclavada
9	Testemunha	Testemunha

A avaliação do crescimento do micélio foi feita entre duas medidas diametralmente opostas até que uma das colônias atingisse o bordo. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo calculado o “Índice de Velocidade de Crescimento micelial” (IVCM), segundo Maguire (1962), dado pela fórmula:

$$IVCM = [\sum (D - D_a)] / N, \text{ onde}$$

D – diâmetro da colônia; D_a – diâmetro anterior da colônia; N – número total de leituras

2.2.6 Estabelecimento de metodologia para observação de estruturas de infecção produzidas por *C. acutatum*

2.2.6.1 Preparação do material foliar e inoculação

Foram utilizadas folhas de laranjeira Valência, com aproximadamente dois anos de idade, provindas de casa de vegetação. Nas folhas foi realizada assepsia, fazendo-se a imersão das mesmas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 60 segundos,

seguidos de lavagem em água destilada. As folhas foram secas em papel toalha e delas retirados discos foliares de 0,5 cm. Estes discos foram acondicionados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo em seu interior, papel filtro umedecido. Sobre cada disco foliar foi depositada uma alíquota de 10 µL da suspensão de esporos de *C. acutatum*, calibrada para 5×10^4 esporos mL⁻¹. As placas foram mantidas em incubadora tipo BOD, a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

2.2.6.2 Clareamento do tecido foliar

O método de clareamento de tecido foliar seguiu a metodologia de Chagas e Tokeshi (1995), modificado para citros. Após 24 e 48 horas, os discos foliares foram depositados sobre lâminas de microscopia e as mesmas foram acondicionadas em uma cuba de vidro. Para se evitar o contato das lâminas de microscopia com as substâncias químicas, foram colocados no fundo da cuba, três separadores de isopor, com 0,5 cm x 0,5 cm x 11,00 cm, dispostos paralelamente e distanciados 5,0 cm entre si. Sobre eles, em sentido transversal, foram colocadas de cada lado, três lâminas de microscopia, contendo em cada uma, três discos foliares. Sobre essas lâminas foram colocados novos separadores, no mesmo sentido e posição dos primeiros e sobre estes, mas três lâminas, no mesmo sentido das três primeiras, repetindo-se a operação, conforme o número de discos (Figura 4). Logo após a montagem, os discos foram expostos por um período de 24 horas a uma mistura de hipoclorito de sódio comercial e ácido sulfúrico p.a. em uma proporção de 3:2 (v/v), respectivamente. Inicialmente, era colocado o hipoclorito no fundo do recipiente, sendo a seguir adicionado o ácido, o que causava a liberação de material volátil, o qual efetuava a descoloração do tecido.

Figura 4 – Disposição dos separadores de isopor, lâminas e discos foliares dentro da cuba de vidro

2.2.6.3 Coloração do tecido foliar para observação sob microscópio óptico

Para a observação das estruturas de germinação de *C. acutatum*, procedeu-se segundo a metodologia de Wells e Fidalgo (1964). Após o processo de clareamento dos discos foliares, os mesmos foram reidratados com lactoglicerol (30%), lavados com hidróxido de potássio (3%), coloridos com solução de Fucsina (1%) por 3 minutos, lavados novamente com hidróxido de potássio (3%), coloridos com Vermelho Congo (1%) por 3 minutos e novamente lavados com hidróxido de potássio (3%). Logo após foi colocado sobre cada disco uma lamínula e os mesmos foram levados ao microscópio óptico para a observação das estruturas fúngicas, sob aumento de 400x.

2.3 Resultados

2.3.1 Análises bioquímicas

De acordo com as análises realizadas, pode-se verificar a presença de carboidratos em todas as amostras (Tabela 5). Porém, proteínas foram detectadas somente nas águas de lavagem de flores e botões, enquanto que os açúcares redutores estiveram presentes somente nas amostras de flores. De acordo com os resultados, as concentrações de açúcares e proteínas entre as amostras com autoclavagem e sem autoclavagem apresentaram-se bem próximas (Tabela 5).

Tabela 5 – Conteúdo de açúcares e proteínas nas águas de lavagem de flores, botões, folhas novas e folhas velhas de laranjeira “Valência”, com ou sem autoclavagem

Tratamento	Carboidratos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Açúcares redutores ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<u>Não autoclavado</u>			
Flor	731,3	3,75	3,05
Botão	44,37	1,5	ND*
Folha Nova	8,82	ND	ND
Folha Velha	7,95	ND	ND
<u>Autoclavado</u>			
Flor	779,13	3,82	2,95
Botão	44,58	1,23	ND
Folha Nova	14,91	ND	ND
Folha Velha	9,8	ND	ND

*ND: não detectado

2.3.2 Identificação de compostos voláteis liberados pelas águas de lavagem de flores e botões

2.3.2.1 Voláteis identificados a partir das flores

De acordo com a análise cromatográfica realizada foram obtidos na amostra Flor 22 picos, sendo que 19 picos foram identificados como compostos orgânicos produzidos por plantas e 3 picos não foram identificados (Figura 5 e Tabela 6). A identificação dos compostos voláteis presentes nas águas de lavagem de flores foi feita através do site “Dictionary of Natural Products” (<http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=310262&si=>).

Figura 5 – Cromatograma obtido através da análise em cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) dos compostos voláteis produzidos pelas águas de lavagem de flores de laranjeira Valência

Tabela 6 – Identificação dos compostos voláteis e separação das frações presentes nas águas de lavagem de flores de laranjeira Valência

Picos	Tempo de retenção (min)	% Área	Identificação	Fórmula molecular	Frações
1	10.899	1.76	Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	I
2	12.215	0.54	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	
3	12.634	0.36	Ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	
4	12.753	3.94	Fenilacetaldéido	C ₈ H ₈ O	
5	13.008	1.22	NI*	-	
6	13.343	0.55	Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	
7	15.251	76.40	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	II
8	15.496	0.40	Álcool Fenetil	C ₈ H ₁₀ O	
9	16.311	1.72	Benzenoacetoneitrila	C ₈ H ₇ N	
10	17.709	0.30	NI	-	
11	18.204	0.70	Terpenol	C ₁₀ H ₁₈ O	
12	18.496	0.42	Octanoato	C ₈ H ₁₆ O ₂	
13	20.500	0.31	NI	-	III
14	21.114	1.13	Decanol	C ₁₀ H ₂₂ O	
15	21.763	3.44	Indol	C ₄ H ₄ NH	
16	21.933	0.23	Ácido Nonanóico	C ₉ H ₁₈ O ₂	
17	26.991	0.14	Farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	IV
18	27.120	1.86	Farnaseno β	C ₁₅ H ₂₄	
19	27.661	0.12	Tridecanol	C ₁₃ H ₂₈ O	
20	28.299	0.40	Bergamoteno	C ₁₅ H ₂₄	
21	28.702	0.24	Farnaseno α	C ₁₅ H ₂₄	
22	30.365	3.82	Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	V

NI*: Não Identificado

2.3.2.2 Voláteis identificados a partir dos botões florais

Para a amostra botão, os resultados para a cromatografia gasosa apresentaram 18 picos, sendo que 15 picos foram identificados como sendo compostos produzidos por plantas e 3 não foram identificadas (Figura 6 e Tabela 7). A identificação dos compostos voláteis presentes nas águas de lavagem de botões foi feita através do site “Dictionary of Natural Products” (<http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=310262&si=>).

Figura 6 – Cromatograma obtido através da análise em cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) dos compostos voláteis produzidos pelas águas de lavagem de botões de laranjeira Valência

Tabela 7 – Identificação dos compostos voláteis e separação das frações presentes nas águas de lavagem de botões de laranja Valência

Picos	Tempo de retenção	% Área	Identificação	Fórmula molecular	Frações
1	15.0033	69.32	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	I
2	15.109	0.40	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	
3	18.197	1.00	Terpenol	C ₁₀ H ₁₈ O	
4	18.488	2.37	Octanoato	C ₈ H ₁₆ O ₂	
5	21.104	1.42	Decanol	C ₁₀ H ₂₂ O	II
6	21.746	3.81	Indol	C ₄ H ₄ NH	
7	21.928	1.43	Ácido Nonanóico	C ₉ H ₁₈ O ₂	
8	25.302	1.81	Farnesol	C ₁₅ H ₂₄	III
9	27.118	0.51	Farnaseno β	C ₁₅ H ₂₆ O	
10	28.560	1.34	NI*	-	
11	28.820	0.58	NI	-	
12	29.186	1.75	Laurate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	IV
13	30.352	1.72	Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	
14	31.337	0.04	Ácido propanóico	C ₃ H ₆ O ₂	V
15	31.378	0.14	NI	-	
16	33.474	1.15	Ácido benzenoacético	C ₈ H ₈ O ₂	
17	40.076	1.01	Ácido pentadecanóico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	
18	41.741	10.20	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	

NI*: Não Identificado

Tabela 8 – Comparação dos voláteis presentes nas águas de lavagem de flores e botões de laranjeira Valência identificados por CG-MS

Compostos	Concentração com base na área do pico (%)	
	Flor	Botão
Ácido benzenoacético	-*	1.15
Ácido Nonanóico	0.23	1.43
Ácido palmítico	-	10.20
Ácido pentadecanóico	-	1.01
Ácido propanóico	-	0.04
Álcool Fenetil	0.40	-
Benzenoacetoneitrila	1.72	-
Bergamoteno	0.40	-
Decanol	1.13	1.42
Farnaseno α	0.24	-
Farnaseno β	1.86	0.51
Farnesol	0.14	1.81
Fenilacetaldéido	3.94	-
Indol	3.44	3.81
Laurate	-	1.75
Limoneno	0.54	-
Linalool	76.40	69.32
Mirceno	1.76	-
Nerolidol	3.82	1.72
Nonanal	-	0.40
Ocimene	0.36	-
Octanoato	0.42	2.37
Terpenol	0.70	1.00
Terpineno	0.55	-
Tridecanol	0.12	-

-*: Ausente

2.3.3 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas sobre a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*

As águas de lavagem de flores, botões e folhas de laranjeira Valência apresentaram significativa atividade indutora sobre a germinação de esporos de *C. acutatum*. Já as diluições da água de lavagem das flores ocasionaram uma maior germinação até a diluição 1:100, sendo que nas diluições 1:1.000 e 1:10.000 a porcentagem de germinação foi estatisticamente igual a testemunha (Figura 7).

Figura 7 – Efeito das águas de lavagem, obtidas de órgão de laranjeira “Valência”, sobre a germinação *in vitro* dos esporos de *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

Para a formação de apressórios, o tratamento Flor foi o que apresentou uma maior porcentagem, sendo superior aos demais tratamentos. Por sua vez, os tratamentos botão, folha nova, folha velha e flor 1:10 apresentaram resultados semelhantes, enquanto que flor 1:1.000 e 1:10.000 não diferiram da testemunha (Figura 8).

Figura 8 – Efeito das águas de lavagem, obtidas de órgãos de laranjeira “Valência”, sobre a formação de apressórios *in vitro* por *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

Figura 9 – Fotomicrografias, obtidas através de microscopia óptica, ilustrando o experimento envolvendo a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*. A) Flores; B) Botões; C) Folhas Novas; D) Folhas Velhas; E) Flores 1:10; F) Flores 1:100; G) Flores 1:1000; H) Flores 1:10000; I e J) Testemunhas. Fotos obtidas após 12 horas

2.3.4 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas, com ou sem autoclavagem, sobre a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*

Com base nos resultados apresentados na figura 10, pode-se verificar que a autoclavagem das águas de lavagem não interferiu sobre a atividade indutora de germinação dos esporos de *C. acutatum*.

Figura 10 – Efeito das águas de lavagem obtidas de órgão de laranjeira “Valência”, com (auto) ou sem autoclavagem, sobre a germinação dos esporos de *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

No caso dos apressórios, verificou-se que no tratamento Flor autoclavado ocorreu à maior formação de apressórios, seguido dos tratamentos Botão autoclavado, Folha Nova e Flor. Os demais tratamentos apresentaram resultados semelhantes à testemunha (Figura 11).

Figura 11 – Efeito das águas de lavagem obtidas de órgão de laranjeira “Valência”, com (auto) ou sem autoclavagem, sobre a formação de apressórios por *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

Figura 12 – Fotomicrografias, obtidas através de microscopia óptica, ilustrando o experimento envolvendo a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum* em resposta as preparações autoclavadas ou não. A) Flores; B) Botões; C) Folhas Novas; D) Folhas Velhas; E) Flores autoclavadas; F) Botões autoclavados; G) Folhas Novas autoclavadas; H) Folhas Velhas autoclavadas; I e J) Testemunhas. Fotos obtidas após 12 horas

2.3.5 Efeito dos compostos voláteis liberados pelas águas de lavagem de flores, botões e folhas sobre a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*

Este bioensaio teve como objetivo verificar se os compostos voláteis presentes nas águas de lavagem seriam capazes de atuar como indutores de germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*. Como pode se observado na figura 13, os voláteis produzidos pelas águas de lavagem não apresentaram atividade indutora de germinação dos esporos quando comparados aos controles.

Figura 13 – Efeito dos compostos voláteis produzidos pelas águas de lavagem sobre a germinação dos esporos de *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Testemunha – meia placa sem o chumaço de algodão. Barras representam o desvio padrão das médias

Para a formação de apressórios os tratamentos Flor e Botão foram superiores aos demais. O tratamento algodão sozinho foi o que apresentou a menor porcentagem de formação de apressórios (Figura 14).

Figura 14 – Efeito dos compostos voláteis produzidos pelas águas de lavagem sobre a formação de apressórios dos esporos de *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Testemunha – meia placa sem o chumaço de algodão. Barras representam o desvio padrão das médias

2.3.6 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*

Como pode ser observado nas figuras 15 e 16, as águas de lavagem não apresentaram efeito sobre o crescimento micelial do patógeno.

Figura 15 – Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*. Barras representam o desvio padrão das médias

Figura 16 – Efeito das águas de lavagem sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*, cauculado pelo “Índice de Velocidade de Crescimento Micelial” (IVMC). Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

2.3.7 Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas, com ou sem autoclavagem, sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*

Com base nas figuras 17 e 18, pode-se observar que a autoclavagem das preparações não ocasionou nenhum efeito significativo sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*.

Figura 17 – Efeito das águas de lavagem de flores, botões e folhas, com (auto) ou sem autoclavagem, sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*. Barras representam o desvio padrão das médias

Figura 18 – Efeito das águas de lavagem, com (auto) ou sem autoclavagem, sobre o crescimento micelial de *C. acutatum* calculado pelo “Índice de Velocidade de crescimento Micelial” (IVMC). Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

2.3.8 Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem de flores e botões, sobre a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*

2.3.8.1 Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem das flores

Como pode ser observado na figura 19, as frações II, III, IV e V promoveram uma significativa redução na germinação dos esporos. A fração I foi semelhante a testemunha, sendo que o tratamento flor foi o que apresentou uma maior porcentagem de germinação.

Figura 19 – Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem de flores sobre a germinação de esporos de *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

Os testes *in vitro* demonstraram uma baixa de formação de apressórios por *C. acutatum*. O tratamento flor foi o que apresentou alguns apressórios formados, seguido da testemunha. Enquanto que as frações não apresentaram nenhum apressório formado.

Figura 20 – Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem flores sobre a formação de apressórios por *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

2.3.8.2 Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem dos botões

Com base nos dados representados na figura 21, pode-se observar que as frações voláteis obtidas a partir das águas de lavagem dos botões induziram a germinação dos esporos de *C. acutatum* quando comparados a testemunha. A fração V foi a que apresentou uma maior porcentagem, sendo superior as demais frações e semelhante ao tratamento botão.

Figura 21 – Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem dos botões sobre a germinação de esporos de *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

Para a formação de apressórios, o tratamento botão foi o que apresentou uma maior formação, embora a porcentagem tenha sido muito baixa. Os demais tratamentos apresentaram resultados bem semelhantes.

Figura 22 – Efeito das frações voláteis obtidas das águas de lavagem dos botões sobre a formação de apressórios por *C. acutatum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Barras representam o desvio padrão das médias

2.3.9 Visualização de conídios e apressórios no tecido foliar

Os conídios germinados, tubos germinativos e apressórios foram observados em discos foliares de citros (Figura 23), sendo que a melhor visualização ocorreu 48 horas após a inoculação.

Figura 23 – Visualização das estruturas de infecção de *Colletotrichum acutatum* em discos foliares de laranja Valência, após 48 horas da inoculação. A=apressórios; C=conídios; TG=Tubo germinativo

2.4 Discussão

2.4.1 Análises bioquímicas

Segundo Tukey (1970), as células apresentam substâncias solúveis em água que podem ser lixiviadas da superfície das plantas pela água da chuva. Estes lixiviados podem ter uma composição bem variada, como por exemplo, açúcares, aminoácidos, vitaminas, hormônios e minerais (BLAKEMAN, 1975). A distribuição de substâncias solúveis sobre a superfície das plantas é bem heterogênea. Fiala et al. (1990) demonstraram que há uma diferença na composição de lixiviados em plantas de milho de acordo com a posição, espessura cuticular e entre os dois lados das folhas. Portanto, este fato poderia explicar a pequena diferença observada na concentração de carboidratos que existe entre as águas de lavagem de folhas novas e folhas velhas das plantas cítricas. Além disso, a presença de pólen pode explicar a alta quantidade de carboidratos nas amostras de flores, e também o fato dos açúcares redutores serem detectados apenas nestas amostras, pois o pólen possui em sua composição tanto açúcares redutores como açúcares não redutores (SAMPAIO; FREITAS, 1993; SAMPAIO, 1991 apud MARCHINI et al., 2006).

Embora em baixas concentrações, proteínas foram quantificadas na água de lavagem das flores e botões florais. A existência de proteínas na superfície de órgãos florais e mesmo na folha já é bem documentada (CARTHER et al., 1999; PEUMANS et al. 1997; MONSELISE; HUBERMANN, 1973), porém a quantidade das mesmas geralmente é bem menor do que a de carboidratos.

2.4.2 Efeito das águas de lavagem sobre a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*

A germinação de esporos e a formação de apressórios por fungos é afetada por diversos fatores, incluindo a presença de nutrientes exógenos. Tukey (1970) sugeriu que a maior parte dos compostos solúveis em água presentes nas células vegetais podem ser lixiviados da superfície pela chuva. Além disso, a distribuição das substâncias solúveis em água no filopiano não é homogênea, e esta relacionada com

as variações na espessura da cutícula ao longo da superfície foliar, das diferenças entre os dois lados da folha, com a idade das plantas e maturação dos frutos (REPKA; JUREKOVA, 1981; KIRKHAM, 1986).

Os esporos do fungo *C. acutatum* exibem baixa germinação, em torno de 20 a 30%, quando germinados somente em água. Como foi verificado no presente trabalho (tópico 2.2.1), as águas de lavagem apresentaram em sua composição açúcares e proteínas, que podem ser considerados como fontes de energia e esqueleto carbônico, consequentemente interferindo na germinação dos propágulos fúngicos. O fato de se expor os esporos a fontes exógenas de nutrientes, fez com que os mesmos apresentassem uma alta porcentagem de germinação, em torno de 90%, comparados somente quando expostos a água. Quando se aplicou as preparações representadas por diluições das amostras flor 1:1000 e flor 1:10000 aos esporos, verificou-se que os mesmos apresentaram baixa germinação, fato que se deve provavelmente a baixas concentrações dos nutrientes presentes nas amostras. Por sua vez, a autoclavagem das águas de lavagem não interferiu na germinação, porém os resultados apresentados para a formação de apressórios mostraram que a água de lavagem de flores autoclavada ocasionou uma maior formação de apressórios em comparação aos demais tratamentos. O apressório é uma estrutura de infecção especializada que se forma a partir de uma hifa ou tubo germinativo, a qual é importante no processo de penetração do fungo através da superfície foliar do hospedeiro (KHAN; HSIANG, 2003). Para *C. acutatum*, os apressórios além de estarem relacionados à infecção, estão também voltados à sobrevivência do fungo no tecido foliar.

Brown e Swinburne (1978) relataram que esporos de *Diaporthe perniciosa* podem ser estimulados a germinação e formação de apressórios por lixiviados de frutos de maçã (*Malus* sp.). Svedelius (1990) relatou que os esporos de *Didymella bryoniae* foram estimulados a germinação e formação de apressórios pela presença de lixiviados foliares de plantas de pepino (*Cucumis sativus*). Esta eficiência foi comprovada também para fungos entomopatogênicos, onde Inyang et al. (1999) demonstraram que lixiviados obtidos a partir de folhas de acelga (*Brassica rapa pekinensis*), nabo (*Brassica rapa*) e colza (*Brassica napus*) foram capazes de aumentar a agressividade do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o coleoptero *Phaedon cochleariae fabricius*.

Outros autores mencionam que os extratos produzidos a partir da maceração de tecidos vegetais atuam como indutores dos esporos fúngicos. A formação de apressórios por *C. piperatum*, por exemplo, foi induzida por extratos produzidos a partir de frutos de pimenta vermelha, mostrando-se depender da qualidade e quantidade de nutrientes presentes nos extratos (GROVER, 1971 apud SCHISLER et al., 1991). Zulfiqar et al. (1996) relataram que apressórios de *C. acutatum*, sobreviventes em folhas de citros, podem ser induzidos a germinar e produzir conídios secundários quando aplicados sobre eles extratos de flores. Leandro et al. (2003) demonstraram que estruturas quiescentes de *C. acutatum*, presentes em folhas assintomáticas de morangueiro, foram estimuladas por extratos de flores e folhas de morango a produzir conídios secundários.

Tem sido especulado que o desenvolvimento de doenças de plantas, em geral depende da quantidade e qualidade de nutrientes presentes no filoplano e que a germinação dos esporos esta totalmente relacionada ao ambiente nutricional no qual o patógeno esta inserido (GROVER; PURNELL, 1971 apud INYANG et al., 1999).

2.4.3 Efeito dos compostos voláteis das águas de lavagem sobre a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*

A atividade de indução a germinação de esporos fúngicos por compostos voláteis já é bem evidenciada na literatura. Cruickshank e Wade (1992) relataram que esporos de *Monilinia fructicola* ao serem expostos aos compostos voláteis acetaldeído e etanol, produzidos por frutos maduros de damasco, apresentaram uma alta porcentagem de germinação. Voláteis produzidos a partir da maceração de folhas e caule de *Cucumis* e *Cucurbita* spp., foram capazes de aumentar o grau de infecção de esporos de *Mycosphaerella melonis* inoculados em cotilédones de curcubitáceas (PHARIS et al., 1982). Porém, no bioensaio realizado com os voláteis produzidos pelas águas de lavagem de flores, botões e folhas de laranjeira Valência, os compostos não apresentaram efeito indutor sobre a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*.

Com relação aos bioensaios realizados com as frações pode-se observar que os esporos do fungo *C. acutatum* ao serem expostos as frações dos compostos voláteis das águas de lavagem das flores apresentaram baixa germinação, quando comparados a testemunha. Provavelmente, algum (s) composto (s) presente (s) nas frações flores, causou uma redução na germinação dos esporos de *C. acutatum*. Para constatar esse fato, os compostos deverão ser isolados individualmente e testados novamente sobre os esporos. Apenas a fração I, que continha as substâncias voláteis mirceno, limoneno, ocimeno, fenilacetaldéido, terpineno e um composto não identificado ocasionaram germinação semelhante à testemunha.

Para os compostos voláteis presentes nas frações produzidas pelas águas de lavagem de botões, os mesmos ocasionaram uma indução à germinação dos esporos do fungo. A fração V, que continha as substâncias voláteis ácido propanóico, ácido benzenoacético, ácido pentadecanóico, ácido palmítico e um composto não identificado foi a que ocasionaram uma maior germinação. Há relatos na literatura de compostos orgânicos voláteis produzidos por órgãos vegetais, capazes de estimular a germinação de esporos fúngicos. Os voláteis citral e nonanal, produzidos por frutos cítricos, foram capazes de estimular a germinação de esporos do fungo *Penicillium digitatum* (FRENCH, 1978). O composto volátil nonanal já foi identificado em diversas espécies de plantas e relatado por diversos trabalhos como sendo indutor de germinação de estruturas fúngicas (FRENCH et al. 1975a; FRENCH et al., 1975b; FRENCH; GALLIMORE, 1971,1972; FRENCH; SCHIMITT, 1980). Este composto esteve presente na fração I das águas de lavagem de botões, a qual apesar de não ter apresentado o melhor resultado perante a germinação, mostrou-se semelhante aos valores obtidos nas frações II, III e IV e superior a testemunha. A presença dos compostos voláteis provavelmente não é o fator principal para a germinação de esporos fúngicos, tendo observado que a porcentagem de germinação é maior quando na presença das águas de lavagem bruta, porém pode-se notar que os voláteis presentes nos botões exerceram alguma atividade estimuladora.

A coleta dos compostos voláteis foi feita em água, simular o que acontece na natureza, pois segundo Timmer et al. (1994), a doença PFC só ocorre em épocas de intensa pluviosidade. Desta forma, pode-se subentender que os compostos voláteis

liberados pelas flores e botões são capturados pela água das chuvas e podem entrar em contato direto com as estruturas quiescentes de *C. acutatum* presentes nos tecidos foliares de plantas cítricas.

Com relação a formação de apressórios, visto que no bioensaio obteve-se valores muito baixos, existe a necessidade de novos experimentos para a geração de resultados mais concisos.

2.4.4 Efeito das águas de lavagem sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*

Quando adicionadas ao meio de cultura, as águas de lavagem não influenciaram o crescimento micelial do fungo, pois este apresentou um comportamento bem semelhante entre os tratamentos. A autoclavagem das águas de lavagem também não teve efeito sobre o crescimento micelial. Neste ensaio, foram proporcionados as placas contendo os discos de micélio do fungo as mesmas condições de temperatura e luminosidade, diferindo apenas nos tratamentos. Segundo Vêras et al. (1997), uma mínima concentração de nutrientes permite o crescimento micelial dos fungos. Em geral, os fungos utilizam para o seu crescimento e desenvolvimento várias fontes nutricionais, como por exemplo, aminoácidos e açúcares entre outras fontes minerais. Os açúcares são as fontes de carbono mais requeridas por fungos, e podem variar desde simples hexoses como a glicose, até a polissacarídeos como o amido, a celulose e hidrocarbonetos aromáticos, incluindo lignina (CURRAN; BUGEJA, 2005).

2.4.5 Visualização de conídios e apressórios no tecido foliar

Pode-se observar nas fotomicrografias (Figura 23), que os esporos de *C. acutatum*, quando inoculados sobre o tecido foliar, germinaram e formaram apressórios. A melhor visualização ocorreu após 48 horas da inoculação e o método utilizado mostrou-se adequado para essa finalidade. Os apressório de *Colletotrichum* spp. são geralmente globosos, melanizados e emitem “pegs” de infecção que penetram diretamente no tecido do hospedeiro (HOWARD; VALENT, 1996). As espécies de *Colletotrichum* podem colonizar o tecido das plantas de duas formas: intercelular hemibiotrófico e subcuticular intramural necrotrófico. Com o *C. acutatum* em citros, a

infecção dos tecidos das flores ocorre de forma necrotrófica inicialmente. Após a florada, o patógeno se estabelece nos tecidos foliares, na forma de apressório quiescente (hemibiotrófico), sem, portanto, apresentar manifestação de sintomas, garantindo assim sua sobrevivência entre uma florada e outra (PERES, 2005). Segundo Zulfiqar et. al. (1996), os apressórios presentes sobre o tecido foliar na forma quiescente, germinam e formam conídios secundários, fato que não foi evidenciado neste bioensaio.

3 CONCLUSÕES

As águas de lavagem preparação bruta de flores, botões e folhas de laranja Valência estimularam a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*, porém não interferiu no crescimento micelial. Além disto, as frações obtidas das águas de lavagem das flores, quando em contato direto com os esporos, não induziram a germinação dos mesmos, ocorrendo até uma diminuição na germinação. Já as frações obtidas das águas de lavagem dos botões apresentaram atividade indutora sobre a germinação dos esporos;

Os compostos voláteis presentes nas águas de lavagem, não apresentaram atividade indutora sobre a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*;

Finalmente, a germinação e formação de apressórios por *C. acutatum*, provavelmente esta relacionada a fatores nutricionais além da possível existência de moléculas indutoras, visto que os bioensaios realizados com as águas de lavagem bruta apresentaram uma significativa atividade indutora.

REFERÊNCIAS

ADASKAVEG, J.E.; FÖRSTER, H. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. **Colletotrichum**: host specificity, pathology and host-pathogen interactions. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 317-336.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, p. 1176-1178, 1992.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, Lancaster, v. 84, n.4, p. 420-425, 1994.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, Lancaster, v.82, 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**, Lancaster, v.83, p. 485-490, 1993.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th. ed. New York: Academic Press, 2005. 922p.

AMORIM, L. Infecção. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; **Manual de Fitopatologia**: Princípios e conceitos. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. cap. 15, p. 295-308.

BLAKEMAN, J.P. The chemical environment of the leaf surface in relation to growth of pathogenic fungi. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H. **Ecology of leaf surface microorganisms**. New York: Academic Press, 1971. p. 491-507.

BLAKEMAN, J.P. Germination of *Botrytis cinerea* conidia in vitro in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 65, n. 2, p. 239-247, 1975.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. New York, v. 72, p. 248-257, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. AGROFIT. Disponível em:

<http://www.extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 abr. 2010.

BRODIE L.D.S.; BLAKEMAN J.P. Competition for exogenous substrates in vitro by leaf surface micro-organisms and germination of conidia of *Botrytis cinerea*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 9, p. 227-239, 1976.

BROWN, A.E.; SWINBURNE, T.R. Stimulants of germination and appressorial formation by *diaporthe pernicioso* in apple leachate. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 71, n. 3, p. 405-411, 1978.

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**, Lancaster, v.86, p. 523-527, 1996.

CARTER, C.; GRAHAM, R.; THORNBURG, R.W. Nectarin I is a novel, soluble germin-like protein expressed in the nectar of *Nicotiana* sp. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 41, p. 207-216, 1999.

CHAGAS, P.R.R.; TOKEHI, H. **Método de clareamento de folhas de vegetais para estudos *in vivo* as fases de infecção de fungos e bactérias**. Piracicaba: ESALQ/USP Fitopatologia, 1995.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Boletim Agrometeorológico**: abril 2009 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2009. 31 p. (Publicação mensal).

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.

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.

CURRAN, B.P.G.; BUGEJA, V. Fungal genetics: A post genomic perspective. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi Biology and Applications**. Ireland: Jonh Wiley, 2005. chap. 3, p. 65-88.

DeMARSAY, A.; OUDEMANS, P.V. *Colletotrichum acutatum* infections in dormant highbush blueberry buds. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, supl., p. 20, 2003.

DeMARSAY, A.; OUDEMANS, P.V. Blueberry anthracnose: From bud infection to fruit rot. **Phytopathology**, Lancaster, v. 94, supl., p. 25, 2004.

DICTIONARY OF NATURAL PRODUCTS. Disponível em:
<http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=302027&si=>
 Acesso em: 27 jul. 2010.

DUBOIS, M.; HAMINTON, K.; REBERS, P.; SMITH, C. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.167, p. 350-356, 1956.

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

ECKERT, J.W.; RATNAYAKE, M. Role of volate compounds from wounded oranges in induction of germination of *Penicillium digitatum* conidia. **Phytopathology**, Lancaster, v. 87, n. 7, p. 746-750, 1994.

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, 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. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v.15, n.2, p. 109-128, 1994.

FIALA, V.; GALD, C.; MARTIN, M.; JOLIVET, E.; DERRID, J. Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane of maize (*Zea mays* L.): variations in relation to leaf heterogeneity and position on the plant. **New Phytopathology**, v. 115, p. 609-615, 1990.

FREEMAN, S.; SHABI, E.; KATAN, T. Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5267-5272, 2000.

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, n. 10, p. 986-992, 2001.

FREEMAN, S.; SHALEV, Z.; KATAN, J. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 9, p. 965-970, 2002.

FREEMAN S.; MINZ, D.; MAYMON, M.; ZVEIBIL, A. Genetic Diversity Within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, n. 6, p. 586-592, jun. 2001.

FRENCH, R.C. The bioregulatory action of flavor compounds on fungal spores and other propagules. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 23, p. 173-199, 1985.

FRENCH, R.C. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. **Mycologia**, New York, v. 84, p. 277-288, 1992.

FRENCH, R.C.; GALLIMORE, M.D. Effect of some nonyl derivatives and related compounds on germination of uredinospores. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 19, p. 912-915, 1971.

FRENCH, R.C.; GALLIMORE, M.D. Stimulation of germination of uredospores of stem rust of wheat in the pustule by n-nonanal and related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 20, p. 421-423, 1972.

FRENCH, R.C.; SCHMITT, C.G. Effect of furfural on the in vitro germination of *Peronosclerospora sorghi* oospores. **Phytopathology**, Lancaster, v. 70, p. 877-880, 1980.

FRENCH, R.C.; GALE, A. W.; GRAHAM, C.L.; RINES, H.W. Factores affecting chemical stimulation of uredinospore germination in pustules of crown rust of oats, common corn rust, stem rust of wheat and leaf rust of wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 23, p. 4-8, 1975a.

FRENCH, R.C.; GALE, A. W.; GRAHAM, C.L.; SCHMITT, C.G.; MARCHETTI, M.A.; RINES, H.W. Differences in germination response of spores of several species of rust and smut fungi nonanal, 6-methyl-5-hepten-2-one, and related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 23, p. 766-770, 1975b.

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**, Lancaster, v. 68, p. 877-882, 1978.

FRIES, N. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 60, p. 1-21, 1973.

GANTOTTI, B.V.; DAVIS, M.J. Detection of pectinase isozyme polymorphism in *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, Lancaster, v.81, p.1170, 1991.

GALLI, M.A.; PARADELA, A.L.; SIMA, Jr., J.C.; SALVO, S.; SCHERB, C.T. Avaliação de fungicidas no controle da podridão floral (*Colletotrichum acutatum*) em limão Taiti (*Citrus lantifolia*). **Revista Ecosystema**, Pinhal, v. 27, n. 1/2, p. 67-68, 2002.

GOES, A. de, KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados à Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.23, p. 4-9, 1997a.

GOES, A. de; KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e de *C. gloeosporioides*, obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.23, p. 10-14, 1997b.

GONÇALVES, R.C.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Armazenamento de Microrganismo em Cultura com Ênfase em Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos de Fitopatologia**, 2007. cap. 3, p. 91-102.

HOWARD, R.J.; VALENT, B. Breaking and entering: Host penetration by the fungal Rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 491-512, 1996.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, n. 7, p. 743-749, 2002.

KHAN, A.; HSIANG, T. The infection process of *Colletotrichum graminicola* and relative aggressiveness on four turfgrass species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, p. 433-442, 2003.

KING, J.E.; COLEY-SMITH, J.R. Production of volatile alkyl sulphides microbial degradation of synthetic alliin and alliin-like compounds, in relation to germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 64, p. 303-314, 1969.

KIRKHAM, M.B. Water relation of the upper and lower surface of maize leaves. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 28, p. 249-257, 1986.

INYANG, N.; BUTTI, T.M.; BECKETT, A.; ARCHER, S. The effect of crucifer epicuticular waxes and leaf extracts on the germination and virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, n. 4, p. 419-426, 1999.

LEANDRO, L.F.S.; GLEASON, M.L.; NUTTER, F.W.Jr.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, Lancaster, 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. Influence of temperature and wetness duration on conidia and appressoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, n. 4, p. 513-520, 2003a.

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**, Lancaster, v. 93, n. 10, p. 1285-1291, 2003b.

LIYANAGE, H.D.; McMILLAN, R.T.; KISTLER, H.C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, Lancaster, v.82, p. 1371-1376, 1992.

LIYANAGE, H.D.; KÖLLER, W.; McMILLAN, R.T.; KISTLER, H.C. Variation in cutinase from two populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, Lancaster, v.83, p. 113-116, 1993.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MARQUINI, L.C.; REIS, V.D.A. dos; 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.

McMILLAN, R.; TIMMER, L.W. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, p. 81, 1989.

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v.31, p. 426-429, 1959.

MONSELISE, S.P.; HUBERMANN, M. Comparison of protein fractions of citrus buds during flower formation or its inhibition by gibberellin. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 1, p. 171-176, 1973.

NORMAN, D.J.; STRANDBERG, J.O. Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leather leaf fern. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 10, p. 1177-1180, 1997.

OROZCO SANTOS, M., GONZALEZ GARZA, R. Caída de fruto pequeño y su control en naranja 'Valencia' en Veracruz. **Agricultura Técnica en México**, México, v.12, n.2, p. 259-269, 1986.

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

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: Arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; **Manual de Fitopatologia**: Princípios e conceitos. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. cap. 19, p. 343-364.

PEUMANS, W.J.; SMEETS, K.; VAN NERUM, K.; VAN LEUVEN, F.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin and alliinase are the predominant proteins in nectar from leek (*Allium porrum* L.) flowers. **Planta**, Berlin, v. 201, p. 298-302, 1997.

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 Agronômicas, 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) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2002.

PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; ZITKO, S.E.; TIMMER, L.W. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 6, p. 620-624, 2002.

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

PHARIS, V.L.; KEMP, T.R.; KANVEL; D.E. Host plant-emitted volatiles as a factor in susceptibility in vitro of *Cucumis* and *Cucurbita* spp. to the fungus *Mycosphaerella melonis*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 17, p. 311-317, 1982.

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

PORTO, O.M. Queda anormal de frutos jovens de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n.1, p. 341-356, 1993.

PRATES, H.S.; RODRIGUES, J.C.V., NOGUEIRA, N.L. Observações sobre a doença podridão floral na citricultura paulista. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p. 296, 1995.

REPKA, J.; JUREKOVA, Z. Heterogeneity of the maize leaf blade in photosynthetic characteristics, respiration, nutrient contents, and growth substances. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 23, p. 145-155, 1981.

ROBERTO, S.R.; BORGES, A.V. Efeito do estágio de desenvolvimento das flores e da aplicação de fungicidas no controle da podridão floral dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 306-309, 2001.

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

SAMPAIO, E.A.B.; FREITAS, R.J.S. Caracterização do pólen apícola armazenado na colméia (pão das abelhas) de algumas localidades do Paraná. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 11, n. 1, p. 81-87, 1993.

SCHISLER, D.A.; JACKSON, M.A.; BOTHAST, R. J. Influence of nutrition during conidiation of *Colletotrichum truncatum* on conidial germination and efficacy in inciting disease in *Sesbania exaltata*. **Phytopathology**, Lancaster v.81, n. 6, p. 587-590, 1991.

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

STOTZKY, G.; SCHENCK, S.; PAPAIVIZAS, G.C. Volatile organic compounds and microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 4, p. 333-382, 1976.

TARKKA, M.T.; PIECHULLA, B. Aromatic weapons: truffles attack plants by the production of volatiles. **The New Phytologist**, London, v. 175, p. 381-383, 2007.

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

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 5, p. 501-504, 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**, St. Paul, v.78, p. 329-334, 1994..

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). **Colletotrichum**: Host specificity, pathology, and host-pathogen interactions. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 300-316.

TIMMER, L.W.; ROBERTS, P.D.; CHUNG, K.R. Postbloom fruit drop. In: TIMMER, L.W. **Florida Citrus Pest Management Guide**. Gainesville: University of Florida Cooperative Extension Service, IFAS, 2002. p. 85-88.

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

TUKEY, H.B. Leaching of substance from plants. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H. (Ed.). **Ecology of leaf surface micro-organisms**. London: National Academy of Sciences, 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. **Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 249-265, 1982.

UREÑA-PADILLA, A.R.; MITCHELL, D.J.; LEGARD, D.E. Oversummer survival of inoculum for *Colletotrichum* crown rot in buried strawberry crown tissue. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 7, p. 750-754, 2001.

VÉRAS, S.M.; GASPARROTO, L.; MENEZES, M. Variabilidade fisio-morfológica de *Colletothicum guaranicola* em diferentes substratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 2, p. 297-305, 1997.

WELLS, K.; FIDALGO, O. Out lines of course of basidiomycetes. **11ª Cadeira de Fitopatologia e Micologia** – Piracicaba: ESALQ/USP, 1964. 110p.

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, p. 121-128, 1996.

YADAV, B.Y. Behaviour of *Cochliobolus sativus* during its Infection of Barley and Wheat Leaves. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 29, p. 71-79, 1981.