

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**MODELO DE PREVISÃO E CONTROLE DA PODRIDÃO FLORAL  
DOS CITROS CAUSADA POR *Colletotrichum acutatum***

**NATÁLIA APARECIDA RODRIGUES PERES**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU-SP  
Julho - 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**MODELO DE PREVISÃO E CONTROLE DA PODRIDÃO FLORAL  
DOS CITROS CAUSADA POR *Colletotrichum acutatum***

**NATÁLIA APARECIDA RODRIGUES PERES**

Orientador: Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU-SP  
Julho - 2002

Aos meus pais, **Hamilton e Cleusa,**

pelo amor e incentivo em todas as etapas da minha vida

Ao **Fábio, Fernanda e Giulia**

pela amizade e apoio

Ao **Renato,**

pelo amor, incentivo, confiança e compreensão,

mesmo nos momentos mais difíceis

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Lavern W. 'Pete' Timmer, pela amizade, pelo apoio constante e pela enorme disposição em passar os seus conhecimentos.
- Ao Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza, pela confiança e por nos incentivar a buscar novos horizontes.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Produção Vegetal e, em especial ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado pelo auxílio na elaboração do projeto e pelos ensinamentos.
- Às amigas Dra Roseli Chela Fenille e Dra Eiko Eurya Kuramae pelo apoio e companheirismo.
- Ao amigo Wilson Story Venâncio por ter sido sempre um fã incondicional do meu trabalho.
- Aos colegas de curso Adriana, César, Christiane, Janaína, Maurício, Rafael e Viviane, pela amizade, e aos colegas Ricardo Ferrari e Aline Fernandes pelo auxílio na condução de ensaios.
- À Citrovita Agrícola Ltda. pelas áreas concedidas para a instalação dos experimentos, pelo apoio operacional, e em especial aos Engenheiros Marcio Dinardo e Eduardo Lopes.
- À Fazenda Sete Lagoas, ao Grupo Fischer, à Cia Agrícola de Botucatu e à Fazenda Real pelo auxílio na coleta dos isolados utilizados neste estudo.
- Aos colegas de laboratório do Citrus Research and Education Center, Alka Bhatia, Sachindra Mondal, Juan Pedro Agostini, Chuck Geanangel, Zhang Li e Tony Tesoriero, pelo convívio harmonioso e pelo auxílio na condução dos experimentos.

- À Howard Beck e Soonho Kim, pela viabilização do sistema PFD-FAD.
- À Tobin Peever pelos ensinamentos em biologia molecular e pela grande receptividade em Washington State.
- Ao Dr. Mário Sérgio C. Dias pelo incentivo durante a minha iniciação científica e por sempre ter acreditado no meu trabalho.
- À Rosa, Marcio, Márcia e Guigo, pelo carinho e incentivo.
- Aos novos colegas de trabalho do laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, pela amizade e apoio, e em especial ao Ricardo Harakava e Júlia Beretta pela oportunidade concedida.
- À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.
- À todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| LISTA DE QUADROS.....  | V             |
| LISTA DE FIGURAS .....   | VIII          |
| 1 RESUMO .....   | 1             |
| 2 SUMMARY .....  | 3             |
| 3 INTRODUÇÃO .....   | 5             |
| 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 8             |
| 4.1 Ocorrência e importância da doença .....   | 8             |
| 4.2 Sintomatologia e agente causal .....   | 9             |
| 4.3 Epidemiologia e controle .....   | 12            |
| 4.4 Benomyl – Modo de ação e resistência de fungos.....  | 17            |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 22            |
| 5.1 Avaliação do modelo de previsão para o controle da doença.....   | 22            |
| 5.2 Desenvolvimento de um novo sistema de previsão para aplicação de fungicidas<br>para controle da podridão floral (PFD-FAD)..... | 29            |
| 5.2.1 Estádio da florada.....  | 29            |
| 5.2.2 Valores de risco.....  | 29            |
| 5.2.3 Riscos pré-florada .....   | 30            |
| 5.2.4 Riscos climáticos.....   | 32            |
| 5.2.5 Risco quanto ao nível de inóculo.....  | 33            |
| 5.2.6 Recomendação de pulverização .....   | 34            |

|  |    |
|--|----|
| 5.3 Avaliação da resistência de isolados de <i>Colletotrichum</i> de citros ao fungicida benomyl.....  | 35 |
| 5.3.1 Sensibilidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> ao benomyl ‘in vitro’ .....   | 36 |
| 5.3.1.1 Efeito sobre o crescimento micelial.....   | 36 |
| 5.3.1.2 Efeito sobre a germinação de conídios em meio sólido .....   | 37 |
| 5.3.1.3 Efeito sobre a germinação de conídios em meio líquido .....  | 37 |
| 5.3.1.4 Efeito sobre o crescimento do tubo germinativo .....   | 38 |
| 5.3.2 Sensibilidade ‘in vitro’ de isolados de <i>Colletotrichum</i> provenientes de pomares com diferentes históricos de uso de benomyl..... | 39 |
| 5.3.3 Sequenciamento parcial do gene $\beta$ -tubulina de isolados de <i>Colletotrichum</i> .....  | 41 |
| 5.4 Atividade do benomyl no controle da podridão floral.....   | 44 |
| 5.4.1 Atividade do benomyl no controle pré e pós-infecção.....   | 44 |
| 5.4.2 Efeito do benomyl na produção de conídios de <i>C. acutatum</i> .....  | 45 |
| 5.4.3 Efeito do benomyl na viabilidade de conídios de <i>C. acutatum</i> .....   | 46 |
| 6 RESULTADOS .....   | 47 |
| 6.1 Avaliação do modelo de previsão para o controle da doença.....   | 47 |
| 6.1.1 Experimento 1 – Ano de 1999.....   | 47 |
| 6.1.2 Experimento 2 – Ano de 2000.....   | 49 |
| 6.1.3 Experimento 3 – Ano 2001 .....   | 53 |
| 6.2 Desenvolvimento de um sistema de previsão para aplicação de fungicidas para controle da podridão floral (PFD-FAD) .....                  | 59 |
| 6.3 Avaliação da resistência de isolados de <i>Colletotrichum</i> de citros ao benomyl.....  | 66 |
| 6.3.1 Sensibilidade de isolados de <i>Colletotrichum</i> ao benomyl ‘in vitro’ .....   | 66 |

|   |     |
|---|-----|
| 6.3.1.1 Efeito sobre o crescimento micelial .....   | 66  |
| 6.3.1.2 Efeito sobre a germinação de conídios em meio sólido .....  | 67  |
| 6.3.1.3 Efeito sobre a germinação de conídios em meio líquido .....   | 69  |
| 6.3.1.4 Efeito sobre o crescimento do tubo germinativo .....  | 70  |
| 6.3.2 Sensibilidade ‘in vitro’ de isolados de <i>Colletotrichum</i> provenientes de pomares com diferentes históricos de uso de benomyl ..... | 71  |
| 6.3.3 Sequenciamento parcial do gene $\beta$ -tubulina de isolados de <i>Colletotrichum</i> .....   | 77  |
| 6.4 Atividade do benomyl no controle da podridão floral .....   | 79  |
| 6.4.1 Atividade do benomyl no controle pré e pós infecção .....   | 79  |
| 6.4.2 Efeito do benomyl na produção e viabilidade de conídios de <i>C. acutatum</i> .....   | 83  |
| 7 DISCUSSÃO .....   | 84  |
| 7.1 Avaliação do modelo de previsão.....  | 84  |
| 7.2 Sistema de previsão PFD-FAD.....  | 87  |
| 7.3 Resistência de isolados de <i>C. acutatum</i> ao benomyl .....  | 91  |
| 7.4 Atividade do benomyl no controle da podridão floral.....  | 94  |
| 8 CONCLUSÕES .....  | 97  |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 98  |
| APÊNDICE.....   | 109 |



## LISTA DE QUADROS

| <b>Quadro</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 1. Porcentagem prevista de flores infectadas utilizando a equação para vários níveis hipotéticos de chuva e doença. Valores cercados entre linhas indicam a necessidade de pulverização ( $y > 20\%$ )..... | 23            |
| 2. Datas de pulverização do benomyl nos diferentes tratamentos para controle da podridão floral dos citros. Experimento 1, Itapetininga, 1999 .....   | 24            |
| 3. Datas de pulverização do benomyl nos diferentes tratamentos para controle da podridão floral dos citros. Experimento 2, Itapetininga, 2000 .....   | 25            |
| 4. Datas de pulverização dos tratamentos para controle da podridão floral dos citros. Experimento 3, Itapetininga, 2001 .....   | 26            |
| 5. Fatores pré-florada considerados e valores de risco atribuídos no desenvolvimento do sistema PFD-FAD.....  | 31            |
| 6. Fatores climáticos considerados durante a florada e valores de risco atribuídos no desenvolvimento do sistema PFD-FAD.....   | 33            |
| 7. Valores de risco atribuídos de acordo com o nível de sintomas no pomar no desenvolvimento do sistema PFD-FAD.....  | 34            |
| 8. Valor total de risco necessário para gerar uma recomendação de aplicação de acordo com a última pulverização de fungicida.....   | 35            |
| 9. Relação e procedência dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. utilizados para avaliação do efeito do benomyl sobre o crescimento micelial ‘in vitro’ .....  | 36            |

|  |    |
|--|----|
| 10. Relação, procedência e histórico dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. em relação a regularidade de uso do benomyl .....  | 40 |
| 11. Origem e característica dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. utilizados para o sequenciamento parcial do gene da $\beta$ -tubulina .....   | 43 |
| 12. Efeito da aplicação de benomyl + mancozeb seguindo o esquema calendário para o controle da podridão floral, sobre o número de cálices e de frutos retidos. Experimento 1, Itapetininga, 1999 .....   | 48 |
| 13. Número médio de cálices e de frutos retidos após tratamento com benomyl + mancozeb seguindo o esquema calendário para o controle da podridão floral. Experimento 1, Itapetininga, 1999 .....   | 49 |
| 14. Efeito de diferentes esquemas de aplicação de benomyl para o controle da podridão floral sobre o número de cálices e de frutos retidos. Experimento 2, Itapetininga, 2000 .....  | 52 |
| 15. Número médio de cálices e frutos retidos após tratamento com benomyl seguindo diferentes esquemas de aplicação, para o controle da podridão floral. Itapetininga, 2000 .....   | 53 |
| 16. Efeito de diferentes esquemas de aplicação de fungicidas para o controle da podridão floral, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a infecção de flores, o número de cálices e de frutos retidos. Experimento 3, Itapetininga, 2001 ..... | 56 |
| 17. Número médio de cálices e frutos retidos após tratamento com fungicidas em diferentes esquemas de aplicação para o controle da Podridão Floral. Experimento 3, Itapetininga, 2001 .....  | 58 |

18. Custo estimado de cada tratamento para controle da podridão floral dos citros.  
Experimento 3, Itapetininga-SP, 2001.....58
19. Germinação de conídios de isolados *Colletotrichum acutatum*, cultivados em meio de cultura sólido com diferentes concentrações de benomyl, expresso como porcentagem de germinação em relação à testemunha .....67
20. Crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum*, cultivados em meio de cultura sólido com diferentes concentrações de benomyl, expresso como porcentagem de área da colônia em relação à testemunha .....68
21. Crescimento micelial de isolados *Colletotrichum acutatum* cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de benomyl, provenientes de pomares com diferentes históricos quanto a regularidade de uso de benomyl, expressos como porcentagem em relação a testemunha .....74
22. Análise de variância para as diferentes fontes de variação no crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum*, provenientes de pomares com diferente histórico de uso de benomyl no Brasil e na Flórida, cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida .....74
23. Efeito a aplicação de benomyl em pré e pós inoculação no desenvolvimento de sintomas de podridão floral, causada por *Colletotrichum acutatum* .....82
24. Efeito da aplicação de benomyl em pétalas destacadas de laranja doce na produção de conídios de *Colletotrichum acutatum* em pétalas infectadas, sem esporulação.....83
25. Efeito da aplicação de benomyl em pétalas destacadas de laranja doce na viabilidade de conídios provenientes de pétalas sintomáticas contendo esporos.....83

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 1. Incidência de Podridão Floral em diferentes talhões das variedades Pêra e Natal, de acordo com os tratamentos modelo de previsão; produtor; calendário; PFD-FAD; testemunha. Barras verticais representam quantidade de chuva (mm). Itapetininga-SP, 2001..... | 57            |
| 2. Página inicial do sistema PFD-FAD (versão em inglês).....  | 60            |
| 3. Página inicial do sistema PFD-FAD (versão em português).....   | 61            |
| 4. Página de entrada no sistema PFD-FAD, onde os usuários irão selecionar as condições desejadas através de uma lista de escolhas.....  | 62            |
| 5. Exemplo de uma situação selecionada no sistema PFD-FAD, que deverá ser submetida para gerar uma recomendação.....  | 63            |
| 6. Recomendação gerada a partir da seleção exemplificada na Figura 5, contendo um resumo de todos os fatores selecionados pelo usuário.....   | 64            |
| 7. Diagrama exemplificando o esquema de decisões do sistema PFD-FAD, acessado através do ícone 'Diagrama' na página inicial.....  | 65            |
| 8. Crescimento micelial de isolados de <i>Colletotrichum</i> de citros cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de benomyl, após sete dias de incubação a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .....                                      | 66            |
| 9. Germinação de conídios e área das colônias de <i>Colletotrichum acutatum</i> cultivados em meio de cultura sólido com diferentes concentrações de benomyl, após três dias  |               |

- de incubação a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Dados expressos como porcentagem em relação à testemunha.....68
10. Germinação de conídios e crescimento do tubo germinativo de conídios de *Colletotrichum acutatum*, cultivados em meio de cultura líquido, com diferentes concentrações de benomyl adicionado antes da germinação dos conídios. Dados expressos como porcentagem em relação à testemunha .....69
11. Comprimento do tubo germinativo de conídios de *Colletotrichum acutatum*, cultivados em meio de cultura líquido com diferentes concentrações de benomyl aplicado após 12 horas de incubação dos conídios  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Dados expressos como porcentagem em relação à testemunha .....70
12. Porcentagem de crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum*, provenientes dos pomares CLR-IMK e CIA-BTU, cultivados em meio de cultura com benomyl nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{g/mL}$ .....75
13. Porcentagem de crescimento micelial de isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, provenientes dos pomares SRL-FTP e SLG-MGG, cultivados em meio de cultura com benomyl na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$ .....76
14. Sequência de aminoácidos correspondente a região entre os códons 180 e 213 do gene da  $\beta$ -tubulina de isolados de *Colletotrichum* sensíveis ou resistentes ao benomyl.....78

## 1 RESUMO

A podridão floral, causada por *Colletotrichum acutatum*, afeta flores de citros e induz à abscisão de frutos jovens, sendo considerada um sério problema na maioria das áreas úmidas onde se produz citros nas Américas. O controle da doença é feito pela pulverização de fungicidas durante a florada porém, uma das dificuldades é determinar o momento ideal para o controle. Um modelo de previsão foi desenvolvido na Flórida para indicar a necessidade de pulverização, considerando a quantidade de inóculo, chuvas e molhamento foliar. Este modelo foi avaliado durante três anos consecutivos na região de Itapetininga-SP. Verificou-se que mediante a aplicação do modelo obteve-se um bom controle da doença, tendo-se evitado duas pulverizações desnecessárias em comparação com o calendário, em 1999, e uma pulverização, comparado ao esquema do produtor, em 2000 e 2001. Um novo sistema de previsão para controle da podridão floral (PFD-FAD) foi desenvolvido incorporando outros fatores que também influenciam a ocorrência da doença, como o histórico do pomar, a suscetibilidade da variedade, o estágio de desenvolvimento da florada, assim como chuva, molhamento foliar e nível de inóculo, além da data da última

pulverização. No experimento de campo em 2001, o sistema demonstrou um bom controle da doença com apenas uma aplicação de fungicida. O benomyl é considerado um dos melhores produtos para controle da doença em condições de campo, porém o fungo *C. acutatum* não é altamente sensível ao fungicida 'in vitro'. O crescimento micelial e a germinação dos conídios de *C. acutatum* foram inibidos em cerca de 80% na concentração de 1,0 µg/mL, porém concentrações maiores não chegam a paralisar o crescimento do fungo. *Colletotrichum gloeosporioides*, saprófita comum e causador da antracnose em frutos pós-colheita, é altamente sensível ao fungicida, tendo o seu crescimento completamente inibido na concentração de 1,0 µg/mL. Foram coletados isolados provenientes de 17 pomares com diferentes históricos de uso do benomyl e o crescimento micelial destes isolados foi avaliado em BDA com o fungicida em diferentes concentrações. A sensibilidade dos isolados variou significativamente entre os pomares avaliados e, apesar de terem sido verificadas diferenças em relação aos diferentes históricos de uso do benomyl, não foi encontrado nenhum isolado altamente resistente ao benomyl. O sequenciamento parcial do gene da β-tubulina não mostrou nenhuma mutação na região do gene que, geralmente, confere resistência de fungos ao benomyl. Em experimentos em casa de vegetação, aplicações de benomyl 24 horas antes e até 48 horas após a inoculação reduziram significativamente o desenvolvimento dos sintomas da doença. As aplicações de benomyl em pétalas com esporulação do fungo reduziram a viabilidade dos propágulos em cerca de 50%, enquanto que a aplicação do fungicida em pétalas que ainda não apresentavam conídios, não preveniram ou diminuíram a sua produção.

## **2 SUMMARY**

**A PREDICTIVE MODEL AND CONTROL OF POSTBLOOM FRUIT DROP OF CITRUS CAUSED BY *Colletotrichum acutatum*. Botucatu, 2002. 118p. Tese (Doutorado em Agronomia / Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista**

**Author: NATÁLIA APARECIDA RODRIGUES PERES**

**Adviser: NILTON LUIZ DE SOUZA**

Postbloom fruit drop (PFD), caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds, infects petals of citrus flowers and induces the abscission of fruitlets. The disease can cause serious losses in most humid areas where citrus is produced in the Americas. The disease is controlled by fungicide applications during the bloom but it is difficult to properly time applications. A model was developed in Florida to schedule fungicide applications based on the amount of inoculum and the amount of rainfall and leaf wetness for the last 5 days. This model was evaluated during three consecutive years in Itapetininga-SP, Brazil. Results showed that applications following the model provided good control of the disease and saved



two sprays compared to the calendar program in 1999, and one spray compared to the grower's choice in 2000 and 2001. A new advisory system (PFD-FAD) was developed to be more widely applicable by incorporating risk factors that are inherent in any planting which affected by PFD incidence. The history of the disease in the grove, the varietal susceptibility, the stage of the bloom, as well as the rain, leaf wetness, the amount of inoculum and the last spray date were considered. Field tests in 2001 showed that the system provided good control of the disease with only one fungicide application. Benomyl is considered one of the most effective products for PFD control but despite that *C. acutatum* is not highly sensitive to benomyl in culture. The mycelial growth and conidial germination is inhibited by 80% at concentration of 1.0  $\mu\text{g/mL}$ , but higher concentrations do not completely inhibit the growth of the fungus. *Colletotrichum gloeosporioides*, a common saprophyte and causal agent of anthracnose of fruits postharvest, is completely inhibited by 1.0  $\mu\text{g/mL}$ . Seventeen groves with different histories of benomyl usage were sampled in Brazil and Florida and the growth of the isolates was measured on PDA with different concentrations of fungicide. The sensitivity of the isolates showed differences among the groves and the frequency of benomyl usage but no highly resistant isolate was detected. Partial sequencing of the  $\beta$ -tubulin gene did not show the mutations that are usually correlated with benomyl resistance in other fungi. In greenhouse experiments, benomyl applications made before inoculation or up to 48 hours after inoculation reduced symptom development. Applications of benomyl to symptomatic petals reduced conidial viability about 50%, but application to petals not bearing conidia did not prevent conidial production.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*, *Citrus sinensis*, Postbloom Fruit Drop, benomyl resistance, predictive model, control

### 3 INTRODUÇÃO

A cultura dos citros (*Citrus* spp.) no Brasil representa mais de 1 milhão de hectares de plantas e, desde a década de 80, o país é considerado o maior produtor mundial. A maior parte da produção destina-se à indústria de suco concentrado, sendo que o estado de São Paulo é responsável por 70% das laranjas e 98% do suco produzido (Hasse, 1987). Segundo o Instituto de Economia Agrícola de São Paulo, estima-se a colheita de cerca de 371,3 milhões de caixas de laranjas durante a safra 2002/2003.

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 (Hasse, 1987).

Apesar de serem ótimas para a produção dos citros, as regiões tropicais e subtropicais apresentam condições climáticas favoráveis à ocorrência de doenças fúngicas na cultura. Entre estas, a podridão floral, também conhecida como Queda Prematura de Frutos

Jovens, causada por *Colletotrichum acutatum* Simmonds, foi descrita pela primeira vez em Belize por Fagan (1979), porém sintomas característicos da doença têm sido observados desde meados de 1950, nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas.

No Brasil, a doença foi descrita primeiramente no Rio Grande do Sul por Porto et al. (1979) e, de forma geral, ocorre praticamente em todos os municípios produtores de citros no estado de São Paulo, assim como Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Amazonas, causando prejuízos variáveis dependendo, principalmente, da ocorrência de chuvas por períodos prolongados no florescimento das plantas (Mc Millan & Timmer, 1988).

As perdas causadas pela doença foram severas no Brasil especialmente nas safras de 1990, 1992, 1993, 1996, 1998 e 2001, enquanto que, na Flórida, a doença foi relatada pela primeira vez em 1983, sendo que perdas severas foram verificadas nas safras de 1989, 1991, 1993, 1994 e 1998 (Peres et al., 2002).

O controle da doença baseia-se na pulverização de fungicidas na época da florada, sendo que os produtos do grupo dos benzimidazóis, como benomyl, carbendazim e tiofanato metílico, estão entre os mais eficientes. Uma das grandes dificuldades para o controle da podridão floral é determinar o momento das pulverizações, já que as plantas tendem a apresentar florações irregulares nas regiões tropicais e a ocorrência da doença está diretamente relacionada com as condições climáticas durante este período.

Visando otimizar a aplicação de fungicida nos anos em que as condições climáticas são favoráveis à doença, assim como racionalizar o uso das pulverizações no caso das condições serem desfavoráveis, foi desenvolvido, na Flórida, um modelo de previsão para determinar a probabilidade de ocorrência da doença e auxiliar na aplicação de fungicidas

(Timmer & Zitko, 1993; Timmer & Brown, 2000). Porém, para que este modelo possa ser utilizado em outras regiões, é necessário que este seja avaliado para verificar sua aplicabilidade.

Apesar do fungicida benomyl apresentar resultados satisfatórios no controle da doença em campo, o fungo tem demonstrado baixa sensibilidade ao fungicida em experimentos 'in vitro' (Sonoda & Pelosi, 1988; Rodrigues & Léon, 1993; Goes & Kimati, 1994; Dias et al., 1995). Em razão desta baixa sensibilidade, alguns autores consideram que o fungo tenha adquirido resistência ao fungicida (Rodrigues et al., 1994).

O presente estudo teve como objetivos avaliar o modelo de previsão para controle da podridão floral (Timmer & Brown, 2000), na região de Itapetininga-SP, avaliar a existência de uma possível resistência adquirida de *C. acutatum* ao fungicida benomyl em pomares com diferentes históricos de uso do produto e determinar as bases para a eficiência do produto no controle da doença no campo.

## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Ocorrência e importância da doença**

A podridão floral, também conhecida como Queda Prematura de Frutos Jovens, é uma doença que tem limitado a produção citrícola em várias regiões produtoras do mundo. A primeira descrição de seu agente causal foi feita por Fagan (1979) em Belize, porém sintomas característicos da doença têm sido observados desde meados de 1950 nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas.

A ocorrência da doença está restrita às áreas de produção de citros das Américas, existindo relatos da sua ocorrência na Argentina, Belize, Costa Rica, Dominica, Ilhas Caribenhas, Jamaica, México, Panamá, República Dominicana, além de EUA e Brasil, causando prejuízos significativos especialmente quando as chuvas coincidem com o período de florada (Fagan, 1979; Denham, 1979; Orozco Santos & Gonzales Garza, 1986; McMillan & Timmer, 1989).

No Brasil, a podridão floral foi descrita primeiramente no Rio Grande do Sul por Porto et al. (1979), mas a doença ocorre praticamente em todos os estados

produtores como São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Amazonas, causando prejuízos variáveis dependendo, principalmente, da ocorrência de chuvas coincidindo com o pleno florescimento das plantas, o que estabelece condições extremamente favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (Goes & Kimati, 1997 b).

No estado de São Paulo, a doença foi observada pela primeira vez por Rossetti et al. (1981), sendo que perdas significativas foram verificadas na safra de 1977/78 em muitos pomares, principalmente nas regiões de Limeira, Araraquara e Cândido Rodrigues (Feichtenberger, 1991). Na safra 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.

Em condições extremamente favoráveis ao fungo, as perdas de produção causadas pela doença podem chegar a até 100% nos pomares mais seriamente afetados (Timmer, 1993). Devido à baixa taxa de fixação de frutos em relação à quantidade de flores formadas, assim como às perdas causadas por quedas naturais e outros fatores, estima-se que 5 a 6 frutos sejam perdidos para cada 100 cálices retidos formados como resultado do ataque da doença (Timmer & Zitko, 1995).

#### **4.2 Sintomatologia e agente causal**

Os sintomas da podridão floral aparecem como manchas de tonalidade marrom ou alaranjada nas pétalas, que posteriormente tornam-se de coloração salmão devido à

formação de frutificações do fungo (acérvulos) na superfície. Quando as condições ambientais são favoráveis, as lesões desenvolvem-se rapidamente, podendo afetar todo o tecido da pétala e, embora as flores abertas sejam mais suscetíveis à infecção, no caso de ataques severos, as lesões podem também ocorrer em botões florais fechados. As pétalas afetadas permanecem firmemente aderidas ao disco basal, adquirem consistência rígida, seca e coloração parda. Como resultado da infecção, observa-se o amarelecimento dos frutos recém-formados, que se destacam da base do ovário e caem, deixando os cálices aderidos ao ramo da planta, estrutura comumente conhecida como “estrela” ou “estrelinha”. Os cálices podem permanecer aderidos aos ramos por até 18 meses, sendo que estes, quando ficam com muitos cálices do ano anterior, não florescem e 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 & Brown, 2000).

O agente causal da podridão floral foi primeiramente descrito como uma estirpe virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Fagan, 1979). Em 1981, Rossetti 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.

Agostini et al. (1992) descreveram três linhagens de *C. gloeosporioides* presentes nos citros, que foram denominadas de acordo com as características morfológicas e patogênicas, como FGG (“fast-growing gray”), SGO (“slow-growing orange”) e 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, como apressório na superfície de folhas e frutos. 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. De acordo com os pesquisadores, sintomas típicos da podridão floral foram obtidos em flores de laranja 'Valência' (*Citros sinensis* Osbeck) e de 'Lima da Persia' (*C. limettioides* Tanaka) somente através da inoculação dos isolados do tipo SGO e KLA.

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

Devido à dificuldade em distinguir as linhagens SGO e KLA, que causam a podridão floral, da linhagem FGG, que sobrevive saprofiticamente sobre tecidos mortos ou senescentes, Agostini & Timmer (1992) desenvolveram um meio semi-seletivo para facilitar a distinção entre as estirpes. Através da adição de hidróxido de cobre e estreptomicina ao meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), seguido de incubação das colônias a 18°C por quatro dias, mais um dia a 27°C, os autores verificaram um maior desenvolvimento de colônias alaranjadas com esporulação abundante pela linhagem SGO, facilitando assim a separação das duas linhagens.



Brown et al. (1996), através de testes de patogenicidade, confirmaram, inicialmente, 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* (Brown et al., 1996). Tais resultados concordam com os estudos subsequentes efetuados no Brasil por Kuramae-Izioka et al. (1997) através da utilização de marcadores de RAPD.

Goes & Kimati (1997a), em estudo com isolados de *Colletotrichum* de citros provenientes de várias regiões do Brasil, 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 & Kimati (1997 b) confirmaram que apenas os isolados SGO e KLA causaram sintomas de podridão floral quando inoculados em flores de laranjeira ‘Pêra’.

#### **4.3 Epidemiologia e controle**

Os conídios de *C. acutatum* são produzidos em abundância nos acérvulos na superfície das pétalas infectadas e são dispersos pelos respingos de chuva para outras flores durante o período de floração. Após o período da florada, estes conídios são espalhados para as folhas, ramos e cálices ao redor, onde germinam e permanecem na forma de apressório, que são as estruturas primárias de sobrevivência entre floradas. Com o surgimento de novas flores e em condições de prolongado molhamento, o apressório germina

e emite uma hifa sobre a cutícula da folha, dando origem aos primeiros conídios, sem a formação de acérvulo. Dependendo das condições climáticas, as plantas de citros podem ter uma segunda floração e os conídios livres na superfície das folhas podem servir como fonte de inóculo adicional. Estes conídios são dispersos para as flores, onde penetram diretamente, sem a formação de apressório, para reiniciar o ciclo (Timmer et al., 1994; Zulfiqar et al., 1996). Assim, prolongados períodos de precipitação e umidade favorecem o desenvolvimento de epidemias, fazendo com que os conídios produzidos nas inflorescências se disseminem rapidamente por toda a planta, assim como para as plantas vizinhas (Denham & Waller, 1981; Timmer & Zitko, 1993). Segundo Agostini et al. (1993), 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 a longas distâncias. O orvalho e a neblina também são importantes, pois podem resultar 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.

Quanto à temperatura, verifica-se que esta não é tão importante quanto as 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).

As condições que propiciam a ocorrência de mais de uma florada, ou variedades que florescem mais de uma vez por ano, favorecem a ocorrência da doença e, por isso, as perdas são geralmente mais severas em regiões tropicais e em variedades com múltiplas floradas (Timmer et al., 1994). Segundo Feichtenberger (1991), no Brasil, a doença é mais severa em variedades que apresentam vários surtos de floração, como os limões verdadeiros, as limas ácidas ('Tahiti' e 'Galego') e a laranja 'Pêra', pois as infecções provocadas pelo fungo em floradas precoces contribuem para um aumento exponencial do inóculo que virá a atacar as floradas principais.

A doença pode ser muito severa quando o período de florescimento é prolongado e ocorrem chuvas durante a florada, sendo que as perdas podem chegar a 100% em algumas áreas, em certos anos. No estado de São Paulo, as perdas de produção são esporádicas na região citrícola ao norte, porém, as epidemias são mais frequentes e podem causar perdas quase todos os anos, por exemplo, na região de Itapetininga, considerada um novo pólo citrícola paulista. Na Flórida, a doença pode causar sérias epidemias em alguns anos e praticamente nenhuma perda em outros anos, enquanto 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 & Gonzáles Garza, 1986; Timmer & Brown, 2000; Peres et al., 2002).

O controle da podridão floral baseia-se na pulverização de fungicidas na época da florada, sendo que, o benomyl, o thiabendazole e o captafol foram os primeiros produtos citados como eficientes para o controle da doença (Denham & Waller, 1981; Fagan, 1984).

No Brasil, diversos estudos demonstraram que o fungicida benomyl, aplicado sozinho ou em combinações variadas, é considerado um dos produtos mais eficientes para o controle da doença (Porto et al, 1979; Souza Filho et al., 1979; Porto, 1981a; Porto, 1981b; Rossetti et al., 1981; Melo & Morais, 1991). Na Flórida, experimentos em condições de campo comprovam a eficiência do fungicida no controle da doença (Timmer & Zitko, 1991; Timmer & Zitko, 1992; Timmer & Zitko, 1996).

Uma das grandes dificuldades para o controle da podridão floral é a determinação do momento das pulverizações, já que a severidade da doença está diretamente relacionada com longos períodos de chuva durante o florescimento. Assim, as aplicações preventivas, embora possam ser efetivas, não garantem aumento de produção caso as condições para a ocorrência da doença não sejam favoráveis e, no caso da ocorrência de várias floradas, haveria a necessidade de um maior número de pulverizações, onerando o custo de produção.

Timmer & Zitko (1993) desenvolveram, na Flórida, um modelo de previsão para determinar a possibilidade de ocorrência da doença e auxiliar na aplicação de fungicidas. O modelo baseava-se, originalmente, no número de flores com sintomas observado em 20 árvores, essencialmente a quantidade de inóculo disponível no pomar e, na quantidade de chuva durante os últimos cinco dias. Avaliando este modelo durante três anos consecutivos, Timmer & Zitko (1996) verificaram que, em condições ambientais adequadas para o desenvolvimento da doença, ou seja, na ausência de fatores adversos, a aplicação de fungicida de acordo com o modelo de previsão reduziu de 25 a 80% a incidência da doença e aumentou o número de frutos em 30 a 600% em relação às plantas não tratadas, além de prevenir pulverizações desnecessárias. Os autores constataram, ainda, que a previsão da doença é mais

precisa quando o seu nível é baixo ou moderado, sendo que um conhecimento anterior do local é muito importante para a maior eficácia do método. Posteriormente, este modelo foi modificado para incluir a quantidade de horas de molhamento foliar após a ocorrência de chuvas (Timmer & Brown, 2000; Timmer et al., 2002).

O modelo de previsão para controle da podridão floral difere consideravelmente de outros modelos desenvolvidos para o controle de doenças causadas por *Colletotrichum* em outras culturas, já que a maioria destes baseia-se no molhamento foliar e temperatura durante o processo de infecção (Danneberger et al., 1984; Fitzell et al., 1984; Madden et al., 1993).

Madden et al. (1993) verificaram que a quantidade de chuva era um fator importante na dispersão do inóculo para o controle da antracnose do morangueiro, assim como parece ser também o caso do modelo desenvolvido por Timmer & Zitko (1996), porém, em outros sistemas, o inóculo pode estar disponível continuamente (Danneberger et al., 1984; Fitzell et al., 1984).

Para que o modelo de previsão possa ser utilizado em outras regiões, é necessário que ele seja avaliado para verificar sua aplicabilidade. Uma das diferenças em relação à Flórida, seria que, em algumas áreas tropicais, ou algumas variedades, as plantas tendem a florescer 2 a 3 vezes por ano e a doença ocorre todos os anos, fazendo com que o inóculo esteja presente em grande quantidade, praticamente em todas as árvores. Entretanto, o modelo de previsão considera que o fungo sobrevive nos períodos em que não há flores, na forma de apressório na superfície das folhas (Agostini et al., 1992; Agostini & Timmer, 1994; Zulfiqar et al., 1996), e assume que seriam necessários alguns eventos de chuva para aumentar o inóculo a partir destas fontes localizadas, enquanto que, nas condições citadas anteriormente,

uma ou duas chuvas, ou mesmo alta quantidade de molhamento foliar e orvalho, podem resultar em considerável infecção.

Além disso, mesmo na Flórida, o modelo apresenta algumas falhas. Em regiões com pouca quantidade de inóculo, a ocorrência de chuvas muito fortes (> 25 mm) associadas a uma frente fria, geralmente prediz a recomendação de uma pulverização. Porém, em algumas destas situações, a umidade seca rapidamente e a chuva é seguida por baixas temperaturas, sendo que a doença raramente se desenvolve. A inclusão do índice de molhamento foliar ajudou a minimizar esse problema, entretanto, o modelo é aditivo e, mesmo se o fator de molhamento foliar é zero, pulverizações desnecessárias podem ser indicadas.

Segundo Magarey et al. (2002), a utilização de sistemas de suporte para decisão de pulverização pode variar desde uma simples ferramenta para análise de dados, até um sistema computadorizado incorporando conhecimentos multidisciplinares. Seria desejável que um novo sistema fosse desenvolvido considerando os conhecimentos gerados com a utilização do modelo, assim como alguns fatores indiretos relacionados com a ocorrência da doença.

#### **4.4 Benomyl - Modo de ação e resistência de fungos**

O fungicida benomyl pertence ao grupo dos benzimidazoles, que compreende ainda os fungicidas carbendazim, tiabendazole, tiofanato e tiofanato metílico, que apresentam grande similaridade, tanto em seu aspecto fungistático como em suas estruturas químicas (Nene & Thaplyial, 1979).

O benomyl possui atividade sistêmica, com função erradicante e protetora contra um grande espectro de doenças causadas por fungos (Worting, 1979). No

Brasil, o fungicida tem seu emprego recomendado para a aplicação em parte aérea de diferentes culturas, incluindo os citros, sendo recomendado para o controle de diversas doenças, entre estas, a podridão floral (Feichtenberger et al., 1997; Compêndio, 1999). Diversos experimentos comprovam a eficácia do fungicida, sozinho ou em mistura, como um dos melhores produtos para o controle da doença em condição de campo (Timmer & Zitko, 1996; Timmer, 1998; Feichtenberger & Sposito, 2000).

Porém, apesar do benomyl apresentar um controle efetivo da podridão floral em condições de campo, os isolados de *C. acutatum* de citros demonstram baixa sensibilidade ao fungicida em experimentos 'in vitro' (Sonoda & Pelosi, 1988; Goes & Kimati, 1994; Dias et al., 1995). Em geral, o diâmetro das colônias é reduzido em cerca de 50% quando o fungo é cultivado em meio de cultura com benomyl na concentração de 1 µg/mL, mas o aumento na concentração do fungicida não reduz muito mais o crescimento. Por outro lado, o crescimento micelial de isolados de *C. gloeosporioides*, espécie comumente encontrada como saprófita nos pomares cítricos, é completamente inibido na concentração de 1 µg/mL de benomyl.

Os isolados de *C. acutatum* provenientes de outras culturas também têm demonstrado não serem muito sensíveis ao benomyl 'in vitro'. Bernstein et al. (1995) verificaram que o crescimento micelial de isolados de *C. acutatum* de pêssago, maçã e pecã foi reduzido entre 20 a 50% na concentração de 2 µg/mL de benomyl, enquanto os isolados de *C. gloeosporioides* foram completamente inibidos com a mesma concentração do fungicida. Devido a este comportamento, alguns estudos inclusive têm utilizado o fungicida como um componente do meio de cultura para estudo da sobrevivência do fungo no solo (Eastburn & Gubler, 1990), ou ainda, como uma ferramenta de auxílio para diferenciação entre as espécies

*C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Adaskaveg & Hartin (1997) verificaram que os isolados de *Colletotrichum* de amêndoa e pêssego, que demonstraram insensibilidade ao benomyl, tratavam-se de *C. acutatum*, enquanto que os isolados de mamão, sensíveis ao fungicida, eram *C. gloeosporioides*. Em revisão sobre as espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em diversas frutíferas, Freeman et al. (1998) consideram que, em geral, os isolados de *C. gloeosporioides* são altamente sensíveis ao benomyl em ensaios de laboratório, enquanto os isolados de *C. acutatum* são relativamente insensíveis ao fungicida.

Em razão desta baixa sensibilidade, alguns autores consideram que o fungo possa ter adquirido resistência ao fungicida (Rodrigues & Leon, 1993; Rodrigues et al., 1994). Em estudo recente, Goes & Kimati (1998) verificaram que a linhagem FGG de citros foi totalmente inibida quando cultivada em meio de cultura com benomyl na concentração de 1 µg/mL, enquanto os isolados das linhagens SGO e KLA apresentaram crescimento micelial até a concentração de 2500 µg/mL de benomyl. Os autores observaram ainda que os isolados SGO e KLA apresentaram uma tendência de estímulo à esporulação quando cultivados em BDA acrescido de benomyl a 10 µg/mL. Avaliando o crescimento micelial de 3 isolados de *C. acutatum* (SGO), obtidos de pomares com diferentes históricos quanto à regularidade de uso do fungicida, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os isolados, o que, segundo os autores, indica não se tratar resistência, e sim de insensibilidade do fungo ao produto.

Devido à grande dificuldade de controle da doença no campo, alguns produtores também especulam que o fungo esteja adquirindo resistência ao patógeno, o que pode estar mais relacionado com o momento de pulverização do que com a eficiência do produto. Timmer (1998), em experimento de avaliação de fungicidas em campo, seguindo as recomendações de pulverização de acordo com o modelo de previsão, verificou que, dentre os



fungicidas testados, o benomyl foi o que apresentou o melhor controle para a doença, diferindo significativamente quanto à porcentagem de flores infectadas, número de cálices e frutos retidos, em condições extremamente severas à doença.

A ocorrência de resistência a fungicidas devido ao uso repetido de um mesmo produto representa um sério problema no manejo de doenças, além de ser uma ameaça ao potencial comercial do produto. De acordo com Hewitt (1998), o termo resistência é utilizado quando o nível e a frequência de linhagens resistentes é tão alto que acaba resultando em um declínio notável da performance do fungicida no campo.

Segundo Koller & Scheinpflug (1987), quanto menor a especificidade do modo de ação de um fungicida na célula fúngica, menor será a chance de aparecerem linhagens resistentes do fungo. O fungicida benomyl apresenta modo de ação específico na célula fúngica, atuando apenas no núcleo, e interferindo na formação dos microtubos durante a mitose e meiose (Davidse, 1986).

A afinidade do benzimidazole com a tubulina é o principal fator que determina a atividade do fungicida no organismo, sendo que, quanto maior for a afinidade do benzimidazole com a tubulina, maior será a sensibilidade do organismo. Quando ocorre uma mutação que reduz a afinidade de ligação da tubulina com o benzimidazole, sem afetar o funcionamento normal da tubulina, dá-se origem a uma linhagem resistente (Davidse & Flach, 1977). A adaptabilidade das linhagens resistentes, além de ter estreita correlação com a forma de ação do fungicida, depende do gene que sofreu mutação para a resistência (Kimati, 1987).

A resistência de fungos ao benomyl é atribuída, em diversos estudos moleculares, a uma única mutação no gene da  $\beta$ -tubulina que ocorre, na maioria dos casos, no códon 198 ou 200. O nível de resistência ao benomyl pode variar conforme o aminoácido

substituído, sendo que a substituição do ácido glutâmico por alanina ou lisina, no códon 198, demonstrou estar associada a isolados altamente resistentes ao fungicida. As mutações podem ainda alterar de forma diferenciada a sensibilidade do fungo a outros fungicidas do grupo dos benzimidazoles (Koenraadt et al., 1992; Yarden & Katan, 1993; Albertini et al., 1999).

Um dos primeiros relatos da ocorrência de resistência ao benomyl decorre do início da década de 70, no controle de *Cercospora beticola* em beterraba, na Grécia (Hewitt, 1997). Existem ainda, diversos relatos no mundo sobre a ocorrência de resistência de fungos ao benomyl, inclusive envolvendo fungos do gênero *Colletotrichum* (Griffie, 1973). Em um levantamento recente sobre a sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de abacate e mamão a diferentes fungicidas, na África do Sul, Sanders et al. (2000) verificaram que 17,7% dos isolados testados apresentavam resistência ao fungicida benomyl.

No caso de outras doenças na cultura dos citros, com apenas uma aplicação por ano, observou-se a resistência de isolados resistentes de *Mycosphaerella citri* (Whiteside, 1980a) e de *Elsinoe fawcettii* (Whiteside, 1980b) ao benomyl, em pomares e viveiros da Flórida. Até mesmo na Nova Zelândia, país onde se produz uma pequena quantidade de cítricos, já foi observada a resistência de isolados de *E. fawcettii* ao benomyl (Tyson & Fullerton, 2001).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Avaliação do modelo de previsão para o controle da doença

O modelo de previsão para controle da podridão floral foi desenvolvido por Timmer & Zitko (1993) e, posteriormente, modificado pelos mesmos autores para a inclusão da variável de molhamento foliar (Timmer & Brown, 2000), conforme a seguinte equação, exemplificada ainda no Quadro 1.

$$y = - 13,63 + 1,16\sqrt{TD} + 0,48\sqrt{R} \times 100 + 1,77 \sqrt{LW} \times 5, \text{ onde:}$$

y = previsão da porcentagem de flores infectadas após 4 dias; entretanto, se  $y < 0$ , então  $y = 0$ ;

TD = número total de flores infectadas em 20 árvores; entretanto, se  $TD < 75$ , então  $TD = 0$ ;

R = chuva acumulada nos últimos 5 dias (mm);

LW = (número médio de horas de molhamento foliar nos últimos 5 dias) – 10

**Quadro 1.** Porcentagem prevista de flores infectadas utilizando a equação para vários níveis hipotéticos de chuva e doença. Valores cercados entre linhas indicam a necessidade de pulverização ( $Y > 20\%$ ).

| Número flores<br>com sintomas /<br>20 árvores (TD) | Chuva (R) | % Prevista de flores infectadas (Y) |    |    |    |
|--|-----------|-------------------------------------|----|----|----|
|  |           | Molhamento foliar (LW)              |    |    |    |
|  |           | 0                                   | 2  | 4  | 8  |
| 0  | 0         | 0                                   | 0  | 0  | 0  |
|  | 10        | 2                                   | 7  | 9  | 13 |
|  | 25        | 10                                  | 16 | 18 | 22 |
|  | 50        | 20                                  | 26 | 28 | 32 |
| 75   | 0         | 0                                   | 2  | 4  | 8  |
|  | 10        | 12                                  | 17 | 20 | 23 |
|  | 25        | 20                                  | 26 | 28 | 32 |
|  | 50        | 30                                  | 36 | 38 | 42 |
| 100  | 0         | 0                                   | 4  | 6  | 9  |
|  | 10        | 13                                  | 19 | 21 | 24 |
|  | 25        | 22                                  | 28 | 30 | 33 |
|  | 50        | 32                                  | 38 | 40 | 43 |
| 200  | 0         | 3                                   | 8  | 11 | 14 |
|  | 10        | 18                                  | 24 | 26 | 29 |
|  | 25        | 27                                  | 32 | 35 | 38 |
|  | 50        | 37                                  | 42 | 45 | 48 |
| 400  | 0         | 10                                  | 15 | 17 | 21 |
|  | 10        | 22                                  | 27 | 29 | 33 |
|  | 25        | 27                                  | 32 | 34 | 38 |
|  | 50        | 34                                  | 39 | 41 | 45 |

Os experimentos para avaliação do modelo de previsão para o controle da podridão floral (Timmer & Brown, 2000) foram conduzidos durante o período de floração dos citros, nos anos de 1999, 2000 e 2001, em diferentes talhões das variedades Pêra e Natal, consideradas as duas variedades com maior suscetibilidade à doença (Feichtenberger, 1991), em plantas com idade entre 5 e 11 anos de idade, selecionadas considerando-se a presença de cálices persistentes remanescentes do ano anterior, indicativo do potencial para a doença no ano corrente (Timmer & Zitko, 1995), no município de Itapetininga-SP. Os dados referentes aos talhões selecionados para os experimentos de 1999, 2000 e 2001 estão apresentados nos Quadros 2, 3 e 4, respectivamente.

**Quadro 2.** Datas de pulverização dos tratamentos para controle da podridão floral dos citros. Experimento 1, Itapetininga, 1999.

| <b>Talhão / Variedade (idade)</b> | <b>Data</b> | <b>Calendário</b> |
|-----------------------------------|-------------|-------------------|
| 21145 / Natal (8)                 | 31/07/99    | B + M             |
|                                   | 13/08/99    | B + M             |
| 32206 / Natal (8)                 | 30/07/99    | B + M             |
|                                   | 25/08/99    | B + M             |
| 43103 / Natal (7)                 | 30/07/99    | B + M             |
|                                   | 17/08/99    | B + M             |
| 24143 / Pêra (5)                  | 31/07/99    | B + M             |
|                                   | 13/08/99    | B + M             |
| 31128 / Pêra (8)                  | 30/07/99    | B + M             |
|                                   | 16/08/99    | B + M             |
| 43107 / Pêra (7)                  | 30/07/99    | B + M             |
|                                   | 17/08/99    | B + M             |

B + M= Benomyl (0,5 g/l) + Mancozeb (1,2 g /l)

Os tratamentos efetuados foram:

- 1) ‘Modelo’: pulverização quando a porcentagem prevista de flores infectadas exceder 20%, de acordo com o modelo de previsão (Timmer & Brown, 2000),
- 2) ‘Calendário’: pulverização seguindo o sistema calendário, ou seja, duas aplicações, sendo uma no estágio de cotonete e outra com 2/3 de flores abertas,
- 3) ‘Produtor’: pulverização de acordo com o esquema do produtor, efetuadas sempre após a ocorrência de chuvas com intensidade maior do que 10mm,
- 4) ‘Previsão de chuva’: pulverização quando havia uma previsão de chuva de mais de 10mm para os próximos 2 dias, no experimento de 2000; ‘PFD-FAD’: pulverização de acordo com sistema de previsão PFD-FAD (item 5.2), no experimento de 2001,
- 5) Testemunha, sem pulverização.

**Quadro 3.** Datas de pulverização do benomyl nos diferentes tratamentos para controle da podridão floral dos citros. Experimento 2, Itapetininga, 2000.

| <b>Talhão / Variedade (idade)</b> | <b>Data</b> | <b>Modelo</b> | <b>Produtor</b> | <b>Calendário</b> | <b>Previsão chuva</b> |
|-----------------------------------|-------------|---------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| 13452 / Pêra (10)                 | 05/09/00    | -             | B               | B                 | -                     |
|                                   | 15/09/00    | B             | B               | -                 | -                     |
|                                   | 16/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
|                                   | 18/09/00    | -             | -               | B                 | -                     |
|                                   | 22/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
| 21138 / Pêra (9)                  | 03/09/00    | -             | B               | B                 | -                     |
|                                   | 14/09/00    | B             | B               | -                 | -                     |
|                                   | 16/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
|                                   | 18/09/00    | -             | -               | B                 | -                     |
|                                   | 22/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
| 31157 / Pêra (9)                  | 07/09/00    | -             | B               | -                 | -                     |
|                                   | 12/09/00    | -             | B               | B                 | -                     |
|                                   | 16/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
|                                   | 18/09/00    | B             | -               | -                 | -                     |
|                                   | 22/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
|                                   | 26/09/00    | -             | -               | B                 | -                     |
| 13407 / Natal (10)                | 05/09/00    | -             | B               | B                 | -                     |
|                                   | 15/09/00    | B             | B               | -                 | -                     |
|                                   | 16/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
|                                   | 18/09/00    | -             | -               | B                 | -                     |
|                                   | 22/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
| 13454 / Natal (9)                 | 01/09/00    | -             | -               | B                 | -                     |
|                                   | 05/09/00    | -             | B               | -                 | -                     |
|                                   | 15/09/00    | B             | B               | -                 | -                     |
|                                   | 16/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
|                                   | 18/09/00    | -             | -               | B                 | -                     |
|                                   | 22/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
| 21145 / Natal (9)                 | 03/09/00    | -             | B               | B                 | -                     |
|                                   | 14/09/00    | B             | B               | -                 | -                     |
|                                   | 16/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |
|                                   | 18/09/00    | -             | -               | B                 | -                     |
|                                   | 22/09/00    | -             | -               | -                 | B                     |

B = Benomyl (0,5 g/l)

**Quadro 4.** Datas de pulverização dos tratamentos para controle da podridão floral dos citros. Experimento 3, Itapetininga, 2001.

| <b>Talhão / Variedade (idade)</b> | <b>Data</b> | <b>Modelo</b> | <b>Produtor</b> | <b>Calendário</b> | <b>PFD-FAD</b> |
|-----------------------------------|-------------|---------------|-----------------|-------------------|----------------|
| 12401 / Pêra (11)                 | 26/07/01    | C             | C + F           | -                 | -              |
|                                   | 01/08/01    | -             | -               | C                 | -              |
|                                   | 16/08/01    | -             | -               | C                 | -              |
|                                   | 24/08/01    | C             | C + F           | -                 | C              |
|                                   | 29/08/01    | -             | C + F           | -                 | -              |
| 12408 / Pêra (11)                 | 26/07/01    | C             | C + F           | -                 | -              |
|                                   | 13/08/01    | -             | -               | C                 | -              |
|                                   | 24/08/01    | C             | C + F           | -                 | C              |
|                                   | 27/08/01    | -             | -               | C                 | -              |
|                                   | 29/08/01    | -             | C + F           | -                 | -              |
| 13309 / Pêra (11)                 | 26/07/01    | C             | C + F           | -                 | -              |
|                                   | 07/08/01    | -             | -               | C                 | -              |
|                                   | 16/08/01    | -             | -               | C                 | -              |
|                                   | 24/08/01    | C             | C + F           | -                 | C              |
|                                   | 29/08/01    | -             | C + M           | -                 | -              |
| 22126 / Pêra (9)                  | 27/07/01    | C             | C + F           | -                 | -              |
|                                   | 14/08/01    | -             | -               | C                 | -              |
|                                   | 22/08/01    | C             | C + F           | -                 | C              |
|                                   | 29/08/01    | -             | C + M           | C                 | -              |
| 31157 / Pêra (10)                 | 27/07/01    | -             | C + F           | -                 | -              |
|                                   | 30/07/01    | C             | -               | -                 | -              |
|                                   | 24/08/01    | C             | -               | C                 | C              |
|                                   | 28/08/01    | -             | C + M           | -                 | -              |
|                                   | 01/09/01    | -             | -               | C                 | -              |
| 13415 / Natal (11)                | 26/07/01    | C             | C + F           | -                 | -              |
|                                   | 13/08/01    | -             | -               | C                 | -              |
|                                   | 24/08/01    | C             | C + F           | -                 | C              |
|                                   | 29/08/01    | -             | C + M           | C                 | -              |
| 21130 / Natal (11)                | 27/07/01    | C             | D               | -                 | -              |
|                                   | 24/08/01    | C             | D + M           | C                 | C              |
|                                   | 29/08/01    | -             | C + F           | -                 | -              |
|                                   | 01/09/01    | -             | -               | C                 | -              |

C = Carbendazim (0,5 g/l); C + F = Carbendazim (0,25 g/l) + Folpet (0,48 g/l); C + M = Carbendazim (0,38 g/l) + Mancozeb (1,2 g/l); D = Difenconazole (0,025 g/l); D + M = Difenconazole (0,025 g/l) + Mancozeb (1,0 g/l)

Para a utilização da equação para avaliação do modelo de previsão, efetuou-se a contagem do número de flores com sintomas em 20 plantas do tratamento, duas vezes por semana, sendo que as pulverizações foram efetuadas quando os seguintes critérios foram atingidos: a) o modelo previu uma porcentagem maior do que 20% de flores infectadas; b) a florada presente nas árvores representava uma porção significativa da produção; c) nenhuma aplicação de fungicida tinha sido efetuada nos últimos 7 dias. O tratamento de acordo com a previsão de ocorrência de chuva considerou os mesmos critérios citados acima nos itens b e c, além da previsão de uma chuva com mais de 15 mm nos próximos 2 dias.

Os dados climáticos de precipitação, temperatura e o molhamento foliar utilizados para a avaliação do modelo de previsão foram obtidos através de uma estação climática completa de aquisição de dados instalada na Fazenda Umuarama, município de Itapetininga/SP, que transmite os dados via sinal de radio a um sistema central computadorizado (Data Acquisition and Processing Software, Adcon Telemetry Advantage).

Todos os tratamentos foram pulverizados com turbo-atomizadores, marca Jacto, modelo Arbus 2000, com tanque de fibra de vidro com capacidade de 2000 litros, equipado com bicos D5-25, distribuídos nos dois lados da turbina. A pressão de trabalho foi de 1241 kPa (180 lbf/pol<sup>2</sup>). A vazão total do equipamento foi de 30 litros por minuto e o volume aplicado foi de 780 litros por hectare ou 2,5 litros por planta. Foram efetuadas de zero a três pulverizações em cada um dos experimentos, sendo que as datas e os produtos variaram de acordo com o ano, tratamento e estágio de desenvolvimento das flores (Quadros 2, 3 e 4).

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com duas fileiras de árvores utilizadas como repetição para cada tratamento. Cada parcela útil consistiu de dez árvores marcadas no centro de cada uma das fileiras, deixando-se uma fileira de plantas sem



pulverizar como bordadura entre cada tratamento. Cada bloco foi instituído por um talhão com plantas da mesma variedade e idade.

As avaliações foram efetuadas entre os meses de dezembro/janeiro subsequente à floração, após o período normal de queda fisiológica de frutos, através da contagem do número de cálices (“estrelinhas”) e de frutos retidos em 12 ramos por planta, sendo três ramos em cada um dos diferentes quadrantes, totalizando 20 plantas por tratamento.

No experimento de 2001, efetuou-se também a estimativa do número total de flores com sintomas por planta, em 20 plantas por tratamento. A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o número de flores com sintomas foi calculada através da fórmula  $AACPD = \sum \{[(y_1+y_2)/2] * \Delta t\}$ , onde  $y_1$  e  $y_2$  correspondem aos valores de índice de doença para duas avaliações sucessivas e  $\Delta t$ , o intervalo de tempo entre elas.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação entre médias pelo teste t de Waller-Duncan k-ratio a 5% de probabilidade, executado pelo software estatístico SAS (Statistical Analyses System). As variáveis analisadas foram número médio de cálices/12 ramos/planta, número médio de frutos retidos/12 ramos/planta, e AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença), para o número de flores com sintomas, no caso do experimento de 2001. Os tratamentos foram também comparados, utilizando-se o mesmo teste, porém considerando os diferentes talhões como repetições, em cada ano de experimento.

## **5.2 Desenvolvimento de um novo sistema de previsão para aplicação de fungicidas para controle da podridão floral (PFD-FAD)**

Para o desenvolvimento do novo sistema de previsão, denominado PFD-FAD (Postbloom Fruit Drop – Fungicide Application Decision), considerou-se, além dos fatores climáticos, que apresentam um efeito direto sobre a incidência da podridão floral, todos os fatores que podem ter um impacto indireto sobre o risco de ocorrência da doença e a necessidade de pulverização.

### **5.2.1 Estádio da florada**

O estágio da florada é o primeiro fator considerado no sistema, pois caso o estágio ou a intensidade não sejam apropriados, nenhuma pulverização será recomendada, independente do histórico, presença de inóculo ou fatores climáticos.

### **5.2.2 Valores de risco**

Para cada um dos fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento de uma epidemia, foram estimados valores representando o risco de acordo com a importância da situação no desenvolvimento da doença. Estes fatores foram divididos em três categorias principais envolvendo: (i) riscos pré-florada, relacionados com o histórico da doença na área, suscetibilidade da variedade e localização do plantio; (ii) riscos relacionados com as condições climáticas; (iii) riscos em relação a quantidade de inóculo disponível.

### 5.2.3 Riscos pré-florada

Os valores de risco pré-florada foram atribuídos considerando os fatores do plantio que podem afetar de alguma forma a incidência da doença e o desenvolvimento de uma epidemia, conforme os itens descritos a seguir e apresentados no Quadro 5.

- *Histórico da doença.* Considerando-se a ocorrência da doença no pomar, foram atribuídos pontos relacionados com o número de anos em que a doença causou perdas significativas nos últimos cinco anos.

- *Severidade da doença.* A severidade da doença no ano anterior foi estimada através do número de “estrelinhas” retidas nas plantas, provenientes da florada do ano anterior, em 20 plantas por talhão.

- *Suscetibilidade da variedade e número de floradas/ano.* A suscetibilidade da variedade e o número de floradas por ano foram considerados conjuntamente, sendo que os valores maiores foram atribuídos para as variedades mais suscetíveis cultivadas em áreas tropicais, onde as plantas tendem a florescer mais de uma vez por ano.

- *Condições fitossanitárias do pomar.* No caso de uma única florada, foram adicionados pontos de acordo com a presença de árvores doentes no pomar, que geralmente florescem fora de época e podem incrementar a quantidade de inóculo disponível.

- *Presença do inóculo.* Quando ocorrer infecção nas floradas precoces, geralmente flores isoladas e dispersas antes do advento da florada principal, pode também haver um incremento na quantidade de inóculo, aumentando assim o risco de infecção.

**Quadro 5.** Fatores pré-florada considerados e valores de risco atribuídos no desenvolvimento do sistema PFD-FAD.

| <b>Fator</b>   | <b>Condição</b>  | <b>Valor de risco</b> |
|--|--|-----------------------|
| <b>Incidência da doença nos últimos 5 anos</b>           |  |                       |
|  | Sem ocorrência   | 1                     |
|  | 1-2 anos   | 3                     |
|  | 3-4 anos   | 7                     |
|  | Todos os anos  | 10                    |
| <b>“Estrelinhas” por árvore</b>                          |  |                       |
|  | Nenhuma estrelinha   | 0                     |
|  | 1-100 estrelinhas/árvore   | 5                     |
|  | Mais de 100 estrelinhas/árvore   | 10                    |
| <b>Suscetibilidade da variedade e número de floradas</b> |  |                       |
|  | Variedade altamente suscetível – limões, limas ácidas, laranjas ‘Pêra’, ‘Natal e ‘Navel’ |                       |
|  | - Múltiplas floradas   | 10                    |
|  | - Uma florada  | 8                     |
|  | Variedade suscetível – Laranja ‘Valencia, tangelos                                       |                       |
|  | - Múltiplas floradas   | 10                    |
|  | - Uma florada  | 5                     |
|  | Variedade moderadamente suscetível – Laranja ‘Hamlim’ e outras laranjas precoces         |                       |
|  | - Múltiplas floradas   | 7                     |
|  | - Uma florada  | 3                     |
|  | Variedade tolerante - Pomelos  |                       |
|  | - Múltiplas floradas   | 3                     |
|  | - Uma florada  | 1                     |
| <b>Árvores doentes</b>                                   |  |                       |
|  | Nenhuma  | 0                     |
|  | Poucas, dispersas  | 1                     |
|  | Mais de 10%  | 2                     |
| <b>Sintomas de PFC antes da florada principal</b>        |  |                       |
|  | Sem doença na florada inicial  | 0                     |
|  | PFC presente na florada inicial  | 5                     |

Para o cálculo do valor total de risco pré-florada, os valores de: 1) incidência da doença, 2) “estrelinhas” por árvore, 3) suscetibilidade da variedade e número de floradas, 4) árvores doentes, e 5) sintomas antes da florada principal, foram somados e, uma

vez que os riscos pré-florada são menores, comparado com os riscos no decorrer da florada, o valor obtido foi dividido por 7, antes de ser adicionado aos demais valores de risco.

#### **5.2.4 Riscos climáticos**

- **Chuva.** A ocorrência de chuva durante a florada é essencial para o desenvolvimento de uma epidemia, pois além de prover umidade para a infecção, promove a dispersão dos conídios através do impacto das gotas sobre estas estruturas aderidas às pétalas. O sistema leva em consideração somente a quantidade de chuva, pois apesar do impacto da chuva ser também importante, geralmente estes dois fatores estão altamente correlacionados.

- **Molhamento foliar.** Para a ocorrência de infecção por *C. acutatum* são necessárias, no mínimo, 8 horas de molhamento foliar, sendo que a severidade da doença aumenta conforme aumenta o número de horas de molhamento.

- **Chuvas antes da florada.** Neste caso, somente devem ser consideradas as chuvas que ocorrerem após a formação dos primórdios florais, sendo que os valores de risco são assinalados de acordo com o número de eventos que ocorreram antes dos últimos 5 dias.

Os valores de risco para as condições climáticas foram considerados combinando os fatores de chuva e de molhamento foliar. No caso de ocorrência de chuvas com mais de 10 mm antes dos últimos cinco dias, foram adicionados pontos de acordo com o número de eventos de chuva (Quadro 6).

No modelo para previsão da doença (Timmer & Brown, 2000), a ocorrência de uma alta quantidade de chuva pode, ocasionalmente, resultar na predição de uma necessidade de aplicação de fungicida, mesmo que não haja presença de inóculo para ser disperso. No desenvolvimento deste sistema, ocorreram problemas similares e, por isso, foi

introduzida uma condição de forma que, “se o histórico da doença e o nível atual da doença são 0, então não se recomenda a pulverização.”

**Quadro 6.** Fatores climáticos considerados durante a florada e valores de risco atribuídos no desenvolvimento do sistema PFD-FAD.

| <b>Chuva<br/>(soma últimos 5 dias)</b>             | <b>Horas de molhamento foliar<br/>(média últimos 5 dias)</b> | <b>Valor de risco</b> |
|--|--|-----------------------|
| < 5 mm   | < 8 h  | 0                     |
|  | 9-16 h   | 1                     |
|  | > 16 h   | 2                     |
| 5-15 m   | < 8 h  | 1                     |
|  | 9-16 h   | 3                     |
|  | > 16 h   | 5                     |
| 15-25 mm   | < 8 h  | 1                     |
|  | 9-16 h   | 4                     |
|  | > 16 h   | 7                     |
| 25-50 mm   | < 8 h  | 1                     |
|  | 9-16 h   | 6                     |
|  | > 16 h   | 10                    |
| > 50 mm  | < 8 h  | 1                     |
|  | 9-16 h   | 8                     |
|  | > 16 h   | 10                    |
| <b>Número de eventos de chuva antes da florada</b> |  |                       |
|  | 0  | 0                     |
|  | 1-3 chuvas   | 1                     |
|  | > 3 chuvas   | 3                     |

### 5.2.5 Risco quanto ao nível de inóculo

A disponibilidade de inóculo é essencial para o desenvolvimento de uma epidemia. A quantidade de propágulos em folhas provenientes da florada anterior é geralmente baixa, com cerca de 1 a 100 apressórios por folha (Agostini & Timmer, 1994; Timmer & Zitko, 1995), enquanto que uma pétala infectada com presença abundante de acérvulos pode apresentar até 10 milhões de conídios por pétala. Assim sendo, enquanto não houver a presença de algumas poucas flores com sintomas, o risco de desenvolvimento de uma

epidemia é pequeno, mesmo se ocorrerem chuvas fortes e prolongados períodos de molhamento. Para que se tenha um bom controle da doença, a aplicação de fungicidas deve ser feita quando o número de flores doentes, que representam o nível de inóculo, é baixo, geralmente com até 1 a 10 flores infectadas por árvore. Uma vez que o nível de infecção excede 10 flores doentes por árvore, o controle da doença se torna extremamente difícil. Os valores de risco de acordo com a presença do inóculo foram atribuídos de acordo com a presença de sintomas no pomar, conforme Quadro 7.

**Quadro 7.** Valores de risco atribuídos de acordo com o nível de sintomas no pomar no desenvolvimento do sistema PFD-FAD.

| <b>Condição</b>                                      | <b>Valor de risco</b> |
|--|-----------------------|
| Sem a presença evidente de sintomas na florada atual | 0                     |
| Poucos focos dispersos no pomar                      | 5                     |
| Nível baixo (1-10 flores afetadas/árvore)            | 7                     |
| Muitas flores infectadas (> 10/árvore)               | 10                    |

### 5.2.6 Recomendação de pulverização

O valor total de risco para gerar uma recomendação de pulverização de fungicida em uma dada situação é obtido através da seguinte fórmula:

Valor total de risco = (Risco pré-florada / 7) + Riscos climáticos + Riscos quanto ao nível de inóculo.

O valor total de risco necessário para gerar uma aplicação de fungicida varia de acordo com a data da última pulverização. Caso uma aplicação de fungicida tenha sido efetuada nos últimos dias, o valor total de risco necessário para gerar uma pulverização será maior, conforme Quadro 8.

**Quadro 8.** Valor total de risco necessário para gerar uma recomendação de pulverização de acordo com a última aplicação de fungicida.

| <b>Condição</b>                                       | <b>Valor total de risco</b> |
|---|-----------------------------|
| Nenhuma pulverização de fungicida nos últimos 14 dias | > 11                        |
| Fungicida aplicado 10-13 dias atrás                   | > 13                        |
| Fungicida aplicado 7-9 dias atrás                     | > 15                        |
| Fungicida aplicado nos últimos 6 dias                 | Não pulverizar              |

### **5.3 Avaliação da resistência de isolados de *Colletotrichum* de citros ao fungicida benomyl**

O procedimento para o isolamento do fungo *C. acutatum* foi efetuado retirando-se fragmentos de tecido das flores infectadas, na região limítrofe entre a área lesionada e a área sadia, que passaram por uma desinfestação superficial com álcool etílico (70%) durante 30 segundos e hipoclorito de sódio (1,5%) por 60 segundos, seguido de duas lavagens em água destilada esterilizada para eliminação de resíduos. Os tecidos desinfestados foram transferidos para placas de Petri contendo BDA (batata-dextrose-ágar) com 50 µg/mL de oxitetraciclina, e estas foram incubadas durante cerca de 7 dias à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (Tuite, 1969).

As colônias típicas de *C. acutatum* desenvolvidas no meio de cultura, foram padronizadas através de cultivo monospórico. A conservação dos isolados foi feita a partir do micélio desenvolvido sobre papel de filtro esterelizado, colocado em pequenos envelopes, armazenados em caixas plásticas com sílica gel e mantidos em freezer à temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ .

A metodologia para isolamento de *C. gloeosporioides* seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém os fragmentos foram retirados do tecido de folhas sem sintomas.



### 5.3.1 Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* ao benomyl ‘in vitro’

#### 5.3.1.1 Efeito sobre o crescimento micelial

A avaliação do crescimento micelial dos isolados de *Colletotrichum* foi feita a partir da transferência de discos de micélio das colônias monospóricas, desenvolvidas em placas com BDA mantidas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por cerca de 7 dias, para o centro de placas contendo BDA com benomyl nas concentrações de 0, 0,1, 1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Benlate 50 PM). Foram avaliados três isolados de *C. acutatum*, três isolados de *C. gloeosporioides* sensíveis e três isolados de *C. gloeosporioides* resistentes ao benomyl, utilizando-se três placas para cada uma das concentrações testadas (Quadro 9).

As avaliações foram efetuadas após 7 dias de incubação à  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , através da medição da área das colônias desenvolvidas ( $\text{cm}^2$ ), sendo os resultados expressos em porcentagem de crescimento em relação ao controle e apresentados na forma de um gráfico demonstrativo do comportamento dos diferentes fenótipos de *Colletotrichum* de citros ao benomyl.

**Quadro 9.** Relação e procedência dos isolados de *Colletotrichum* spp. de citros utilizados para avaliação do efeito do benomyl sobre o crescimento micelial ‘in vitro’.

| Isolado    | Espécie                   | Procedência     | Fenótipo ao benomyl |
|------------|---------------------------|-----------------|---------------------|
| IM-2       | <i>C. acutatum</i>        | Immokalee, FL   | Pouco sensível      |
| GL-Pike    | <i>C. acutatum</i>        | Homestead, FL   | Pouco sensível      |
| SGR-FTP-1  | <i>C. acutatum</i>        | Frostproof, FL  | Pouco sensível      |
| TH-4       | <i>C. gloeosporioides</i> | Vero Beach, FL  | Sensível            |
| DIL-ARK-1  | <i>C. gloeosporioides</i> | Avon Park, FL   | Sensível            |
| RL-HCT5-2M | <i>C. gloeosporioides</i> | Haines City, FL | Sensível            |
| TH-2       | <i>C. gloeosporioides</i> | Vero Beach, FL  | Resistente          |
| DIL-ARK-2  | <i>C. gloeosporioides</i> | Avon Park, FL   | Resistente          |
| RL-BC6-Y2  | <i>C. gloeosporioides</i> | Haines City, FL | Resistente          |

### **5.3.1.2 Efeito sobre a germinação de conídios em meio sólido**

Para a avaliação do efeito do benomyl sobre a germinação de conídios, os mesmos isolados de *Colletotrichum* citados no item 5.3.1.1. foram cultivados em placas de Petri com BDA, mantidas em incubadora a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por cerca de 7 dias. Após este período, as colônias foram lavadas com cerca de 10 mL de água destilada esterilizada, a suspensão de conídios foi coletada e a sua concentração foi ajustada para cerca de  $5 \times 10^2$  conídios/mL.

Uma alíquota de cerca de 100 $\mu$ l da suspensão de conídios foi espalhada na superfície de três placas de Petri contendo BDA com benomyl nas concentrações de 0, 0,1 e 1  $\mu\text{g/mL}$ . Cada experimento foi conduzido quatro vezes, utilizando-se três placas para cada uma das concentrações testadas.

As avaliações foram efetuadas após três dias de incubação a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , através da contagem do número de colônias desenvolvidas e da medição do diâmetro de 10 colônias para cada uma das placas, em cada uma das concentrações testadas. Os resultados foram expressos como porcentagem do número e da área das colônias desenvolvidas, em relação à testemunha.

### **5.3.1.3 Efeito sobre a germinação de conídios em meio líquido**

O efeito do benomyl sobre a germinação de conídios foi avaliado para os isolados de *C. acutatum* Maran, Mayo e CS-1, que foram cultivados, inicialmente, em placas de Petri com BDA mantidas em incubadora a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por cerca de 7 dias. Os conídios das colônias desenvolvidas foram deslocados mediante a adição de água destilada esterilizada nas placas e a suspensão obtida foi contada com o auxílio de um hemocitômetro.

O experimento foi conduzido utilizando-se três placas de Petri, para cada um dos isolados, contendo cerca de 20 mL de BD (batata-dextrose), onde se adicionou uma alíquota de 1 mL da suspensão de conídios, ajustada para a concentração final de  $10^4$  conídios/mL, seguido de uma alíquota de 1 mL do fungicida benomyl, nas concentrações de 0, 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

As placas foram mantidas em incubadoras a  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e as avaliações foram efetuadas 16 horas após a aplicação do benomyl, através da contagem do número de conídios germinados para cada 20 conídios examinados em cada placa, e da medição do comprimento do tubo germinativo para 10 conídios examinados em cada placa. Os resultados foram expressos como porcentagem de germinação e do comprimento do tubo germinativo, em relação à testemunha.

#### **5.3.1.4 Efeito sobre o crescimento do tubo germinativo**

O efeito do benomyl sobre o crescimento do tubo germinativo foi avaliado para os mesmos isolados descritos no item 5.3.1.3, os quais foram cultivados, inicialmente, seguindo a mesma metodologia.

O experimento foi igualmente conduzido em placas de Petri contendo cerca de 20 mL de BD, adicionando-se uma alíquota de 1 mL da suspensão de conídios ajustada para a concentração final de  $10^4$  conídios/mL, porém, o fungicida benomyl, nas concentrações de 0, 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , foi aplicado 12 horas após a deposição dos conídios.

As placas foram incubadas a  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e as avaliações foram efetuadas 12 horas após a aplicação do fungicida, através da medição do comprimento do tubo

germinativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de comprimento comparado ao controle.

### **5.3.2 Sensibilidade ‘in vitro’ de isolados de *Colletotrichum* provenientes de pomares com diferentes históricos de uso de benomyl**

Para a avaliação da sensibilidade de isolados de *C. acutatum* ao fungicida benomyl foram coletados 20 isolados provenientes de flores com sintomas característicos de podridão floral, em 17 pomares com históricos diferentes quanto à regularidade de uso do fungicida, no Brasil e na Florida (Quadro 10), totalizando 340 isolados. As categorias de acordo com o histórico de uso foram divididas considerando pelo menos uma aplicação de benomyl nos últimos cinco anos, conforme segue: a) uso intenso: todos os anos, b) uso moderado: 3-4 anos, c) pouco uso: 1-2 anos, d) nunca utilizado.

Os isolados monospóricos foram utilizados para a avaliação do crescimento micelial a partir da transferência de discos de micélio de colônias com cerca de 7 dias, desenvolvidas em incubadoras a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , para o centro de placas contendo BDA com benomyl, dissolvido em etanol 95%, nas concentrações de 0, 0,1 e 1.0  $\mu\text{g}$  i.a./mL. Foram utilizadas três placas para cada uma das concentrações testadas e cada experimento foi conduzido duas vezes.

As avaliações foram efetuadas após 7 dias de incubação a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , através da medição da área das colônias desenvolvidas ( $\text{cm}^2$ ), sendo os resultados expressos em porcentagem de crescimento em relação ao controle. Os resultados obtidos foram comparados quanto à diferença entre os históricos de uso do benomyl, quanto ao país de procedência dos isolados, pomar de procedência e experimentos, assim como as possíveis

interações entre estes fatores, sendo efetuada a análise de variância através do procedimento GLM, executado pelo software estatístico SAS (Statistical Analyses System). Para o cálculo dos valores F, a média dos quadrados foi dividida pelo denominador apropriado para cada caso e foram utilizados os valores de Soma dos Quadrados Tipo III.

Dentre os 17 pomares estudados, em 7 deles foram também coletados 20 isolados de *C. gloeosporioides* a partir de folhas assintomáticas (Quadro 10). O cultivo dos isolados em meio de cultura com as diferentes concentrações de benomyl foi efetuado seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

**Quadro 10.** Relação, procedência e histórico dos isolados de *Colletotrichum* spp. em relação a regularidade de uso do benomyl

| <b>Isolado</b>       | <b>Procedência (cidade, estado, país)</b> | <b>Utilização de benomyl</b> |
|----------------------|---|------------------------------|
| SLG-MGG-(1 a 20) *   | Mogi Guaçu – SP, Brasil                   | Uso intenso                  |
| OCO-ARC-(1 a 20)     | Arcadia – FL, Estados Unidos              | Uso intenso                  |
| STF-FTP-(1 a 20) *   | Frostproof – FL, Estados Unidos           | Uso intenso                  |
| CIT-ITP-(1 a 20)     | Itapetininga - SP, Brasil                 | Uso moderado                 |
| SGR-FTP-(1 a 20)     | Frostproof – FL, Estados Unidos           | Uso moderado                 |
| SFL-MGG-(1 a 20)     | Mogi Guaçu - SP, Brasil                   | Uso moderado                 |
| CIT-CA-ITP-(1 a 20)* | Itapetininga - SP, Brasil                 | Uso moderado                 |
| CLR-IMK-(1 a 20)     | Immokalee – FL, Estados Unidos            | Pouco uso                    |
| MRN-IND-(1 a 20)     | Indiantown – FL, Estados Unidos           | Pouco uso                    |
| ALB-IND-(1 a 20)     | Indiantown – FL, Estados Unidos           | Pouco uso                    |
| FSH-MGG-(1 a 20)     | Mogi Guaçu - SP, Brasil                   | Pouco uso                    |
| RCO-IMK-(1 a 20)*    | Immokalee – FL, Estados Unidos            | Pouco uso                    |
| CIA-BTU-(1 a 20)*    | Botucatu - SP, Brasil                     | Pouco uso                    |
| SRL-FTP-(1 a 20)*    | Frostproof – FL, Estados Unidos           | Nunca utilizado              |
| FSH-CLB-(1 a 20)*    | Colômbia - SP, Brasil                     | Nunca utilizado              |
| FZR-PRD-(1 a 20)*    | Pardinho - SP, Brasil                     | Nunca utilizado              |
| VTP-IND-(1 a 20)     | Indiantown – FL, Estados Unidos           | Nunca utilizado              |

\* Pomares onde também foram coletados isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*

### 5.3.3 Sequenciamento parcial do gene $\beta$ -tubulina de isolados de *Colletotrichum*

*Extração de DNA.* Para extração do DNA genômico, os isolados de *Colletotrichum* foram transferidos para tubos de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido batata-dextrose e incubados em estufas tipo B.O.D. a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por cerca de 5 dias. Os micélios desenvolvidos foram retirados dos tubos com o auxílio de uma pinça estéril, transferidos para tubos tipo 'Eppendorf' 2,0 mL e colocados para secar em SpeedVac até a completa liofilização. Após a secagem, os micélios foram triturados com nitrogênio líquido e o pó obtido foi transferido para tubos de 1,5 mL, onde se adicionou cerca de 700  $\mu\text{L}$  de tampão de extração [100 mM Tris (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 500 mM NaCl, 1% dodecil sulfato de sódio]. O homogeneizado foi incubado a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos em banho-maria e, em seguida, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio (5 M) às amostras, as quais, posteriormente, foram agitadas e colocadas em gelo por 20 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 g e o sobrenadante extraído foi transferido para tubos novos, adicionando-se um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (25:1). As amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 14.000 g e o sobrenadante aquoso foi removido para novos tubos, onde foi adicionado um volume de isopropanol para precipitar o DNA. Após nova centrifugação por 5 minutos a 14.000 g, os "pellets" obtidos foram lavados com 1 mL de etanol 70% e, secos à vácuo (SpeedVac). O DNA obtido foi dissolvido em 1/10 TE (10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA) e tratado com 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNase DNase-free (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 10 horas. Todas as amostras de DNA foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização do PCR (reação da polimerase em cadeia).

Para a extração de DNA foram selecionados 12 isolados de *Colletotrichum*, sendo: 4 isolados de *C. acutatum*, 3 isolados de *C. gloeosporioides* sensíveis ao benomyl ‘in vitro’ e 5 isolados de *C. gloeosporioides* resistentes ao benomyl ‘in vitro’ (Quadro 11). Dentre os isolados resistentes, dois deles foram selecionados no laboratório, através da transferência de cerca de 100 µL de uma suspensão de conídios, na concentração de 10<sup>4</sup> conídios/mL, para a superfície de 5 placas de Petri contendo BDA com benomyl na concentração de 10 µg/mL. As placas foram incubadas em B.O.D. a 25°C ± 1°C por dois dias, quando foram selecionadas as colônias resistentes desenvolvidas no meio de cultura.

*Desenvolvimento de “primers” para amplificação do gene β-tubulina.*

Para amplificar parcialmente o gene da β-tubulina dos isolados de *Colletotrichum*, foram desenvolvidos “primers” utilizando-se o programa Primer 3 Selection. Os “primers” foram desenhados de forma a amplificar uma região do gene, com cerca de 500 bp, entre os códons 198 e 200, onde normalmente ocorrem as mutações relacionadas ao desenvolvimento de resistência ao benomyl em várias espécies de fungos (Koenraadt et al., 1992; Yarden & Katan, 1993; Buhr & Dickman, 1994; Albertini et al., 1999) e foram denominados TB2R (5'-TGAGCTCAGGAACRCTGACG - 3') e TB2L (5' - GYTTCCAGATYACCCACTCC – 3').

*Reação de PCR e sequenciamento.* Os “primers” TB2R e TB2L foram sintetizados pela Operon Technologies Inc., Alameda, CA. Para a reação de PCR foi utilizado um volume de 50 µL (100 ng DNA genômico, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U Taq polymerase, 0,2 mM dNTPs, 10 mM Tris-HCl e 0,2 µM de cada primer), seguindo metodologia descrita por Mills et al. (1992), com exceção da temperatura de anelamento que foi 55°C. A reação de PCR foi realizada no termociclador MJ Research, com programação de 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 1 minuto, anelamento de 55°C por 1 minuto

e extensão de 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Depois da amplificação, 20 µl do produto da reação foram misturados com 4 µL de tampão de carregamento (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) e 4 µl do marcador 100 bp Ladder (Gibco BRL Life Technologies, Inc.) foi utilizado como padrão do peso molecular. As amostras foram separadas em gel de agarose a 1,5% em TBE, numa voltagem de aproximadamente 5 V/cm de gel. O gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos amplificados foram visualizados em transluminador UV. Após a visualização dos fragmentos, os produtos do PCR foram purificados através de colunas de purificação MicroSpin S-400 (Pharmacia). Para a reação de sequenciamento foi utilizado 200 ng/µL do produto de PCR purificado e 10 pmoles dos “primers” TB2R e TB2L, seguindo o protocolo fornecido com o BigDye Terminator (Perkin Elmer). O sequenciamento foi efetuado em um sequenciador modelo ABI 377 DNA sequencer e a qualidade das sequências obtidas foi analisada através do software Sequencher 2.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). O alinhamento das sequências foi efetuado através do programa Clustal X 1.8.

**Quadro 11.** Origem e característica dos isolados de *Colletotrichum* spp. utilizados para o sequenciamento parcial do gene da  $\beta$ -tubulina.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>            | <b>Hospedeiro</b> | <b>Fenótipo ao benomyl</b> |
|----------------|---------------------------|-------------------|----------------------------|
| CA-7           | <i>C. acutatum</i>        | Citros            | Pouco sensível             |
| CA-15          | <i>C. acutatum</i>        | Citros            | Pouco sensível             |
| CA-26          | <i>C. acutatum</i>        | Citros            | Pouco sensível             |
| CA-41          | <i>C. acutatum</i>        | Citros            | Pouco sensível             |
| CG-5           | <i>C. gloeosporioides</i> | Citros            | Sensível                   |
| CG-9           | <i>C. gloeosporioides</i> | Citros            | Sensível                   |
| CG-12          | <i>C. gloeosporioides</i> | Citros            | Sensível                   |
| CGR-5          | <i>C. gloeosporioides</i> | Citros            | Resistente (lab)           |
| CGR-9          | <i>C. gloeosporioides</i> | Citros            | Resistente (lab)           |
| CGR-12         | <i>C. gloeosporioides</i> | Citros            | Resistente                 |
| CGR-14         | <i>C. gloeosporioides</i> | Blueberries       | Resistente                 |
| CGR-23         | <i>C. gloeosporioides</i> | Blueberries       | Resistente                 |



## 5.4 Atividade do benomyl no controle da podridão floral

### 5.4.1 Atividade do benomyl no controle pré e pós infecção

O efeito do benomyl no controle pré e pós infecção de *C. acutatum* foi determinado em plantas entre 4 a 8 anos de idade cultivadas em vasos mantidos em casa de vegetação. Foram realizados 4 experimentos distintos, sendo que os experimentos 1 e 2 foram conduzidos em plantas de laranja ‘Valencia’ (*Citrus sinensis* L.), o experimento 3 em tangelo ‘Orlando’ (*C. paradisi* Macf. x *C. reticulata* Blanco) e o experimento 4 em híbridos de tangerinas (*C. reticulata*).

Os tratamentos consistiram da pulverização de Benlate 50 PM (1,2g p.c./litro) 24 horas antes e em intervalos de 24 até 72 horas após a inoculação do fungo, sendo que o tratamento testemunha consistiu da pulverização das flores apenas com água. Para cada tratamento, foram selecionados seis ramos com flores em estágios semelhantes de desenvolvimento, os quais foram individualmente marcados e efetuada a contagem do número total de flores por ramo.

O inóculo foi obtido a partir de colônias do isolado SGR-FTP-1 cultivadas em placas de Petri com BDA, mantidas em incubadora a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por cerca de 7 dias. Após este período, as colônias foram lavadas com cerca de 10 mL de água destilada e a suspensão de conídios obtida foi contada através de um hemocitômetro, ajustando-se a concentração para aproximadamente  $10^5$  conídios/mL.

As inoculações foram efetuadas através da pulverização da suspensão de conídios nas flores dos ramos marcados com o auxílio de um spray manual com pressurizador. Após a inoculação, os ramos foram cobertos com sacos plásticos para manutenção da umidade e mantidos em temperatura ambiente (18 a  $25^{\circ}\text{C}$ ), por cerca de 16

horas. Após este período, os plásticos foram removidos e as plantas mantidas em casa de vegetação.

As avaliações foram efetuadas após o aparecimento das lesões características de podridão floral, através da contagem do número de flores com sintomas, cerca de 5 a 7 dias após a inoculação, e da contagem do número de cálices retidos por ramo cerca de um mês após a inoculação.

#### **5.4.2 Efeito do benomyl na produção de conídios de *C. acutatum***

O efeito do benomyl na produção de conídios foi determinado em dois experimentos, com dez pétalas destacadas de laranja em cada, inoculadas com *C. acutatum* em casa de vegetação.

No primeiro experimento, as pétalas infectadas ainda não continham conídios e apresentavam cerca de 50 a 60% da superfície da área com necrose, enquanto no segundo experimento, as pétalas já continham conídios, que foram lavados com água destilada para a sua remoção, e apresentavam cerca de 75 a 80% da superfície de área com necrose.

As pétalas selecionadas foram colocadas em placas de Petri sobre papel de filtro umedecido e o tratamento foi efetuado através da pulverização de benomyl (1,2 g/litro), comparando-se com uma testemunha pulverizada apenas com água. Após a pulverização, as pétalas foram mantidas em temperatura ambiente (22 a 25°C) por um período de aproximadamente 16 horas, quando efetuou-se a lavagem destas em tubos com cerca de 10 mL de água destilada, vortexados rapidamente para a retirada dos conídios. A concentração de conídios foi determinada com o auxílio de um hemocítômetro e os resultados expressos como número de conídios produzidos por pétala.

### 5.4.3 Efeito do benomyl na viabilidade de esporos de *C. acutatum*

O efeito do benomyl na viabilidade dos esporos de *C. acutatum* foi determinado em pétalas destacadas de laranja doce com sintomas de podridão floral e com presença abundante de conídios. Os experimentos foram conduzidos três vezes, utilizando-se dez pétalas para cada tratamento.

As pétalas foram colocadas em placas de Petri sobre filtro de papel umedecido e o tratamento foi efetuado através da pulverização do fungicida benomyl (1,2 g/litro), comparando-se com o tratamento testemunha onde aplicou-se somente água. Após a aplicação do fungicida, as pétalas foram mantidas em temperatura ambiente por um período de aproximadamente 16 horas, quando efetuou-se a lavagem dos conídios com água destilada esterilizada. Em seguida, contou-se o número de conídios na suspensão, seguido de diluição até às concentrações de 100 e 1000 conídios/mL.

Cerca de 100  $\mu$ L das suspensões diluídas de conídios foram espalhadas na superfície de 3 placas de Petri contendo BDA, para cada uma das pétalas. As avaliações foram efetuadas após 3 dias de incubação a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , através da contagem do número de colônias desenvolvidas, sendo os resultados expressos como número de conídios viáveis por pétala.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1. Avaliação do modelo de previsão para o controle da doença**

#### **6.1.1 Experimento 1 – Ano de 1999**

No experimento realizado no ano de 1999, as condições climáticas durante o período de floração, entre meados de julho e setembro, estiveram desfavoráveis à ocorrência da podridão floral devido à condição extremamente seca (Apêndice, Quadro 26). Desta forma, o modelo de previsão para o controle da doença não atingiu em nenhum momento uma porcentagem prevista de flores infectadas maior do que 20%, não indicando assim, a necessidade de pulverização.

No tratamento para controle da doença de acordo com a escolha do produtor, também não foi efetuada nenhuma pulverização devido às condições climáticas não favoráveis e também pela opção por uma redução de custos devido ao baixo preço da fruta no mercado. Assim sendo, somente o tratamento de acordo com o sistema ‘calendário’ foi pulverizado com duas aplicações de benomyl + mancozeb, comparando-se com a testemunha sem pulverização.

Os resultados obtidos foram comparados entre os tratamentos dentro de cada talhão separadamente (Quadro 12) e considerando os talhões como repetições (Quadro 13). Em ambas situações não foram verificadas diferenças significativas em relação ao número de frutos ou de cálices retidos, com exceção do talhão 31128, onde foram verificadas diferenças no número de cálices, porém, estas não refletiram em uma maior produtividade de frutos.

Pode-se considerar, portanto, em termos econômicos, que as pulverizações para o controle da podridão floral seguindo o sistema calendário foram desperdiçadas no ano de 1999, já que as condições não foram favoráveis à doença e não foi verificado nenhum aumento de produtividade.

**Quadro 12.** Efeito da aplicação de benomyl + mancozeb seguindo o esquema de calendário para o controle da podridão floral, sobre o número de cálices e de frutos retidos. Experimento 1, Itapetininga, 1999.

| <b>Talhão /<br/>variedade<br/>(idade)</b> | <b>Tratamento</b> | <b>Número<br/>Pulverizações</b> | <b>Cálices retidos /<br/>12 ramos / planta</b> | <b>Frutos /<br/>12 ramos /<br/>planta</b> |
|---|-------------------|---------------------------------|--|---|
| 21145 / Natal (8)                         | Calendário        | 2                               | 1  | 43  |
|   | Testemunha        | 0                               | 1  | 52  |
| 32206 / Natal (8)                         | Calendário        | 2                               | 18   | 38  |
|   | Testemunha        | 0                               | 39   | 33  |
| 43103 / Natal (7)                         | Calendário        | 2                               | 9  | 22  |
|   | Testemunha        | 0                               | 5  | 21  |
| 24143 / Pêra (5)                          | Calendário        | 2                               | 12   | 24  |
|   | Testemunha        | 0                               | 18   | 22  |
| 31128 / Pêra (8)                          | Calendário        | 2                               | 62 a   | 32  |
|   | Testemunha        | 0                               | 46 b   | 30  |
| 43107 / Pêra (7)                          | Calendário        | 2                               | 2  | 28  |
|   | Testemunha        | 0                               | 1  | 27  |

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste t de Waller-Duncan k-ratio, a 5% de probabilidade.

**Quadro 13.** Número médio de cálices e de frutos retidos após tratamento com benomyl + mancozeb seguindo o esquema de calendário para o controle da podridão floral. Experimento 1, Itapetininga, 1999.

| <b>Tratamento</b> | <b>Número pulverizações</b> | <b>Cálices retidos / 12 ramos / planta</b> | <b>Frutos / 12 ramos / planta</b> |
|-------------------|-----------------------------|--|-----------------------------------|
| Calendário        | 2                           | 17   | 29                                |
| Testemunha        | 0                           | 18   | 29                                |
|                   |                             | NS   | NS                                |

\* NS = Não significativo, a 5% de probabilidade

### 6.1.2 Experimento 2 – Ano de 2000

A floração dos citros na região de Itapetininga-SP, no ano de 2000, foi tardia em comparação com anos anteriores, devido à condição de seca em todo o estado de São Paulo, durante os meses julho e agosto (Apêndice, Quadro 27). Com a ocorrência de chuvas no final do mês de agosto e a elevação das temperaturas no início de setembro, a floração desenvolveu-se rapidamente e no final do mês de setembro, praticamente não haviam mais flores nos pomares desta região.

De acordo com o modelo de previsão para controle da podridão floral, houveram dois períodos em que as condições climáticas foram favoráveis à doença. No primeiro período, compreendido entre os dias 01/09 e 05/09, havia um número pequeno de flores abertas, sem a presença de flores com sintomas nas 20 plantas inspecionadas por talhão, e portanto, apesar das condições climáticas favoráveis, a pulverização não foi efetuada devido ao estágio fenológico de desenvolvimento das flores. O segundo período em que o modelo indicou a necessidade de controle foi entre os dias 13/09 e 16/09, sendo que, neste caso, as pulverizações foram efetuadas em todas as quadras. No tratamento seguindo o sistema ‘calendário’, foram efetuadas duas aplicações de benomyl, uma no estágio de cotonete e outra com cerca 2/3 das flores abertas, sendo que as datas variaram de acordo com o estágio de

desenvolvimento floral nas diferentes quadras e variedades. No tratamento de acordo com a escolha do produtor foram efetuadas duas pulverizações, sendo que estas coincidiram com os dois momentos favoráveis a doença de acordo com o modelo. Já no tratamento seguindo a previsão de ocorrência de chuvas, foram efetuadas duas pulverizações, porém, em nenhuma das duas datas previstas, as previsões foram confirmadas (Apêndice, Quadro 27).

Com exceção dos talhões 21138 e 21145, em todos os demais talhões, os tratamentos pulverizados apresentaram uma quantidade menor de cálices retidos do que a testemunha não pulverizada (Quadro 14). Entretanto, somente foram verificadas diferenças significativas em relação à testemunha no talhão 13454, para todos os tratamentos pulverizados, nos talhões 13452 e 31157, para o tratamento calendário, e no talhão 13407, para o tratamento de acordo com o produtor.

As aplicações de fungicida propiciaram um aumento da produção de frutos em praticamente todas as situações, comparando-se com a testemunha não pulverizada. Porém, somente foram verificadas diferenças significativas em relação à testemunha, no tratamento seguindo a previsão de chuva, no talhão 13452, e no tratamento segundo a escolha do produtor, no talhão 13454 (Quadro 14).

Quando se considerou a média de todas as quadras, os tratamentos de acordo com a escolha do produtor e o tratamento calendário apresentaram um menor número significativo de cálices retidos, enquanto o tratamento modelo não diferiu destes e nem da testemunha, devendo-se porém considerar que, neste caso, foi efetuada apenas uma aplicação de fungicida. O tratamento seguindo a previsão de chuva não diferiu da testemunha, apesar de terem sido efetuadas duas pulverizações de fungicida (Quadro 15).

Em relação a quantidade de frutos, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, podendo-se considerar que, apesar das condições climáticas terem favorecido o aparecimento da doença, e de terem sido verificadas algumas diferenças quanto ao número de cálices retidos, as condições não foram severas o suficiente para causar perdas significativas de produção (Quadro 15). Estes resultados indicam que as pulverizações para o controle da doença no ano de 2000 poderiam ter sido suprimidas, sem que isso viesse a causar prejuízos significativos na produção de frutos.

Quanto às diferenças entre as duas variedades, verifica-se que a ‘Pêra’ apresentou uma quantidade 29% menor de frutos e 48% maior de “estrelinhas” do que a ‘Natal’. Em condições favoráveis à doença, a variedade Pêra tem demonstrado ser mais suscetível ao ataque da doença, provavelmente por apresentar mais de uma florada por ano, o que favorece a manutenção do inóculo na planta entre um ano e outro.



**Quadro 14.** Efeito de diferentes esquemas de aplicação de benomyl para o controle da podridão floral sobre o número de cálices e de frutos retidos. Experimento 2, Itapetininga, 2000.

| <b>Talhão /<br/>variedade<br/>(idade)</b> | <b>Tratamento</b> | <b>Número<br/>pulverizações</b> | <b>Cálices retidos /<br/>12 ramos /<br/>planta</b> | <b>Frutos /<br/>12 ramos /<br/>planta</b> |
|---|-------------------|---------------------------------|--|---|
| 13452 / Pêra (10)                         | Modelo PFD        | 1                               | 30 ab  | 28 ab                                     |
|   | Produtor          | 2                               | 14 ab  | 24 ab                                     |
|   | Calendário        | 2                               | 10 b   | 28 ab                                     |
|   | Previsão          | 2                               | 27 ab  | 34 a                                      |
|   | Testemunha        | 0                               | 42 a   | 22 b                                      |
| 21138 / Pêra (9)                          | Modelo PFD        | 1                               | 140  | 16  |
|   | Produtor          | 2                               | 113  | 20  |
|   | Calendário        | 2                               | 47   | 21  |
|   | Previsão          | 2                               | 145  | 19  |
|   | Testemunha        | 0                               | 46<br>NS   | 16<br>NS                                  |
| 31157 / Pêra (9)                          | Modelo PFD        | 1                               | 82 ab  | 22 ab                                     |
|   | Produtor          | 2                               | 73 ab  | 13 b                                      |
|   | Calendário        | 2                               | 59 b   | 28 a                                      |
|   | Previsão          | 2                               | 81 ab  | 30 a                                      |
|   | Testemunha        | 0                               | 98 a   | 21 ab                                     |
| 13407 / Natal (10)                        | Modelo PFD        | 1                               | 62 ab  | 12  |
|   | Produtor          | 2                               | 16 b   | 22  |
|   | Calendário        | 2                               | 78 ab  | 24  |
|   | Previsão          | 2                               | 64 ab  | 11  |
|   | Testemunha        | 0                               | 114 a  | 11  |
| 13454 / Natal (9)                         | Modelo PFD        | 1                               | 12 b   | 26 ab                                     |
|   | Produtor          | 2                               | 7 b  | 41 a                                      |
|   | Calendário        | 2                               | 12 b   | 27 ab                                     |
|   | Previsão          | 2                               | 8 b  | 28 ab                                     |
|   | Testemunha        | 0                               | 42 a   | 14 b                                      |
| 21145 / Natal (9)                         | Modelo PFD        | 1                               | 11   | 48  |
|   | Produtor          | 2                               | 10   | 53  |
|   | Calendário        | 2                               | 30   | 35  |
|   | Previsão          | 2                               | 48   | 43  |
|   | Testemunha        | 0                               | 32<br>NS   | 39<br>NS                                  |

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste t de Waller-Duncan k-ratio, a 5% de probabilidade.

**Quadro 15.** Número médio de cálices e frutos retidos após tratamento com benomyl, seguindo diferentes esquemas de aplicação, para o controle da podridão floral. Experimento 2, Itapetininga, 2000.

| <b>Tratamento</b> | <b>Nº pulverizações</b> | <b>Cálices retidos /<br/>12 ramos / planta</b> | <b>Frutos /<br/>12 ramos / planta</b> |
|-------------------|-------------------------|--|---------------------------------------|
| Modelo PFD        | 1                       | 56 ab  | 25                                    |
| Produtor          | 2                       | 39 b   | 29                                    |
| Calendário        | 2                       | 39 b   | 27                                    |
| Previsão          | 2                       | 62 a   | 28                                    |
| Testemunha        | 0                       | 62 a   | 21                                    |
|                   |                         |  | NS                                    |

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste t de Waller-Duncan k-ratio, a 5% de probabilidade.

### 6.1.3 Experimento 3 – Ano de 2001

No experimento no ano de 2001, as condições climáticas foram as mais favoráveis para a ocorrência da podridão floral entre os três anos avaliados (Apêndice, Quadro 28). O início da florada foi a partir da segunda quinzena do mês de julho, terminando em meados do mês de setembro.

Os tratamentos seguindo o sistema ‘modelo’ e ‘calendário’ receberam duas pulverizações, sendo que as datas variaram de acordo com o estágio de desenvolvimento fenológico da floração para cada talhão e as condições climáticas. O tratamento seguindo o novo sistema de previsão desenvolvido, denominado PFD-FAD (item 6.2), recebeu apenas uma pulverização, que coincidiu, em todos os casos, com a segunda pulverização efetuada nos tratamentos de acordo com o ‘modelo’ e ‘produtor’. O tratamento de acordo com a escolha do produtor foi o único que recebeu três pulverizações, sendo que estas foram efetuadas com o mesmo produto que estava sendo pulverizado fora da área experimental, no restante do talhão. Todos os demais tratamentos foram pulverizados com o fungicida carbendazim na dose de 0,5 ml/l.

Na avaliação do experimento de 2001, além do número de cálices e frutos retidos, avaliou-se também o número de flores com sintomas na planta, que foi expresso como área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Considerando-se esta variável, todos os talhões apresentaram um melhor controle significativo do que a testemunha em todos os tratamentos, com exceção do talhão 22126, no qual apenas o tratamento PFD-FAD não diferiu da testemunha (Quadro 16).

Na Figura 1, pode-se observar que o desenvolvimento dos sintomas da doença é muito rápido e está diretamente relacionado com a ocorrência de chuvas, sendo que a severidade dos sintomas varia, entre outros fatores, de acordo com o estágio de desenvolvimento da florada no momento em que as chuvas ocorrem.

Em praticamente todos os talhões e em todos os sistemas de tratamentos houve redução no número de cálices retidos em relação à testemunha não pulverizada, sendo verificadas diferenças significativas nos talhões 12408, 31157, 13415 e 21130 (Quadro 16). Considerando o número médio de cálices retidos em todos os experimentos, todos os tratamentos apresentaram número significativamente menor de cálices do que a testemunha, não diferindo estatisticamente entre si (Quadro 17).

Em relação ao número de frutos, foram observadas diferenças significativas em relação à testemunha somente no talhão 12408, para o tratamento seguindo o modelo de previsão, e no Talhão 13415, para os tratamentos modelo e produtor (Quadro 16). Porém, quando foi considerada a média entre os tratamentos em todos os talhões, verifica-se que os tratamentos ‘modelo’, ‘produtor’ e ‘calendário’ apresentaram maior produção significativa de frutos do que a testemunha, não apresentando diferenças entre si. O tratamento

PFD-FAD não diferiu dos demais tratamentos e nem da testemunha, porém, neste caso, foi efetuada apenas uma aplicação de fungicida (Quadro 17).

No Quadro 18 estão apresentados os custos de controle de podridão floral para o experimento realizado em 2001. Os preços dos defensivos, assim como o custo de aplicação, composto pelo custo da máquina e da mão-de-obra, foram fornecidos pelo produtor. Em relação aos produtos, para o tratamento do produtor foi utilizado o preço do fungicida que foi predominantemente utilizado durante a floração.

A redução nos custos de controle através da utilização do modelo PFD, onde foram efetuadas duas pulverizações, e do sistema de previsão PFD-FAD, onde foi efetuada apenas 1 pulverização, foi de 30% e 65%, respectivamente, em relação ao esquema do produtor, com 3 pulverizações. Com base no valor médio de R\$8,00 (oito reais) pago pela caixa de laranja (40,8 kg) na safra de 2001, pode-se estimar que é necessário um incremento de 12 caixas de fruta por hectare para cobrir o custo de 3 aplicações de fungicida, o que corresponde a cerca de 10,5 frutos por planta. Para cobrir o custo de 2 aplicações, no caso do modelo de previsão ou calendário, e de 1 aplicação, no caso do sistema PFD-FAD, seriam necessárias 8,5 e 4,2 caixas de fruta por hectare, que correspondem a 7,3 e 3,6 frutas por planta, respectivamente.

**Quadro 16.** Efeito de diferentes esquemas de aplicação de fungicidas para o controle da podridão floral, sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a infecção de flores, o número de cálices e de frutos retidos. Experimento 3, Itapetininga, 2001.

| <b>Talhão /<br/>variedade<br/>(idade)</b> | <b>Tratamento</b> | <b>Número<br/>pulverizações</b> | <b>AACPD<sup>z</sup></b> | <b>Cálices /<br/>12 ramos /<br/>planta</b> | <b>Frutos /<br/>12 ramos /<br/>planta</b> |
|---|-------------------|---------------------------------|--------------------------|--|---|
| 12401 / Pêra<br>(11)                      | Modelo PFD        | 2                               | 1578 c                   | 138  | 38  |
|   | Produtor          | 3                               | 888 d                    | 139  | 45  |
|   | Calendário        | 2                               | 1724 c                   | 119  | 32  |
|   | PFD-FAD           | 1                               | 4683 b                   | 114  | 36  |
|   | Testemunha        | 0                               | 7321 a                   | 144  | 23  |
| 12408 / Pêra<br>(11)                      | Modelo PFD        | 2                               | 669 b                    | 40 b                                       | 35 a                                      |
|   | Produtor          | 3                               | 685 b                    | 45 b                                       | 30 ab                                     |
|   | Calendário        | 2                               | 831 b                    | 45 b                                       | 32 ab                                     |
|   | PFD-FAD           | 1                               | 1882 b                   | 47 b                                       | 31 ab                                     |
|   | Testemunha        | 0                               | 7027 a                   | 99 a                                       | 19 b                                      |
| 13309 / Pêra<br>(11)                      | Modelo PFD        | 2                               | 437 d                    | 19   | 30  |
|   | Produtor          | 3                               | 655 c                    | 14   | 42  |
|   | Calendário        | 2                               | 446 d                    | 18   | 31  |
|   | PFD-FAD           | 1                               | 920 b                    | 19   | 36  |
|   | Testemunha        | 0                               | 2096 a                   | 24   | 34  |
| 22126 / Pêra<br>(9)                       | Modelo PFD        | 2                               | 833 b                    | 67   | 24  |
|   | Produtor          | 3                               | 464 b                    | 40   | 30  |
|   | Calendário        | 2                               | 692 b                    | 53   | 29  |
|   | PFD-FAD           | 1                               | 3835 a                   | 96   | 22  |
|   | Testemunha        | 0                               | 3689 a                   | 95   | 27  |
| 31157 / Pêra<br>(10)                      | Modelo PFD        | 2                               | 274 c                    | 24 bc                                      | 31  |
|   | Produtor          | 3                               | 272 c                    | 14 c                                       | 28  |
|   | Calendário        | 2                               | 358 c                    | 37 b                                       | 34  |
|   | PFD-FAD           | 1                               | 546 b                    | 28 bc                                      | 25  |
|   | Testemunha        | 0                               | 1330 a                   | 56 a                                       | 24  |
| 13415 / Natal<br>(11)                     | Modelo PFD        | 2                               | 4507 b                   | 26 b                                       | 24 a                                      |
|   | Produtor          | 3                               | 1112 c                   | 65 b                                       | 24 a                                      |
|   | Calendário        | 2                               | 740 c                    | 45 b                                       | 21 ab                                     |
|   | PFD-FAD           | 1                               | 2790 bc                  | 72 b                                       | 20 ab                                     |
|   | Testemunha        | 0                               | 7365 a                   | 209 a                                      | 8 b                                       |
| 21130 / Natal<br>(11)                     | Modelo PFD        | 2                               | 181 b                    | 3 a  | 36  |
|   | Produtor          | 3                               | 247 b                    | 5 a  | 30  |
|   | Calendário        | 2                               | 159 b                    | 3 a  | 30  |
|   | PFD-FAD           | 1                               | 308 b                    | 5 a  | 35  |
|   | Testemunha        | 0                               | 602 a                    | 13 b                                       | 32  |

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste t de Waller-Duncan k-ratio, a 5% de probabilidade.

<sup>z</sup> AACPD para número de flores com sintomas

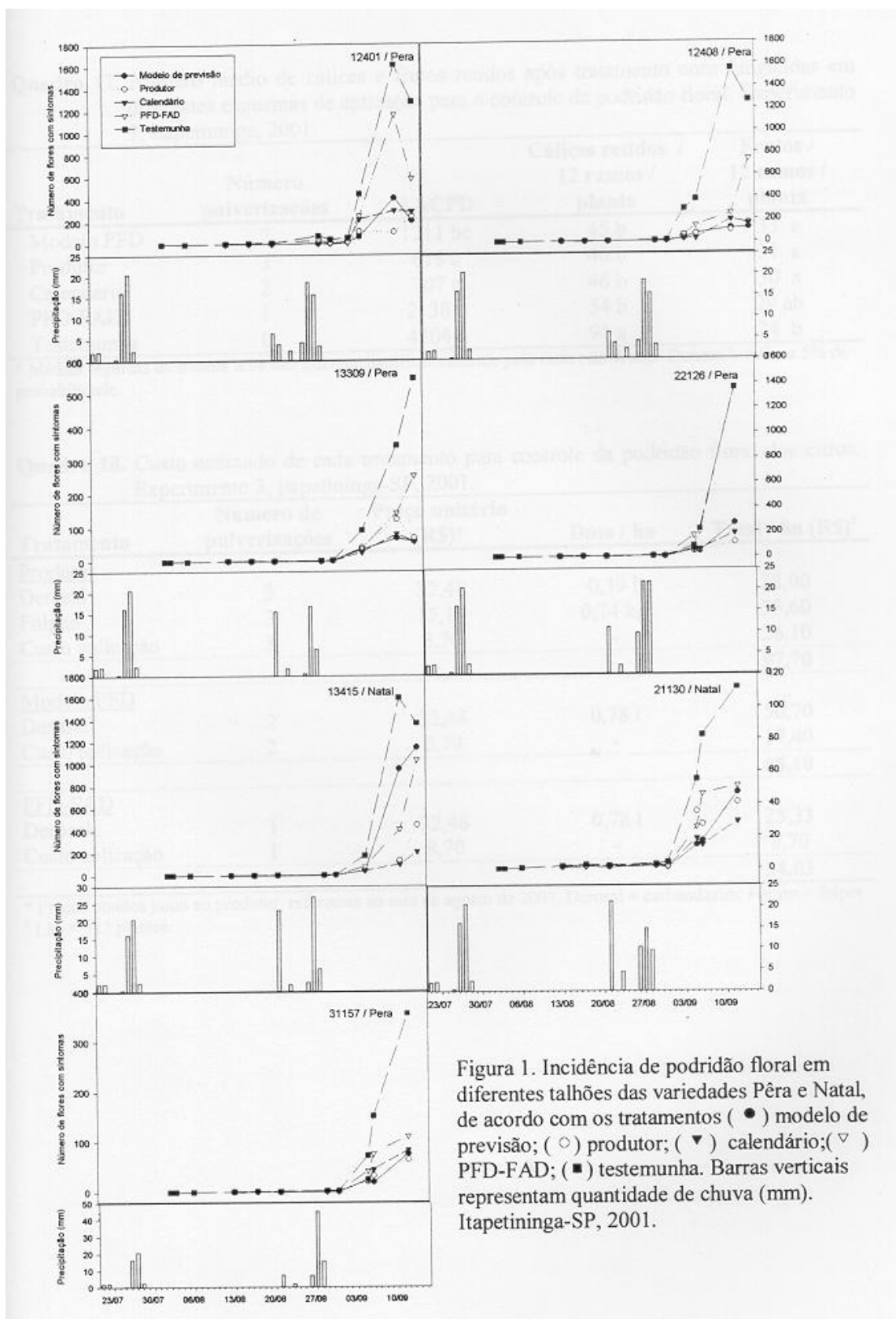


Figura 1. Incidência de podridão floral em diferentes talhões das variedades Pêra e Natal, de acordo com os tratamentos (●) modelo de previsão; (○) produtor; (▼) calendário; (▽) PFD-FAD; (■) testemunha. Barras verticais representam quantidade de chuva (mm). Itapetininga-SP, 2001.

**Quadro 17.** Número médio de cálices e frutos retidos após tratamento com fungicidas em diferentes esquemas de aplicação para o controle da podridão floral. Experimento 3, Itapetininga, 2001.

| <b>Tratamento</b> | <b>Número de pulverizações</b> | <b>AACPD</b> | <b>Cálices retidos<sup>▼</sup> /<br/>■12 ramos /<br/>planta</b> | <b>Frutos<sup>∇</sup> /<br/>12 ramos /<br/>planta</b> |
|-------------------|--------------------------------|--------------|---|---|
| Modelo PFD        | 2                              | 1211 bc      | 45 b  | 33 a  |
| Produtor          | 3                              | 618 c        | 46 b  | 31 a  |
| Calendário        | 2                              | 707 c        | 46 b  | 30 a  |
| PFD-FAD           | 1                              | 2138 b       | 54 b  | 29 ab   |
| Testemunha        | 0                              | 4204 a       | 91 a  | 24 b  |

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste t de Waller-Duncan k-ratio, a 5% de probabilidade.

**Quadro 18.** Custo estimado de cada tratamento para controle da podridão floral dos citros. Experimento 3, Itapetininga-SP, 2001.

| <b>Tratamento</b> | <b>Número de pulverizações</b> | <b>Preço unitário (R\$)*</b> | <b>Dose / ha</b> | <b>Total / ha (R\$)<sup>z</sup></b> |
|-------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------|-------------------------------------|
| <b>Produtor</b>   |                                |                              |                  |                                     |
| Derosal           | 3                              | 32,48                        | 0,39 l           | 38,00                               |
| Folpan            | 3                              | 15,13                        | 0,74 kg          | 33,60                               |
| Custo aplicação   | 3                              | 8,70                         | -                | 26,10                               |
|                   |                                |                              |                  | <b>97,70</b>                        |
| <b>Modelo PFD</b> |                                |                              |                  |                                     |
| Derosal           | 2                              | 32,48                        | 0,78 l           | 50,70                               |
| Custo aplicação   | 2                              | 8,70                         | -                | 17,40                               |
|                   |                                |                              |                  | <b>68,10</b>                        |
| <b>PFD-FAD</b>    |                                |                              |                  |                                     |
| Derosal           | 1                              | 32,48                        | 0,78 l           | 25,33                               |
| Custo aplicação   | 1                              | 8,70                         | -                | 8,70                                |
|                   |                                |                              |                  | <b>34,03</b>                        |

\* Preços obtidos junto ao produtor, referentes ao mês de agosto de 2001. Derosal = carbendazim; Folpan = folpet

<sup>z</sup> 1 ha = 312 plantas


## **6.2 Desenvolvimento de um novo sistema de previsão para aplicação de fungicidas para controle da podridão floral dos citros (PFD-FAD)**

O novo sistema de previsão desenvolvido (PFD-FAD) pode ser acessado diretamente através do site <http://it.ifas.ufl.edu/disc/pfd>, tanto para a versão em inglês (Figura 2), como para versão em português (Figura 3).


O sistema foi implantado em linguagem Java (Sun Microsystems Inc., 2001) que interage com a forma HTML (Figura 4). Os usuários especificam os fatores que representam as condições do pomar respondendo uma lista com múltiplas escolhas, sendo que no canto direito de cada lista foi colocado um ícone “?” que pode ser utilizado para acessar informações adicionais sobre cada item. Uma vez que os usuários tenham especificado todas as condições, o formulário deve ser submetido através do ícone ‘Submeter’ (Figura 5). As respostas são então enviadas para a linguagem Java, que reside em um servidor distante e faz a análise dos dados, retornando a recomendação na forma de uma página HTML que aparece no buscador Web do usuário (Figura 6).

Os usuários podem ainda acessar um fluxograma que demonstra como as decisões foram feitas através do ícone ‘Diagrama’, sendo que este ícone contém também algumas considerações mais detalhadas sobre a doença e os fatores envolvidos na decisão sobre uma pulverização (Figura 7). Além disso, existem links para acessar a citação do trabalho completo a ser publicado, sites relacionados e contato com os autores para maiores informações sobre o desenvolvimento do sistema.






*Postbloom fruit drop (PFD), caused by the fungus *Colletotrichum acutatum*, affects all species and cultivars of citrus. It is often a serious disease in most humid citrus areas of the Americas. The PFD-Fungicide Applications Decisions System is designed to advise growers in all citrus areas as to the need to apply fungicides for control of PFD. Decisions are based on the previous history of PFD in the grove, the weather conditions, and the current disease situation".*

Click here to enter  click here for Portuguese

---

- Prepared by: Natalia Peres, UNESP, Botucatu, SP, Brazil and Pete Timmer, Univ.Florida, CREC, Lake Alfred, FL
- Written by Howard Beck, and Soonho Kim, Information Technology, IFAS, UF, Gainesville, FL ( 12/11/2001)

Figura 2. Página inicial do sistema PFD-FAD (versão em inglês)



# PFD-FAD SYSTEM

[Click here to enter](#)

*“A Podridão Floral ou Queda Prematura dos Frutos, causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, afeta todas as espécies e cultivares de citros e é considerada um sério problema na maioria das áreas úmidas onde cultiva-se os citros nas Américas. O sistema de previsão PFD-FAD foi desenvolvido para auxiliar os produtores em todas as áreas de cultivo quanto a necessidade de aplicação de fungicidas para controle da doença, baseando-se no histórico da doença no pomar, nas condições climáticas e na situação atual da doença dentro do pomar.”*

---

- Preparado por: Natália Peres, FCA/UNESP, Botucatu, SP, Brasil e Pete Timmer, Univ.Florida, CREC, Lake Alfred, FL
- Escrito por: Howard Beck, and Soonho Kim, Information Technology, IFAS, UF, Gainesville, FL ( 12/11/2001)

---

[click here for English version](#)

Figura 3. Página inicial do sistema PFD-FAD (versão em português)

**SISTEMA**

---

**PFD – Sistema de Previsão para Aplicação de Fungicidas**

Estágio da florada

Selecionar estágio  ?

**Riscos pré-florada**

Doença nos últimos 5 anos  ?

"Estrelinhas" por árvore  ?

Floradas principais por ano  ?

Suscetibilidade da variedade  ?

Árvores doentes  ?

Tempestades antes florada principal  ?

**Riscos climáticos**

Chuva nos últimos 5 dias  ?

Molhamento foliar  ?

Eventos de chuva  ?

**Riscos de inóculo**

Nível de doença  ?

**Aplicação de fungicida**

Última pulverização  ?

---

INÍCIO | SISTEMA | DIAGRAMA | PUBLICAÇÃO | LINKS | CONTATO

Figura 4. Página de entrada no sistema PFD-FAD, onde os usuários irão selecionar as condições desejadas através de uma lista de escolhas.

**SISTEMA**

---

**PFD – Sistema de Previsão para Aplicação de Fungicidas**

Estágio da florada

Trórdio, botões florais, poucas flores abertas: quantidade suficiente para justificar aplicação ▼ ?

**Riscos pré-florada**

Doença nos últimos 5 anos  ?

Estrelinhas® / 12 ramos / árvore  ?

Floradas principais por ano  ?

Suscetibilidade da variedade  ?

Árvores doentes  ?

Sintomas antes florada principal  ?

**Riscos climáticos**

Chuva nos últimos 5 dias  ?

Molhamento foliar  ?

Eventos de chuva  ?

**Riscos de inóculo**

Nível de doença  ?

**Aplicação de fungicida**

Última pulverização  ?

---

INÍCIO | SISTEMA | DIAGRAMA | PUBLICAÇÃO | LINKS | CONTATO

Figura 5. Exemplo de uma situação selecionada no sistema PFD-FAD, que deverá ser submetida para gerar uma recomendação.

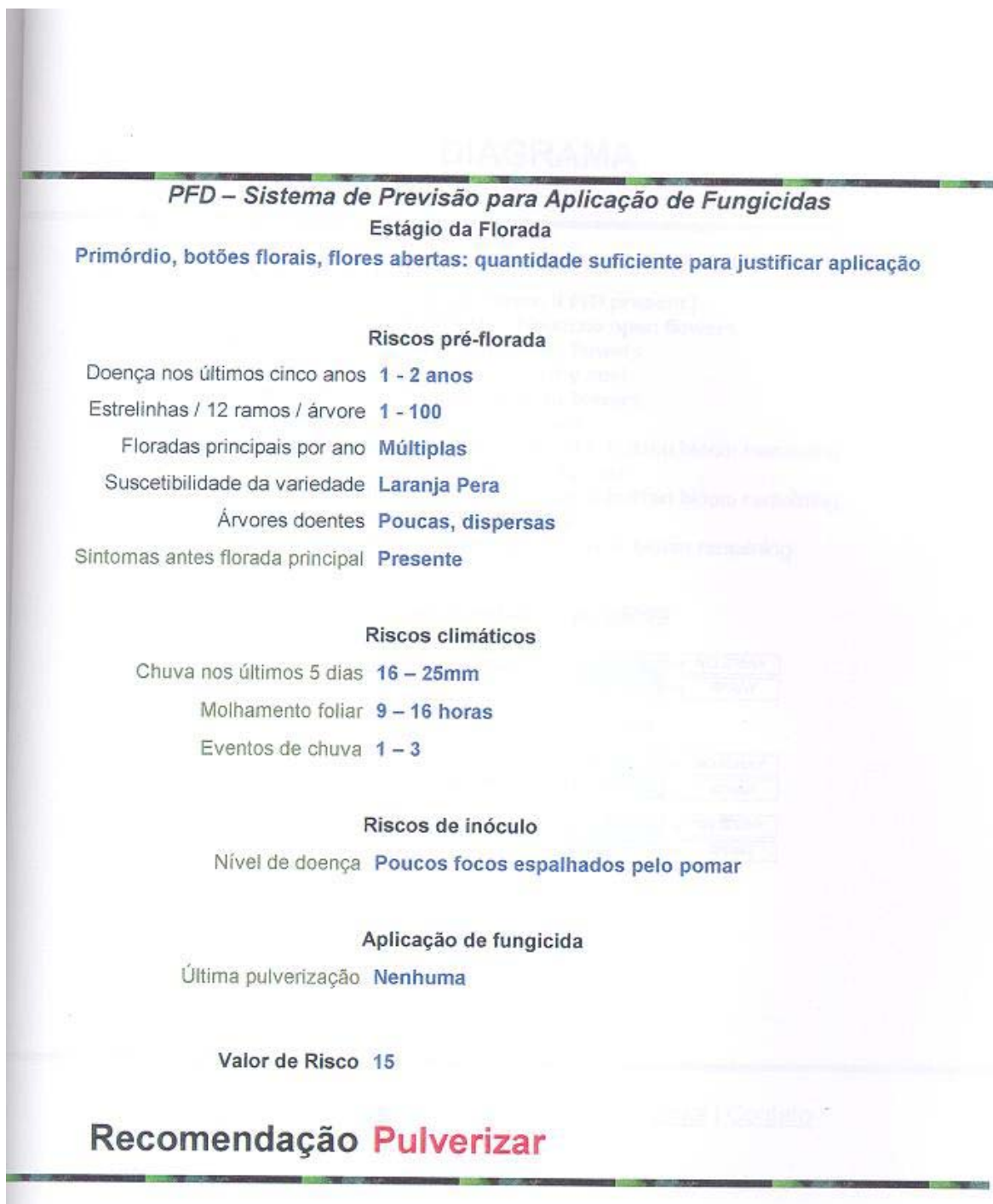


Figura 6. Recomendação gerada a partir da seleção exemplificada na Figura 5, contendo um resumo de todos os fatores selecionados pelo usuário.

## DIAGRAMA

### <STAGE OF BLOOM>

1. Early bloom, few flowers (even if PFD present)
2. Pinhead bloom, few button bloom, no open flowers
3. Pinhead, button bloom, few open flowers  
:non-sufficient crop set to justify cost
4. Pinhead, button bloom, few open flowers  
:sufficient crop set to justify cost
5. Many open flowers, some pinhead & button bloom remaining  
:non-sufficient crop set to justify cost
6. Many open flowers, some pinhead & button bloom remaining  
:sufficient crop set to justify cost
7. All flowers open, no pinhead or button bloom remaining

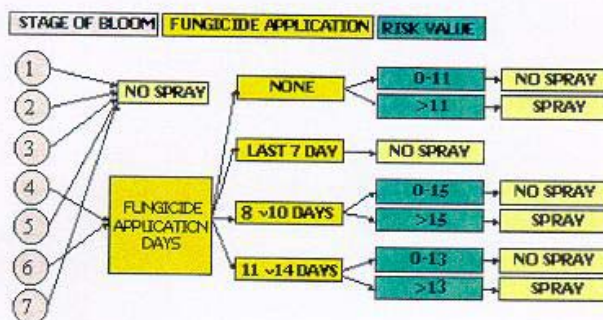


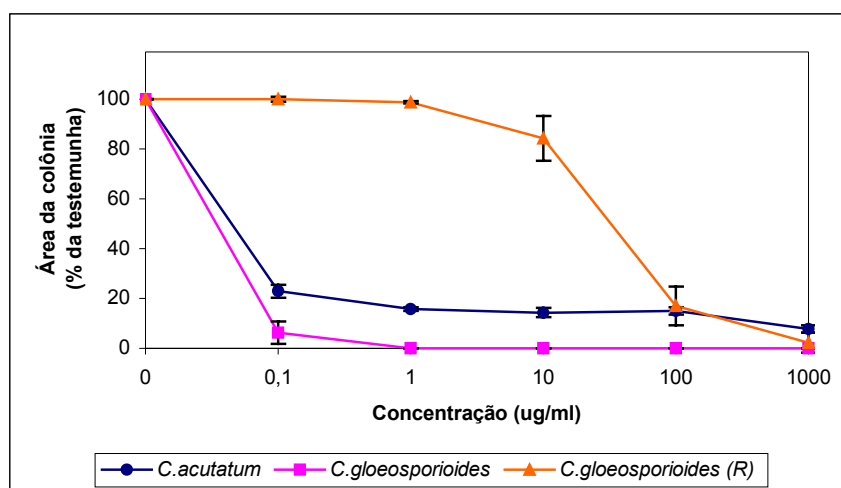
Figura 7. Diagrama exemplificando o esquema de decisões do sistema PFD-FAD, acessado através do ícone 'Diagrama' na página inicial.

### 6.3 Avaliação da resistência de isolados de *Colletotrichum* de citros ao benomyl

#### 6.3.1 Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum* ao benomyl ‘in vitro’

##### 6.3.1.1 Efeito sobre o crescimento micelial

Os isolados de *C. acutatum* apresentam um comportamento característico distinto quanto à sensibilidade ao fungicida benomyl ‘in vitro’. Apesar do fungo ter o crescimento micelial reduzido na presença do benomyl, o crescimento das colônias de *C. acutatum* não é completamente inibido, mesmo em concentrações de até 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 8). No caso de *C. gloeosporioides*, o crescimento micelial dos isolados sensíveis ao fungicida é reduzido em mais de 90% na concentração de 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto os isolados resistentes (R) apresentam uma redução significativa na área da colônia somente em concentrações maiores do que 100  $\mu\text{g benomyl/mL}$ .



\* Média de três isolados

Figura 8. Crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* de citros cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de benomyl, após sete dias de incubação a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### 6.3.1.2 Efeito sobre a germinação de conídios em meio sólido

O efeito do benomyl sobre a germinação de conídios de *C. acutatum* em meio sólido mostrou, nos quatro experimentos realizados, que os isolados apresentaram menor porcentagem de germinação em relação à testemunha na concentração mais baixa de 0,1 µg/mL (Quadro 19). Entretanto, comparando-se a área das colônias desenvolvidas, não foram verificadas diferenças significativas entre o crescimento micelial em ambas concentrações testadas (Quadro 20).

Avaliando-se o mesmo efeito em concentrações superiores, de até 1000 µg/mL, verifica-se que a porcentagem de germinação foi menor nas concentrações extremas de 0,1 µg/mL e 1000 µg/mL, e a maior porcentagem de germinação foi na concentração intermediária de 10 µg/mL (Figura 9). Já em relação a área das colônias, o comportamento dos isolados foi similar ao verificado no crescimento micelial, ou seja, apesar de haver uma inibição de cerca de 80% no crescimento do fungo, mesmo as concentrações mais elevadas não chegam a paralisar o seu crescimento (Figura 9).

**Quadro 19.** Germinação de conídios de isolados *Colletotrichum acutatum*, cultivados em meio de cultura sólido com diferentes concentrações de benomyl, expresso como porcentagem de germinação em relação à testemunha.

| Concentração<br>benomyl<br>(µg/mL) | Germinação (% da testemunha) |         |           |        |
|------------------------------------|------------------------------|---------|-----------|--------|
|                                    | Isolado                      |         |           | Média  |
|                                    | IM-2                         | GL-PIKE | SGR-FTP-2 |        |
| 0,1                                | 14,5 <sup>z</sup>            | 11,9    | 21,5      | 16,0 * |
| 1                                  | 42,4                         | 65,8    | 45,0      | 51,0   |

\* Significativo a nível de 5% de probabilidade

<sup>z</sup> Médias de quatro experimentos.

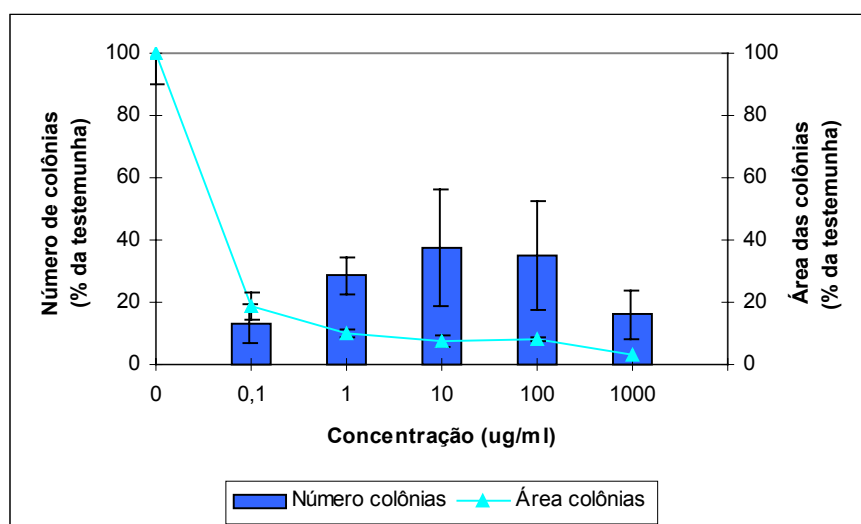


**Quadro 20.** Crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum*, cultivados em meio de cultura sólido com diferentes concentrações de benomyl, expresso como porcentagem da área da colônia em relação à testemunha.

| Concentração<br>benomyl<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Área da colônia (% da testemunha) |         |           |       |
|---|-----------------------------------|---------|-----------|-------|
|   | Isolado                           |         |           | Média |
|   | IM-2                              | GL-PIKE | SGR-FTP-2 |       |
| 0,1   | 14,3 <sup>z</sup>                 | 10,2    | 20,7      | 15,0  |
| 1   | 13,3                              | 18,8    | 16,0      | 16,0  |
|   |                                   |         |           | NS    |

\* NS = Não significativo, a 5% de probabilidade

<sup>z</sup> Médias de quatro experimentos

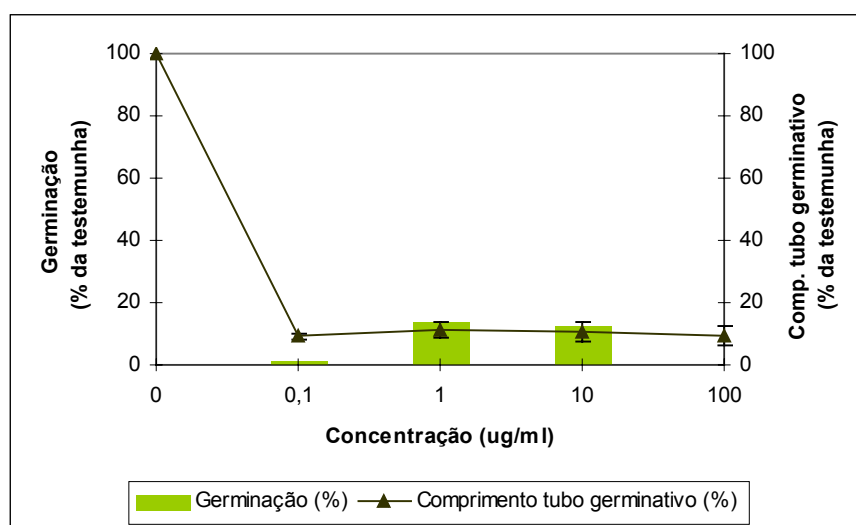


\* Média de três isolados

Figura 9. Germinação de conídios e área das colônias de *Colletotrichum acutatum*, cultivados em meio de cultura sólido com diferentes concentrações de benomyl, após três dias de incubação a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Dados expressos como porcentagem em relação à testemunha.

### 6.3.1.3 Efeito sobre a germinação de conídios em meio líquido

O efeito do benomyl sobre a germinação de conídios de *C. acutatum* em meio líquido com diferentes concentrações de benomyl apresentou resultado similar aos resultados obtidos em meio de cultura sólido, sendo que a concentração de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  foi a que apresentou menor porcentagem de germinação em relação à testemunha (Figura 10). Quanto ao comprimento do tubo germinativo dos conídios, verificou-se uma resposta similar à verificada nos experimentos anteriores em relação ao efeito do fungicida sobre área das colônias em meio sólido (Figura 10).

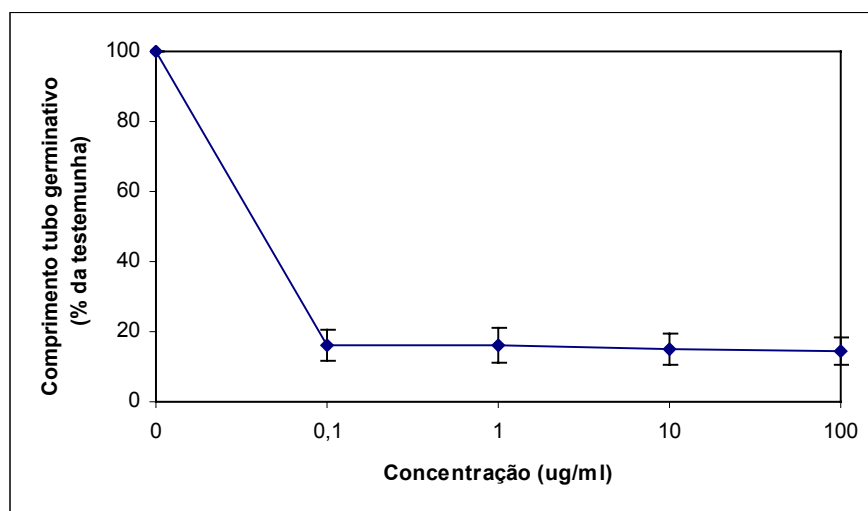


\* Média de três isolados

Figura 10. Germinação de conídios e crescimento do tubo germinativo de conídios de *Colletotrichum acutatum*, cultivados em meio de cultura líquido, com diferentes concentrações de benomyl adicionado antes da germinação dos conídios. Dados expressos como porcentagem em relação à testemunha.

### 6.3.1.4 Efeito sobre o crescimento do tubo germinativo

O comprimento do tubo germinativo dos conídios de *C. acutatum*, quando o benomyl foi aplicado em meio de cultura líquido, 12 horas após a germinação dos conídios, foi reduzido em todas as concentrações, porém, apenas parcialmente, em um nível similar ao verificado nos outros experimentos onde foi avaliado o crescimento micelial (Figura 11).



\* Média de três isolados

Figura 11. Comprimento do tubo germinativo de conídios de *Colletotrichum acutatum*, cultivados em meio de cultura líquido com diferentes concentrações de benomyl aplicado após 12 horas de incubação dos conídios a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Dados expressos como porcentagem em relação à testemunha.

### **6.3.2 Sensibilidade ‘in vitro’ de isolados de *Colletotrichum* provenientes de pomares com diferentes históricos de uso de benomyl**

O crescimento micelial dos isolados de *C. acutatum* provenientes de 17 pomares com diferentes históricos de uso do benomyl demonstrou um comportamento semelhante para praticamente todos os isolados, sendo que a porcentagem média de crescimento em relação ao controle foi de cerca de 43% e 21%, quando o fungo foi cultivado em meio de cultura com o fungicida nas concentrações de 0,1 e 1 µg/mL, respectivamente (Quadro 21).

O histórico de uso do benomyl foi um fator significativo na concentração de 0,1 µg/mL, mas não na concentração de 1 µg/mL (Quadro 22). Entretanto, as diferenças entre o crescimento micelial para os diferentes níveis de uso foram muito pequenas, sendo que a maior diferença, entre os históricos de pouco uso e o de uso intenso, foi de menos de 4 pontos percentuais.

Em relação ao país de origem dos isolados, foram verificadas diferenças significativas na concentração de 1 µg/mL, mas não na concentração de 0,1 µg/mL (Quadro 22). Porém as diferenças encontradas foram igualmente pequenas, sendo que a porcentagem de crescimento micelial na média dos isolados do Brasil foi de 22,4%, enquanto os isolados da Flórida apresentaram uma porcentagem média de crescimento de 19,8%.

Foram verificadas diferenças significativas em relação a sensibilidade dos isolados provenientes dos 17 diferentes pomares, assim como na interação entre o histórico de uso do benomyl e o país de origem dos isolados, para ambas concentrações testadas (Quadro 22). Na concentração de 0,1 µg/mL, a amplitude de variação para o crescimento micelial, entre o pomar mais sensível e o menos sensível, variou de 37,9% (ALB-

IND, pouco uso) a 48,2% (SGR-FTP, uso moderado) e, na concentração de 1 µg/mL, variou de 17,7% (VTP-IND, nunca utilizado) a 23,8% (CIA-BTU, pouco uso) (Quadro 11).

A análise de variância entre os dois experimentos também demonstrou diferenças significativas na concentração de 1 µg/mL, sendo que, neste caso, a média para do primeiro experimento foi de 20,3%, enquanto que a média do segundo experimento foi 21,9%, ou seja, apenas 1,6 pontos percentuais de diferença. Na concentração de 0,1 µg/mL, as diferenças não foram significativas e a média para o primeiro experimento foi de 43,3%, comparando-se com 44% do segundo experimento.

Na análise da interação entre os experimentos e o histórico de uso do benomyl, as diferenças foram significativas em ambas concentrações (Quadro 22). Na concentração de 0,1 µg/mL, o crescimento micelial foi maior para os isolados provenientes dos pomares com ‘pouco uso’ e ‘uso intenso’ no primeiro experimento, e para os isolados pertencentes aos pomares com ‘uso moderado’ e ‘nunca utilizado’ no segundo experimento.

A interação entre experimento e o país de origem do isolado foi significativa em ambas concentrações de benomyl, embora pouco significativa na concentração de 0,1 µg/mL (Quadro 22). A média do crescimento micelial para os isolados do Brasil, no primeiro experimento, foi de 43,5% e 21,1% e, para os isolados da Flórida, foi de 43,1% e 19,6%, nas concentrações de 0,1 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. No segundo experimento, o crescimento micelial médio foi 42,7% e 23,7% para os isolados do Brasil e de 45,2% e 20,1% para os isolados da Flórida, nas concentrações de 0,1 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente.

A interação entre pomares e experimentos também foi significativa para ambas concentrações, já que, tanto a análise de variância dos pomares, quanto dos experimentos, foi significativa (Quadro 22).

A análise levando em consideração os três fatores (experimento x histórico uso x país de origem) não mostrou diferenças significativas em nenhuma das concentrações de benomyl testadas (Quadro 22).

Entre os 340 isolados avaliados, não foi encontrado nenhum isolado altamente sensível ao benomyl, ou seja, que tenha tido o seu crescimento completamente inibido pelo fungicida, sendo que a variabilidade entre os 20 isolados provenientes de um mesmo pomar foi pequena, independente do histórico de uso do benomyl no pomar (Figura 12).

A Figura 13 apresenta uma comparação entre o comportamento de 20 isolados de *C. acutatum* e de 20 isolados de *C. gloeosporioides*, provenientes de um mesmo pomar, quando cultivados em meio de cultura com 1 µg/mL de benomyl. Dentre os 100 isolados de *C. gloeosporioides* avaliados, verificou-se que o crescimento micelial foi completamente inibido na concentração de 1 µg/mL, com exceção de 7 isolados que se mostraram resistentes ao fungicida.

**Quadro 21.** Crescimento micelial de isolados *Colletotrichum acutatum* cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de benomyl, provenientes de pomares com diferentes históricos quanto a regularidade de uso de benomyl, expressos como porcentagem em relação a testemunha.

| Uso benomyl     | Isolado           | Localidade, país         | Área da colônia (%) *        |             |
|-----------------|-------------------|--------------------------|------------------------------|-------------|
|                 |                   |                          | Concentração benomyl (µg/mL) |             |
|                 |                   |                          | 0,1                          | 1,0         |
| Nunca utilizado | FZR-PRD-(1 a 20)  | Pardinho, SP, Brasil     | 41,5                         | 21,2        |
|                 | FSH-CLB-(1 a 20)  | Colômbia, SP, Brasil     | 45,7                         | 23,4        |
|                 | VTP-IND-(1 a 20)  | Indiantown, FL, EUA      | 39,9                         | 17,7        |
|                 | SRL-FTP-(1 a 20)  | Frostproof, FL, EUA      | 44,8                         | 19,9        |
| <b>Média</b>    |                   |                          | <b>43,0</b>                  | <b>20,5</b> |
| Pouco uso       | CIA-BTU-(1 a 20)  | Botucatu, SP, Brasil     | 43,5                         | 23,8        |
|                 | FSH-MGG-(1 a 20)  | Mogi Guaçu, SP, Brasil   | 39,3                         | 22,3        |
|                 | CLR-IMK-(1 a 20)  | Immokalee, FL, EUA       | 42,9                         | 19,6        |
|                 | RCO-IMK-(1 a 20)  | Immokalee, FL, EUA       | 47,5                         | 20,4        |
|                 | MRN-IND-(1 a 20)  | Indiantown, FL, EUA      | 39,4                         | 18,7        |
|                 | ALB-IND-(1 a 20)  | Indiantown, FL, EUA      | 37,9                         | 18,4        |
| <b>Média</b>    |                   |                          | <b>41,7</b>                  | <b>21,2</b> |
| Uso moderado    | CIT-ITP-(1 a 20)  | Itapetininga, SP, Brasil | 38,8                         | 19,5        |
|                 | SFL-MGG-(1 a 20)  | Mogi Guaçu, SP, Brasil   | 39,4                         | 21,2        |
|                 | CIT-CA-ITP-(1-20) | Itapetininga, SP, Brasil | 45,4                         | 23,4        |
|                 | SGR-FTP-(1 a 20)  | Frostproof, FL, EUA      | 48,2                         | 21,6        |
| <b>Média</b>    |                   |                          | <b>44,6</b>                  | <b>21,5</b> |
| Uso intenso     | SLG-MGG-(1 a 20)  | Mogi Guaçu, SP, Brasil   | 46,6                         | 22,8        |
|                 | OCO-ARC-(1 a 20)  | Arcadia, FL, EUA         | 45,3                         | 19,2        |
|                 | STF-FTP-(1 a 20)  | Frostproof, FL, EUA      | 43,0                         | 20,2        |
| <b>Média</b>    |                   |                          | <b>45,4</b>                  | <b>21,3</b> |
| <b>C.V. (%)</b> |                   |                          | 19,9                         | 14,3        |

\* Médias de 2 experimentos.

**Quadro 22.** Análise de variância para as diferentes fontes de variação no crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum*, provenientes de pomares com diferentes históricos de uso de benomyl no Brasil e na Flórida, cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações do fungicida.

| Fonte variação   | GL | 0,1 µg/mL |      |        | 1,0 µg/mL |       |        |
|------------------|----|-----------|------|--------|-----------|-------|--------|
|                  |    | QM        | F    | P      | QM        | F     | P      |
| Uso benomyl      | 3  | 348,0     | 4,79 | 0,0026 | 16,2      | 1,9   | 0,1375 |
| País             | 1  | 134,6     | 1,85 | 0,1741 | 980,7     | 111,6 | <,0001 |
| Uso B x País     | 3  | 566,7     | 7,79 | <,0001 | 114,5     | 13,0  | <,0001 |
| Pomar            | 9  | 505,3     | 6,95 | <,0001 | 72,0      | 8,2   | <,0001 |
| Experimento      | 1  | 48,1      | 0,66 | 0,4162 | 383,5     | 43,6  | <,0001 |
| Pomar x exp      | 9  | 712,7     | 9,8  | <,0001 | 67,0      | 7,6   | <,0001 |
| Exp x uso B      | 3  | 377,2     | 5,19 | 0,0015 | 161,8     | 18,4  | <,0001 |
| Exp x País       | 1  | 301,0     | 4,14 | 0,0423 | 179,6     | 20,4  | <,0001 |
| Exp x Uso x País | 3  | 26,5      | 0,36 | 0,7790 | 10,4      | 1,2   | 0,3155 |

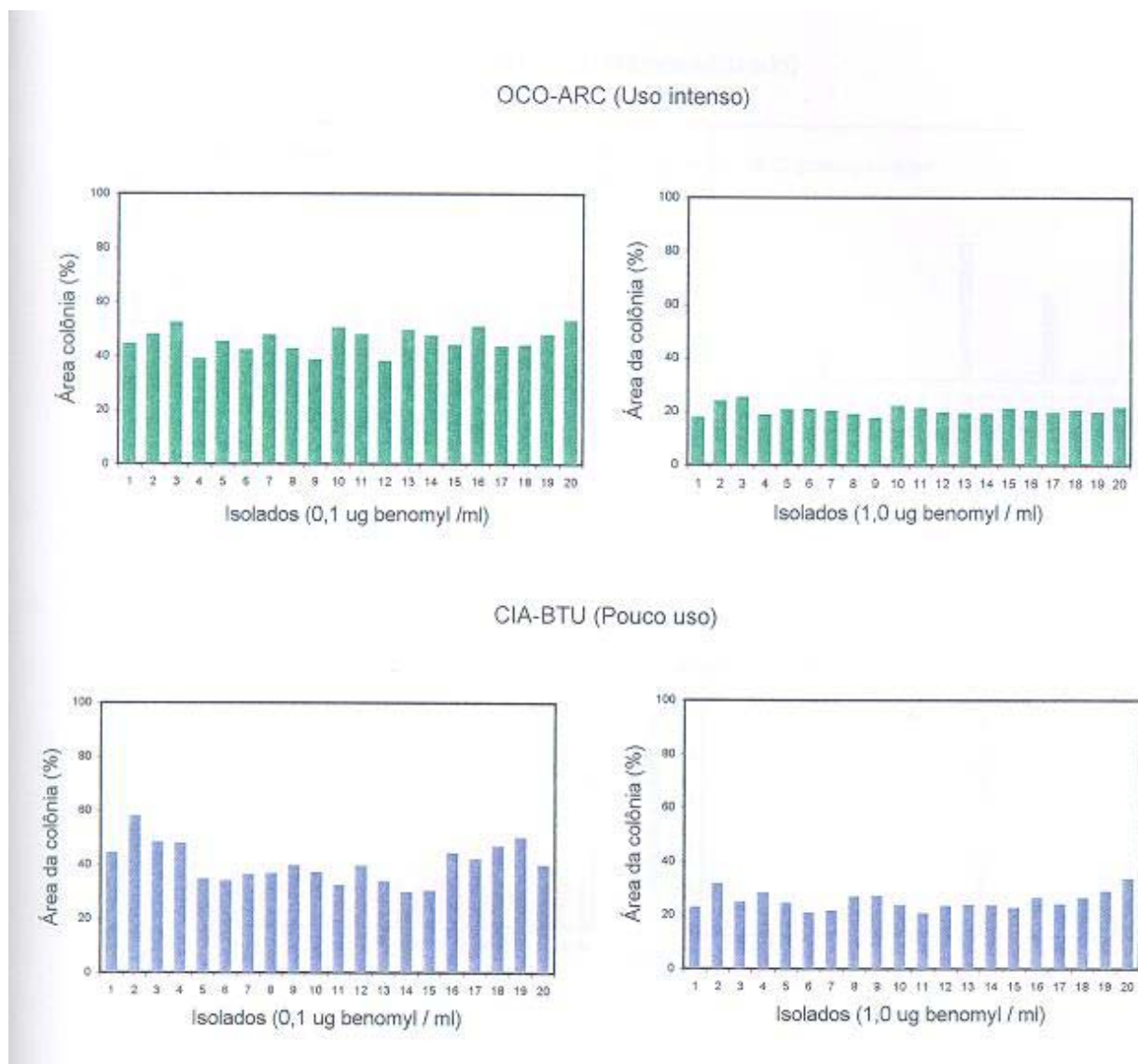


Figura 12. Porcentagem de crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum acutatum* provenientes dos pomares OCO-ARC e CIA-BTU, cultivados em meio de cultura com benomyl nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$



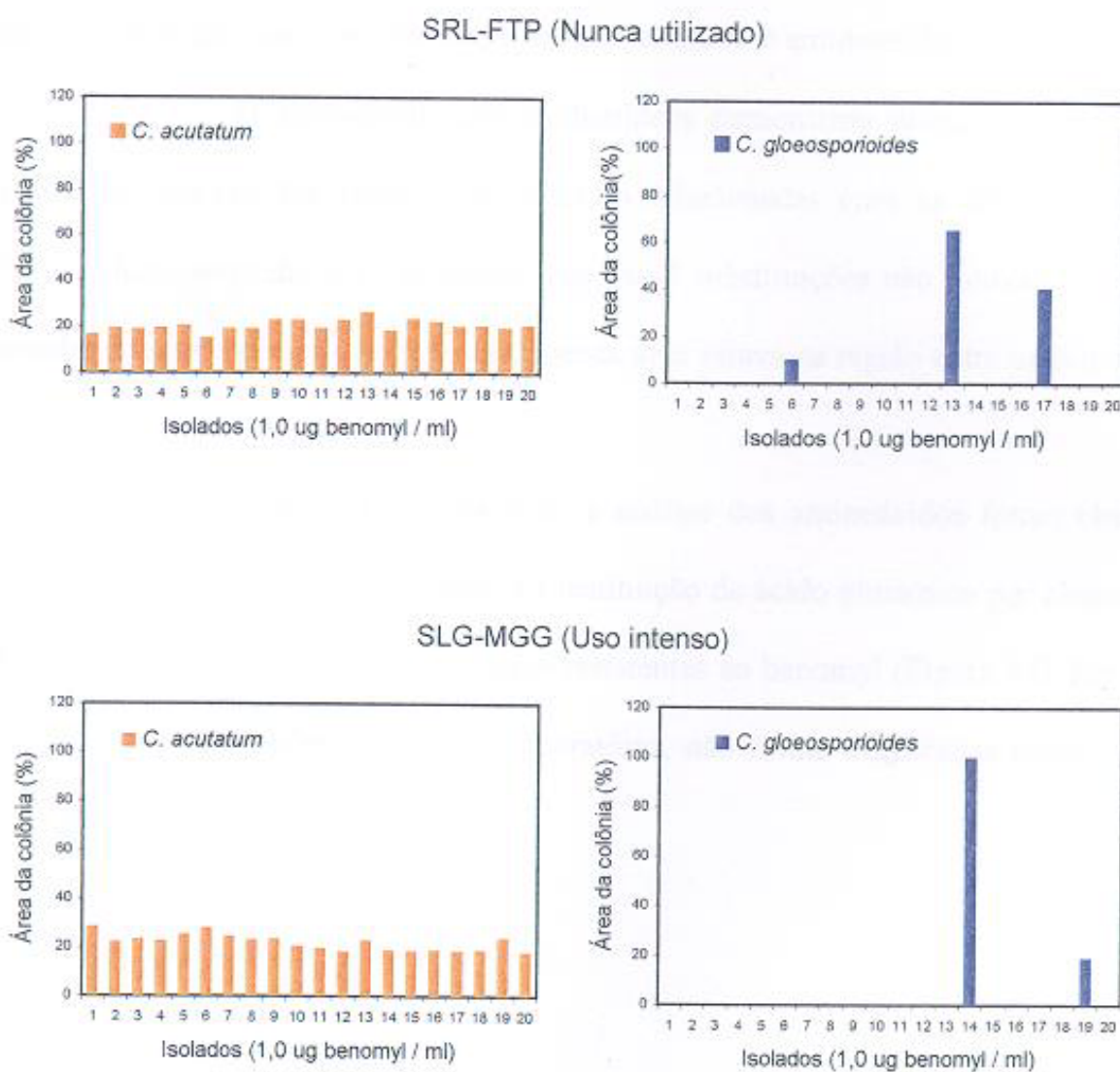


Figura 13. Porcentagem de crescimento micelial de isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, provenientes dos pomares SRL-FTP e SLG-MGG, cultivados em meio de cultura com benomyl na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$

### 6.3.3 Sequenciamento parcial do gene $\beta$ -tubulina de isolados de *Colletotrichum*

A região do gene da  $\beta$ -tubulina amplificada e, posteriormente sequenciada, correspondeu a cerca de 450 bp para os 12 isolados de *Colletotrichum* com comportamento distintos quanto a sensibilidade ao benomyl. As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas quanto às diferenças em nucleotídeos e aminoácidos.

O alinhamento dos nucleotídeos demonstrou diferenças em 21 bases, sendo que, na maioria dos casos, estas estavam relacionadas com as diferenças entre as espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Apenas 7 substituições não estavam diretamente relacionadas com as espécies e, entre estas, apenas uma estava na região entre os códons 190 e 200.

Através do alinhamento e análise dos aminoácidos foram observadas diferenças no códon 198, correspondendo à substituição de ácido glutâmico por alanina nos 3 isolados dos *C. gloeosporioides* naturalmente resistentes ao benomyl (Figura 14). Em relação aos isolados resistentes selecionados em laboratório, não foram verificadas mutações nesta região do gene.

|        | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CA-7   | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | E | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CA-15  | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | E | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CA-26  | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | E | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CA-41  | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | E | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CG-5   | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | E | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CG-9   | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | E | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CG-12  | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | E | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CGR-5  | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | E | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CGR-9  | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | E | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CGR-12 | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | A | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CGR-14 | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | A | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |
| CGR-23 | V | E | P | Y | N | A | T | L | S | V | H | Q | L | V | E | N | S | D | A | T | F | C | I | D | N | E | A | L | Y | D | I | C | M | R |   |   |   |   |   |   |

Figura 14. Sequência de aminoácidos correspondente a região entre os códons 180 e 213 do gene da  $\beta$ -tubulina para isolados de *Colletotrichum* sensíveis ou resistentes ao benomyl.

## **6.4 Atividade do benomyl no controle da podridão floral dos citros**

### **6.4.1 Atividade do benomyl no controle pré e pós infecção**

No primeiro experimento foi verificada a presença de sintomas apenas nas flores inoculadas do tratamento testemunha. Entretanto, apesar de não terem sido observados sintomas característicos da doença nas pétalas, foi constatada, posteriormente, a presença de cálices retidos em todos os tratamentos.

No segundo experimento, realizado em plantas de ‘Valencia’, observou-se que o tratamento preventivo, efetuado 24 horas antes da inoculação do patógeno, foi o que apresentou o melhor controle em relação a porcentagem de flores com sintomas. Quanto ao número de cálices retidos, também foi observada uma boa eficiência do tratamento preventivo, porém não diferindo significativamente da testemunha. O tratamento efetuado 72 horas após a inoculação foi o que apresentou o menor número de cálices retidos, devido ao fato das estruturas florais dos ramos deste tratamento terem sido abortadas precocemente.

O terceiro experimento foi realizado em plantas de tangelo ‘Orlando’, verificando-se que o tratamento preventivo com benomyl, efetuado 24 horas antes da inoculação, assim como os tratamentos efetuados 24 e 48 horas após a inoculação, apresentaram um controle efetivo da podridão floral tanto em relação à porcentagem de flores com sintomas, quanto ao número de cálices retidos.

O quarto experimento foi realizado no final do período de florada com híbridos de tangerina, observando-se que o tratamento preventivo, assim como os tratamentos efetuados 24 e 48 horas após as inoculações, apresentaram um controle efetivo da doença em relação a porcentagem de flores com sintomas e ao número de cálices retidos nos ramos, confirmando os resultados observados no terceiro experimento.

Na média entre os quatro experimentos, o fungicida benomyl reduziu significativamente o número de flores infectadas quando aplicado 24 horas antes e até 48 horas após a inoculação. O número de cálices retidos também foi reduzido significativamente em relação à testemunha quando o fungicida foi aplicado 24 horas antes e até 24 horas após a inoculação do fungo. Entretanto, a aplicação de benomyl não apresentou um efeito significativo no controle da doença quando aplicado 72 horas após a inoculação (Quadro 23).



**Quadro 23.** Efeito da aplicação de benomyl em pré e pós inoculação no desenvolvimento de sintomas de podridão floral, causada por *Colletotrichum acutatum*.

| Momento da aplicação (horas) | Experimento                    |                              |                                |                 |                                |                 |                                |                 |                                |                 |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|
|                              | 1                              |                              | 2                              |                 | 3                              |                 | 4                              |                 | Média                          |                 |
|                              | % Flores sintomas <sup>x</sup> | Cálices retidos <sup>y</sup> | % Flores sintomas <sup>x</sup> | Cálices retidos | % Flores sintomas <sup>x</sup> | Cálices retidos | % Flores sintomas <sup>x</sup> | Cálices retidos | % Flores sintomas <sup>x</sup> | Cálices retidos |
| Testemunha (0)               | 5 a                            | 7 a                          | 16 a                           | 12 a            | 42 a                           | 15 a            | 57 a                           | 3 a             | 30 a                           | 9 a             |
| - 24                         | 0 b                            | 2 b                          | 0 b                            | 3 ab            | 1 b                            | 2 cd            | 17 b                           | 2 ab            | 6 c                            | 2 b             |
| + 24                         | 0 b                            | 3 ab                         | 10 ab                          | 4 ab            | 4 b                            | 1 d             | 12 b                           | 2 ab            | 8 bc                           | 3 b             |
| + 48                         | 0 b                            | 2 b                          | 14 a                           | 12 a            | 12 b                           | 1 d             | 18 b                           | 1 b             | 13 bc                          | 4 ab            |
| + 72                         | 0 b                            | 2 b                          | 10 ab                          | 1 b             | 35 a                           | 8 bc            | 37 ab                          | 3 a             | 22 ab                          | 4 ab            |

\* Médias seguidas pela mesma letra dentro de uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t de Waller-Duncan k-ratio a 5% de probabilidade.

<sup>x</sup> Porcentagem média de flores com sintomas por ramo.

<sup>y</sup> Número de cálices retidos por ramo.

#### 6.4.2 Efeito do benomyl na produção e viabilidade de conídios de *C. acutatum*

Considerando-se a média entre dois experimentos, a produção de conídios de *C. acutatum* não foi reduzida de maneira significativa após a aplicação do benomyl (Quadro 24). O número de conídios não diferiu significativamente entre os tratamentos no primeiro experimento e apresentou um incremento significativo na produção de conídios com a aplicação do benomyl, no segundo experimento.

Na média, a viabilidade dos conídios já presentes nas pétalas foi reduzida significativamente após a aplicação de benomyl, quando comparada à testemunha (Quadro 25). A redução na viabilidade dos conídios foi observada em todos os experimentos, sendo que apenas no primeiro, esta não foi significativa.

**Quadro 24.** Efeito da aplicação de benomyl em pétalas destacadas de laranja doce na produção de conídios de *Colletotrichum acutatum* em pétalas infectadas, sem esporulação.

| Tratamento | Conídios/pétala (x10 <sup>6</sup> ) |               |        |
|------------|-------------------------------------|---------------|--------|
|            | Experimento 1                       | Experimento 2 | Média  |
| Testemunha | 5,30 a                              | 5,43 b*       | 6,68 a |
| Benomyl    | 4,06 a                              | 7,99 a        | 5,39 a |

\*Médias seguidas pela mesma letra dentro de uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t de Waller-Duncan k-ratio a 5% de probabilidade.

**Quadro 25.** Efeito da aplicação de benomyl em pétalas destacadas de laranja doce na viabilidade de conídios provenientes de pétalas sintomáticas contendo esporos.

| Tratamento | Conídios viáveis/pétala (x10 <sup>6</sup> ) |               |               |
|------------|---|---------------|---------------|
|            | Experimento 1                               | Experimento 2 | Experimento 3 |
| Testemunha | 23,2 a*                                     | 5,3 a         | 10,6 a        |
| Benomyl    | 14,6 a                                      | 3,7 b         | 5,5 b         |

\*Médias seguidas pela mesma letra dentro de uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t de Waller-Duncan k-ratio a 5% de probabilidade.



## **7 DISCUSSÃO**

### **7.1 Avaliação do modelo de previsão**

O modelo de previsão testado durante os três anos mostrou que este foi eficiente para indicar a necessidade de pulverização para controle da podridão floral, e, principalmente, para mostrar quando as condições não são favoráveis à doença e, dessa forma, as pulverizações não são necessárias.

Os resultados do experimento de 1999 indicam que as pulverizações de acordo com o sistema ‘calendário’, ou seja, sem levar em consideração as condições favoráveis à doença, seriam desnecessárias, proporcionando aumento de custos aos produtores que seguem este esquema. Nos experimentos de 2000 e 2001, o modelo de previsão resultou na economia de uma pulverização, comparando-se com o sistema escolhido pelo produtor.

O número máximo de cálices retidos observado nos três anos de experimento foi de 209 cálices por 12 ramos, quantidade que pode ser considerada relativamente baixa, em relação aos 350 cálices por 12 ramos, obtidos por Timmer & Zitko (1996). Neste caso, em condições severas para a doença, 1 a 3 aplicações de fungicida aumentaram a produção de frutos em até 523%, quando comparados com a testemunha sem

pulverização, enquanto que o incremento máximo de produção obtido em Itapetininga foi de 200%.

Durante a avaliação do modelo, Timmer & Zitko (1996) verificaram que as previsões da doença foram mais precisas quando o nível da doença foi baixo ou moderado. Estas observações concordam com as condições verificadas nos experimentos conduzidos em Itapetininga-SP, pois apesar de ter havido condições para a doença, especialmente nos anos de 2000 e 2001, estas não foram extremamente severas, como, por exemplo, em 1996. De qualquer forma, pôde-se observar através da contagem do número de flores com sintomas durante o experimento de 2001 que, quando as condições para epidemia são favoráveis, o desenvolvimento da doença acontece de forma muito rápida e, por isso, deve-se monitorar a florada constantemente para que a tomada de decisão de pulverização seja o mais eficiente possível.

Os experimentos demonstraram ainda que, em alguns casos, uma maior quantidade significativa de flores infectadas e de cálices retidos, não correspondem a uma menor produtividade de frutos no talhão. Isto ocorre porque, normalmente, apenas uma pequena porcentagem das flores, cerca de 1%, acaba fixando frutos e, desta forma, caso o ataque não seja severo o suficiente, não ocorrem perdas de produtividade. Timmer & Zitko (1995) estimaram, na Flórida, que cerca de 5 a 6 frutos são perdidos para cada 100 cálices retidos, como consequência da podridão floral. Coincidentemente, a análise de regressão utilizando os dados coletados em todos os talhões no experimento de 2001 resultou no mesmo número de 6 frutos perdidos para cada 100 cálices retidos.

No experimento de 2001, os sistemas de tratamento modelo de previsão, produtor e calendário, com 2, 3 e 2 pulverizações, respectivamente, não diferiram significativamente em relação à quantidade de frutos, podendo-se considerar que o produtor

poderia ter economizado uma pulverização, sem comprometer a produtividade do pomar. Porém, devido ao alto valor da fruta na safra de 2001, o produtor, no caso, não estava disposto a aceitar nenhum risco que pudesse vir a comprometer a produção. A diferença de cerca de 11 frutos por planta, necessária para cobrir os custos de 3 pulverizações, foi próxima ao número de 9 frutos verificado entre as duas maiores diferenças obtidas, entre a testemunha e o tratamento modelo de previsão, isto considerando apenas o número total de frutos em 12 ramos da planta. Pode-se, portanto, concluir que as pulverizações para controle da doença são compensadas pelo aumento da produtividade, porém, estas podem ser otimizadas para que um número menor de pulverizações não acarrete perdas de produtividade.

É importante ressaltar ainda que, neste caso específico, o referido produtor tem um entendimento bastante abrangente dos fatores envolvidos na ocorrência da doença e, geralmente, faz as pulverizações nos momentos favoráveis à doença, coincidindo até com os tratamentos através dos sistemas de previsão, porém sem aceitar assumir nenhum risco. O modelo de previsão para controle da doença indica de forma eficiente a necessidade de pulverização e pode ser de grande valia, principalmente, como forma de evitar pulverizações desnecessárias, porém, os produtores podem também considerar as condições econômicas envolvidas em cada safra e o quanto de risco eles estariam dispostos a comprometer.

De forma geral, pode-se concluir que, quando a doença não é muito severa, a produtividade do pomar não chega a ser prejudicada e, portanto, as pulverizações seguindo o sistema 'calendário' seriam desnecessárias. Entretanto, quando as condições são extremamente favoráveis ao desenvolvimento da doença, as pulverizações devem ser efetuadas no momento certo, já que o desenvolvimento da epidemia é muito rápido e as pulverizações seguindo o esquema 'calendário' podem não coincidir com as condições favoráveis à ocorrência da doença.

## 7.2 Sistema de previsão PFD-FAD

O sistema de previsão para aplicação de fungicidas para controle da podridão floral foi desenvolvido com base nos princípios e conhecimentos adquiridos pela utilização do modelo de previsão (Timmer & Zitko, 1993; Timmer & Zitko, 1996; Timmer & Brown, 2000), visando uma maior facilidade de utilização pelos produtores e uma maior aplicabilidade em todas as áreas de cultivo dos citros que apresentam problemas com a doença.

Entre os fatores primários que determinam o potencial para a ocorrência de uma epidemia estão a disponibilidade de inóculo, a quantidade de chuva e a duração do molhamento foliar, basicamente os mesmos fatores considerados no modelo de previsão. Entretanto, o sistema PFD-FAD apresenta uma maior flexibilidade em lidar com tais fatores do que o modelo de previsão e considera ainda, alguns fatores de risco indiretos que são inerentes ao plantio e podem também afetar a incidência da podridão floral. Dentre estes fatores, o estágio e a intensidade da florada são considerados determinantes para a decisão se uma pulverização é ou não necessária. Algumas espécies ou cultivares de citros são mais suscetíveis do que outras, assim como certas regiões de cultivo que induzam a ocorrência de múltiplas florações são mais propensas à doença. Deve-se também considerar os fatores que podem influenciar um aumento da quantidade de inóculo, como a presença de árvores doentes, que geralmente florescem fora de época e podem aumentar as chances de incidência da doença, o histórico da doença nos anos anteriores, o número de “estrelinhas” remanescentes do ano anterior, a presença de flores com sintomas antes da ocorrência da florada principal e os eventos de chuva após o início da florada.

Para que uma pulverização seja justificada, deve-se, em primeiro lugar, ter uma quantidade de flores suficiente para cobrir o custo da aplicação se houver uma maior fixação de frutos. Entretanto, a porcentagem de flores que fixa frutos varia imensamente nas diferentes regiões de cultivo. Além disso, deve-se também incluir o valor do fruto, o qual pode

variar de acordo com a espécie ou cultivar envolvidos, a época do ano em que esse será colhido, as condições econômicas e o custo de aplicação.

Em muitas áreas, as perdas causadas pela podridão floral podem ser substanciais e os custos de manutenção do pomar precisam ser pagos independente das perdas de produção causadas pela doença. Neste caso, as aplicações de fungicida são economicamente justificáveis mesmo que o preço da fruta esteja baixo, sendo necessárias para que se tenha produtividade suficiente e, pelo menos, empatar os custos de produção. As pulverizações somente não são justificáveis quando o valor da safra for tão baixo que dificilmente os frutos serão colhidos.

Em regiões de produção temperadas, onde ocorre somente uma floração por ano, o florescimento normalmente é abundante e uniforme e, nesta situação, as decisões de pulverização são mais facilmente direcionadas. Porém, em áreas tropicais, o florescimento frequentemente ocorre 2 ou 3 vezes por ano, e pode variar imensamente em intensidade, tanto de talhão para talhão, como entre árvores dentro de um mesmo talhão. Além disso, os pomares que não são bem manejados freqüentemente, apresentam florescimento fraco e esporádico, e nunca há uma quantidade de flores suficiente para justificar uma aplicação. Assim sendo, na maioria das vezes, é mais importante melhorar a fertilização, o controle de plantas daninhas e o manejo de água, do que investir em fungicidas para controle da podridão floral. Quanto mais uniformes os talhões, com árvores bem enfolhadas, maior a chance de se produzir uma florada uniforme e abundante para justificar as pulverizações.

Outra consideração importante quanto à necessidade de pulverização é o efeito do estágio de desenvolvimento da florada na disponibilidade de inóculo. As aplicações de fungicida feitas no início da floração, ou seja, antes da presença de flores abertas na florada principal, geralmente são ineficientes. Assim sendo, enquanto não houverem algumas flores

abertas e a ocorrência de chuvas para infectar as pétalas, estas não representam grande potencial de disseminação da doença. Apesar dos botões florais também serem infectados, estas estruturas não são muito suscetíveis e não representam a principal fonte de inóculo. Desta forma, a única condição em que se recomenda que sejam efetuadas pulverizações seria durante a florada principal, a qual deverá representar produção suficiente para justificar os custos de aplicação. No estudo desenvolvido para determinar a atividade do benomyl no controle da podridão floral, foi demonstrado que as pulverizações com o fungicida protegem as flores da infecção e previnem o desenvolvimento de sintomas quando aplicado até 48 horas após a infecção. Porém, a aplicação de benomyl em flores com sintomas não mata os esporos e nem reduz o potencial para desenvolvimento da doença. Assim, na fase final da florada, quando praticamente não existem botões florais, as pulverizações também não são justificáveis, pois independente do que tenha ocorrido no decorrer da florada, as aplicações feitas neste período não irão controlar a doença ou aumentar a produtividade.

Os fatores mais importantes para determinar a ocorrência de uma epidemia de podridão floral são as condições climáticas durante o período da florada e a quantidade de inóculo disponível no período. Porém, a posição geográfica do plantio e o histórico anterior da doença no pomar também podem ter certa importância, assim como outros fatores inerentes à suscetibilidade da cultivar e a frequência relativa de florescimento durante o ano. Desta forma, os maiores riscos foram atribuídos para as variedades mais susceptíveis cultivadas em áreas tropicais, onde as plantas tendem a florescer duas ou mais vezes por ano, e os menores riscos foram atribuídos às mesmas variedades cultivadas em áreas com apenas um florescimento por ano. A presença de árvores doentes no pomar também foi considerada, pois estas, geralmente, florescem fora de época e mantêm a predisposição à infecção, aumentando assim o fator de risco. As chuvas que ocorrem durante o período da florada, porém antes dos

últimos 5 dias, promovem um incremento da quantidade de inóculo, mesmo que os sintomas ainda não sejam visualizados, através do desenvolvimento de uma grande quantidade de conídios sobre pétalas secas ou sobre a superfície de estruturas vegetativas e, por isso, este fator também foi levado em consideração.

Enquanto a equação do modelo de previsão (Timmer et al., 2002) requer dados exatos do número de flores doentes por árvore, quantidade de chuva e molhamento foliar, o sistema PFD-FAD requer somente uma estimativa geral da incidência da doença, essencialmente a disponibilidade de inóculo, assim como da quantidade de chuva e molhamento foliar e, por isso, o seu uso é mais simples, sendo que, no caso destas informações não estarem disponíveis para um talhão específico, pode-se fazer estimativas a partir de localidades próximas.

O sistema foi desenvolvido para ser ligeiramente conservativo, ou seja, ocasionalmente poderá ser recomendada uma aplicação que talvez não fosse extremamente necessária. Porém, os produtores podem ainda introduzir o seu próprio julgamento no sistema, baseando-se nos fatores econômicos da cultura ou outras considerações. Por exemplo, se o valor total de risco é marginal, os produtores podem pulverizar no caso de uma safra com alto valor de mercado e aceitar um risco maior se o preço da fruta estiver baixo. De forma geral, é melhor aceitar menos riscos nos estádios iniciais da florada e aceitar mais riscos no final da florada, especialmente se uma grande quantidade de frutos já estiver fixado.

As indicações do sistema devem ser tão precisas quanto o modelo de previsão da Flórida, porém eliminando algumas falhas, como a indicação de pulverizações no caso de chuvas intensas e de curta duração, podendo ser útil na maioria das áreas onde a doença é um problema, além de evitar que aplicações desnecessárias sejam efetuadas preventivamente sem assumir nenhum risco.

Os resultados do experimento em condições de campo demonstraram que todos os tratamentos reduziram a infecção das flores e o número de cálices retidos em mais de 50%, além de aumentar a produção de frutos em mais de 20%, quando comparados com a testemunha não pulverizada. Os diferentes sistemas de pulverização foram bastante próximos quanto a efetividade do controle, entretanto, o sistema PFD-FAD apresentou como vantagem, a aplicação de apenas um tratamento com fungicida.

### **7.3 Resistência de isolados de *C. acutatum* ao benomyl**

Embora o fungo *C. acutatum* não seja altamente sensível ao benomyl, baixas concentrações do fungicida inibem substancialmente o seu crescimento 'in vitro', reduzindo o diâmetro da colônia em cerca de 50% na concentração de 1,0 µg/mL, comparando-se com a testemunha (Sonoda & Pelosi, 1988; Goes & Kimati, 1998). Quando o crescimento foi medido em relação à área da colônia, verificou-se que esse foi reduzido em cerca de 50% na concentração de apenas 0,1 µg/mL. O efeito do fungicida sobre o crescimento do tubo germinativo apresentou comportamento similar ao efeito sobre o crescimento micelial. Assim, apesar do benomyl não eliminar o fungo ou reduzir totalmente o seu crescimento, mesmo nas concentrações mais altas, ele reduz substancialmente o crescimento de *C. acutatum* e, desta forma, deve também reduzir o seu desenvolvimento nas pétalas de citros.

O benomyl, em solução aquosa, se converte em MBC + BIC. Porém, como o benomyl é praticamente insolúvel em água, em condições práticas, uma considerável parte do benomyl aplicado permanece na superfície da planta, convertendo-se, de forma gradual em MBC (Picinini, 1994). O fato de o fungicida benomyl ter apresentado um melhor controle sobre a germinação dos conídios na concentração mais baixa, de 0,1 µg/mL, pode estar



relacionado com a quantidade de MBC que é realmente absorvida pelos conídios. É possível que em soluções mais concentradas, os sítios de absorção fiquem tão carregados de moléculas em suspensão, que uma quantidade menor de MBC consiga penetrar na célula.

Não foi encontrado nenhum isolado de *C. acutatum* altamente resistente ou altamente sensível ao benomyl entre os 340 isolados provenientes de 17 pomares com diferentes históricos de uso do benomyl. Apesar da variabilidade entre os isolados ser pequena, assim como entre os pomares de procedência destes, foram encontradas diferenças significativas em algumas das interações analisadas em uma, ou em ambas concentrações testadas. Algumas destas diferenças podem estar relacionadas com o fato dos experimentos terem sido conduzidos em diferentes laboratórios, no Brasil e na Florida, e também devido a variações que podem ocorrer em algumas condições, como, por exemplo, na concentração exata do fungicida durante o preparo do meio de cultura.

Como forma de comprovar que a quantidade de isolados de *C. acutatum* avaliada seria suficiente para representar a população quanto a possibilidade de encontrar isolados resistentes, foram também coletados isolados de *C. gloeosporioides*, que é um saprófita comum em citros, além de causar podridão em frutos pós-colheita, em 7 dos pomares estudados, sendo que, entre os 140 isolados avaliados, foram encontrados 7 isolados resistentes ao benomyl.

Goes & Kimati (1998) não verificaram diferenças significativas no crescimento micelial de três isolados provenientes de pomares com históricos diferentes quanto a regularidade de uso do fungicida e, apesar do fungo ter apresentado o seu crescimento micelial reduzido em cerca de 85% na concentração de 2500 µg/mL de benomyl, os autores consideraram não se tratar de resistência, e sim, de uma insensibilidade natural do fungo ao produto.

Em estudo semelhante efetuado por Romero & Sutton (1998) para *Mycosphaerella fijenses*, agente causal do mal da Sigatoka da bananeira, os autores verificaram a existência de até 86% de resistência do fungo ao benomyl em bananais com histórico de mais de 10 anos de pulverização do produto, sendo que não foi verificada a existência de isolados resistentes provenientes de localidades onde o fungicida nunca havia sido utilizado.

Os resultados do estudo molecular demonstraram que os isolados de *C. acutatum* não apresentaram mutação na região do gene da  $\beta$ -tubulina que, normalmente, confere resistência ao benomyl em diversas outras espécies de fungos fitopatogênicos. No caso de *C. gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene*, Buhr & Dickman (1994) observaram que uma substituição do ácido glutâmico por lisina no códon 198 conferiu resistência do isolado ao benomyl.

Alguns estudos têm demonstrado que o nível de resistência de um determinado isolado ao fungicida pode estar relacionado com a mutação que ocorreu no gene da  $\beta$ -tubulina. No códon 198, a substituição do ácido glutâmico pode ser por alanina, glicina, treonina, ácido aspártico ou lisina (Yarden & Katan, 1993; Albertini et al., 1999). No presente estudo, o ácido glutâmico foi substituído pela alanina nos dois isolados naturalmente resistentes ao benomyl, o que, segundo os autores, caracteriza um alto nível de resistência ao fungicida.

Koenraadt et al. (1992) também observaram substituições no códon 198, de ácido glutâmico para alanina, glicina ou lisina em isolados de *Venturia inaequalis*. Entretanto, quando os isolados foram induzidos à resistência em laboratório, os pontos de mutação foram diferentes daqueles observados nos isolados naturalmente resistentes, o que pressupõe que as mutações, para os dois isolados resistentes selecionados em laboratório, CGR-5 e CGR-9, devam estar fora da região sequenciada.

Pode-se considerar, com base nos resultados obtidos, que o fungo *C. acutatum*, não apresenta resistência adquirida ao benomyl devido ao uso consecutivo do produto. É possível que esta espécie apresente alguma característica distinta no sistema de absorção do fungicida que não permita a inibição completa do fungo e, por isso, não ocorre a pressão de seleção de mutantes resistentes, como no caso de *C. gloeosporioides* e outras espécies que são totalmente inibidas pelo produto.

#### **7.4 Atividade do benomyl no controle da podridão floral**

O controle da podridão floral dos citros pelo benomyl, aparentemente, apresenta um comportamento único e distinto. Os resultados obtidos demonstram que os isolados de *C. acutatum* de citros não são altamente sensíveis ao benomyl, ‘in vitro’, confirmando os resultados obtidos em estudos anteriores com isolados de citros (Sonoda & Pelosi, 1988; Goes & Kimati, 1998), e também de outras culturas (Adaskaveg & Hartin, 1997; Bernstein et al., 1995; Freeman et al., 1998). Entretanto, desde os primeiros estudos para controle da podridão floral em Belize (Denham, 1979; Fagan, 1984), assim como em trabalhos subseqüentes no México (Orozco Santos & Gonzales Garza, 1986) e na Flórida (Timmer & Zitko, 1993; Timmer & Zitko, 1996), o fungicida benomyl tem demonstrado ser um dos mais eficientes no controle da doença no campo.

O fungicida benomyl apresenta uma excelente atividade no controle curativo de doenças como a sarna da macieira e outras doenças de frutíferas perenes (O’Leary & Sutton, 1986; Szkolnik, 1978; Szkolnik, 1979), mesmo quando aplicado de 3 a até 5 dias após a infecção. Bushong & Timmer (2000) verificaram que o benomyl proporcionou um excelente controle da verrugose dos citros quanto aplicado até 3 dias após a inoculação. No caso das flores de citros inoculadas com *C. acutatum*, o produto foi efetivo quando aplicado até 48

horas após a inoculação, além de prevenir o desenvolvimento dos sintomas quando aplicado antes da inoculação.

No primeiro experimento, apesar de não terem sido observados sintomas característicos da doença nas pétalas, foi constatado, posteriormente, a presença de cálices retidos em todos os tratamentos. Em condições de campo, têm-se a impressão de que a quantidade de cálices retidos é sempre maior do que a quantidade de flores com sintomas que foram visualizadas. Este fato pode estar relacionado com o envolvimento de fitohormônios após a infecção das flores, sendo que estudos preliminares têm demonstrado o suposto envolvimento do etileno no processo de infecção das flores e retenção dos cálices (\*Chung, 2002).

Diversos estudos demonstraram que a aplicação do fungicida benomyl é capaz de eliminar e de prevenir a produção de ascósporos pelo fungo causador da sarna da macieira (Szkolnik, 1978; Szkolnik, 1979; Gadoury & MacHardy, 1984). Whiteside (1977) constatou que o fungicida reduziu a produção de picnídios em ramos afetados pela melanose dos citros, além de prevenir o desenvolvimento do pseudotécio e a formação de ascósporos de *Mycosphaerella citri*, agente causal da mancha graxa (Whiteside, 1973). A aplicação do fungicida também foi capaz de erradicar o inóculo e reduzir a esporulação do fungo agente causal da verrugose (Timmer & Zitko, 1993). Porém, no caso da podridão floral, o benomyl não reduziu a produção de conídios em pétalas sintomáticas e reduziu apenas de maneira parcial a viabilidade do inóculo existente, parecendo que uma vez que a infecção esteja bem estabelecida nas pétalas, a aplicação do fungicida não diminui muito o desenvolvimento da epidemia. Em estudo similar, Goes & Kimati (1998) observaram um incremento no número de conídios de *C. acutatum* produzidos em meio de cultura com baixas doses de benomyl.

---

\* Chung, K.R. (CREC, University of Florida, Lake Alfred-FL). Comunicação pessoal, 2002.

Apesar de algumas diferenças verificadas entre os tratamentos serem consideradas estatisticamente significativas, questiona-se, em termos biológicos, se tais diferenças seriam significativas no controle da doença, considerando-se que os números correspondem a milhões de esporos na superfície.

Segundo Dekker (1977), o fungicida benomyl atua no núcleo da célula fúngica e interfere no metabolismo do ácido nucléico, impedindo dessa forma a multiplicação dos conídios e, por isso, era esperado que o produto apresentasse um controle efetivo sobre a produção de esporos de *C. acutatum*.

A atividade do benomyl no controle da podridão floral dos citros, aparentemente, baseia-se na habilidade do fungicida em prevenir a infecção, reduzir o crescimento micelial e, conseqüentemente, a esporulação nas pétalas. A concentração de fungicida aplicada nos pomares em condições de campo varia entre 0,25 a 1,0 g/litro, o que seria suficiente para reduzir o crescimento de *C. acutatum* e, considerando que a duração de uma pétala na planta é relativamente curta, uma redução significativa no crescimento do fungo pode ser o suficiente para que a infecção não chegue a causar danos.

## 8 CONCLUSÕES

- O modelo de previsão para controle da podridão floral foi eficiente na recomendação de pulverização visando o controle da podridão floral, nas condições de Itapetininga – SP.
- O novo sistema de previsão PFD-FAD desenvolvido, mostrou-se promissor para a recomendação de pulverização para controle da podridão floral, apresentando como vantagem a facilidade de uso.
- O fungo *C. acutatum* apresenta baixa sensibilidade ao fungicida benomyl ‘in vitro’.
- Foram encontradas diferenças entre os isolados de *C. acutatum* provenientes de pomares com diferentes históricos de uso do benomyl, porém não foi encontrado nenhum isolado resistente ao fungicida.
- Não foi verificada a mutação de aminoácido na região do gene da  $\beta$ -tubulina que caracteriza a resistência de fungos ao benomyl, nos isolados de *C. acutatum*.
- O fungicida benomyl controla a podridão floral quando aplicado 24 horas antes e até 48 horas após a inoculação de *C. acutatum*.
- O benomyl reduz a viabilidade dos esporos de *C. acutatum*, porém não afeta a produção de conídios em pétalas já infectadas.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*

- ADASKAVEG, J. E, AND HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, v.87, p.979-87, 1997.
- AGOSTINI, J. P., TIMMER, L. W. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*. v.76, p.1176-8, 1992.
- AGOSTINI, J.P., TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. *Phytopathology*, v.84, p.420-5, 1994.
- AGOSTINI, J.P., TIMMER, L.W., AND MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*, v.82, p.1377-82, 1992.
- AGOSTINI, J.P., GOTTWALD, T.R., TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. *Phytopathology*, v.83, p.485-90, 1993.

---

\* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Ciências Agrônômicas. *Normas para elaboração de dissertações e teses*. Botucatu, 1997. 35p.

- ALBERTINI, C., GRETT, M. LEROUX, P. Mutations on the  $\beta$ -tubulin gene associated with benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.64, p.17-31, 1999.
- BERNSTEIN, B., ZEHR, E. I., DEAN, R. A., AND SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Disease*, v.79, p. 478-82, 1995.
- 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*, v.86, p.523-7, 1996.
- BUHR, T.L., DICKMAN, M.B. Isolation, characterization, and expression of a second  $\beta$ -tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, p.4155-9, 1994.
- BUSHONG, P.M., TIMMER, L.W. Evaluation of postinfection control of citrus scab and melanose with benomyl, fenbuconazole and azoxystrobin. *Plant Disease*, v.84, p.1246-9, 2000.
- COMPÊNDIO de defensivos agrícolas. *Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola*. 6 ed. São Paulo: Organização Andrei Editora, 1999. p.97-103.
- DANNENBERGER, T.K., VARGAS, J.M., JONES, A.L. A model for weather-based forecasting of anthracnose on annual bluegrass. *Phytopathology*, v.74, p.448-51, 1984.
- DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology*, v.24, p.43-65, 1986.



- DAVIDSE, L.C., FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl-carbamate to fungal tubulin as mechanism of resistance to this antimicotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Cell Biology*, v.72, p.174-93, 1977.
- DEKKER, J. Resistance. In: MARSH, R.W. *Systemic fungicides*. London: Logeman, 1977. p.176-97.
- DENHAM, T.G. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. *PANS*, v.25, p.30-36, 1979.
- DENHAM, T.G., WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. *Annual of Applied Biology*, v.98, p.65-7, 1981.
- DIAS, M.S.C., PERES, N.A.R., SOUZA, N.L. Efeito de fungicidas 'in vitro' no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da queda prematura de frutos jovens em laranjeira Pêra (*Citrus sinensis*). *Fitopatologia Brasileira*, v.20, p.355, 1995.
- EASTBURN, D.M., GUBLER, W.D. Strawberry anthracnose: Detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil. *Plant Disease*, v.74, p.161-3, 1990.
- FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop: a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Annual of Applied Biology*, v.91, p.13-20, 1979.
- FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial/ground spraying. *Turrialba*, v.34, p.179-86, 1984.
- 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.513-21, 1991.

- FEICHTENBERGER, E. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. *Laranja*, Cordeirópolis, v.15, n.2, p.109-28, 1994.
- FEICHTENBERGER, E., MÜLLER, G.W., GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. *Manual de Fitopatologia*. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p.280-4.
- FEICHTENBERGER, E., SPOSITO, M.B. Fungicide treatments for control of Postbloom Fruit Drop of citrus (*Colletotrichum acutatum*) in 'Pêra' sweet orange trees. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE CONGRESS, 9, 2000, Orlando. *Program and abstracts...* Orlando: International Society of Citriculture, 2000. p.145.
- FITZELL, R.D., PEAK, C.M., DARNELL, R.E. A model for estimating infection levels of anthracnose disease of mango. *Annual Applied Biology*, v.104, p.451-8, 1984.
- FREEMAN, S., KATAN, T., AND SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, v.82, p.596-605, 1998.
- GADOURY, D.M., MacHARDY, W.E. Integration of fungicide and insecticide applications in low inoculum orchards. *Fungicide and Nematicide Tests*, v.39, p.10, 1984.
- GANTOTTI, B.V., DAVIS, M.J. Detection of pectinase isozyme polymorphism in *Colletotrichum gloeosporioides* from citros. *Phytopathology*, v.81, p.1170, 1991.
- GOES, A. de, KIMATI, H. Efeito de benomyl no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da queda prematura de frutos jovens de citros. *Summa Phytopathologica*, v.20, p.46, 1994.

- GOES, A. de, KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados à Queda Prematura dos Frutos Cítricos. *Summa Phytopathologica*, 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*, v.23, p.10-4, 1997b.
- GOES, A. de, KIMATI, H. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos: resistente ou insensível ao benomyl? *Summa Phytopathologica*, v.24, p.246-53, 1998.
- GRIFFEE, P.J. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, v.60, p.887, 1973.
- HASSE, G. *A laranja no Brasil*. São Paulo: Duprat & Iobe Propaganda, 1987.
- HEWITT, H.G. Fungicide resistance. In: *Fungicides in Crop Protection*. Wallingford: Centre for Agriculture and Biosciences International, 1998. p.155-81.
- KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. *Agrotécnica*, v.1, p.5-7, 1987.
- KOENRAADT, H., SOMERVILLE, S.C., JONES, A.L. Characteristics of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, v.82, p.1348-54, 1992.
- KOLLER, L.J., SCHEINPFLUG, H. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge. *Plant Disease*, v.71, p.66-74, 1987.

- KURAMAE-IZIOKA, E.E, LOPES, C.R, SOUZA, N.L, MACHADO, M.A. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v.103, p.323-9, 1997.
- LIYANAGE, H.D., McMILLAN, R.T., KISTLER, H.C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*, v.82, p.1371-6, 1992.
- LIYANAGE, H.D., KÖLLER, W., McMILLAN, R.T., KISTLER, H.C. Variation in cutinase from two populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*, v.83, p.113-6, 1993.
- MADDEN, L.V., WILSON, L.L. ELLIS, M.A. Field spread of anthracnose fruit rot of strawberry in relation to ground cover and ambient weather conditions. *Plant Disease*, v.77, p.861-6, 1993.
- MAGAREY, R.D., TRAVIS, J.W., RUSSO, J.M., SEEM, R.C., MAGAREY, P.A. Decision support systems: Quenching the thirst. *Plant Disease*, v.86, p.4-14, 2002.
- McMILLAN, R., TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop in southern Florida. *The Citrus Industry*, v.69, p.15-8, 1988.
- McMILLAN, R., TIMMER, L.W. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Florida. *Plant Disease*, v.73, p.81, 1989.
- MELO, M.B. de, MORAIS, C.F.M. de. Controle químico da queda de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 11, Petrolina, 1991. *Programas e resumos...* Petrolina: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1991. n.p.

- MILLS, P.R., HODSON, A., BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical crops. In: BAILEY, J.A., JEGER, M.J. (eds) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, p.269-88, 1992.
- NENE, Y.L., THAPLIYAL, P.N. Systemic fungicides. *Fungicides in Plant Disease Control*. 2.ed. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co., 1979. p.212-349.
- O'LEARY, A.L., SUTTON, T.B. Effects of postinfection applications of the ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides on lesion formation and pseudotecial development of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, v.76, p.119-24, 1986.
- OROZCO SANTOS, M., GONZALEZ GARZA, R. Caída de fruto pequeño y su control en naranja 'Valencia' en Veracruz. *Agricultura Técnica en México*, v.12, n.2, p.259-69, 1986.
- PERES, N.A.R. Caracterização patogênica, morfológica, cultural e molecular de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum* spp. em frutas pós-colheita. Botucatu, 1998. 91p. (Dissertação - Mestrado - Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Campus de Botucatu).
- PERES, N. A. R., SOUZA, N. L., AND TIMMER, L. W. Postbloom fruit drop in Brazil and Florida: occurrence and control by fungicides. *Proceedings of International Society of Citriculture*, 2002 (in press).
- PICININI, E.C. Fungicidas benzimidazoles. *Revisão Anual de Patologia de plantas*, v.2, p.357-409, 1994.
- PORTO, O. de M. Comparação de programas para controle químico da queda anormal de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, Recife, 1979. *Anais...* Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981a. p.481-7.

- PORTO, O. de M. Efeito da época e número de aplicações de benomyl no controle da queda anormal de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, Recife, 1979. *Anais...* Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981b. p.569-77.
- PORTO, O. de M., ROSSETTI, V., DORNELLES, C.M.M. Queda de frutos jovens de citros, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, Pelotas, 1979. *Anais...* Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p.681-92.
- PRATES, H.S., RODRIGUES, J.C.V., NOGUEIRA, N.L. Observações sobre a doença podridão floral na citricultura paulista. *Fitopatologia Brasileira*, v.20, p.296, 1995.
- RODRIGUES, J.C.V., LÉON, T.N. Resistência a benomyl em *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. *Laranja*, v.14, n.1, p.357-63, 1993.
- RODRIGUES, J.C.V., NOGUEIRA, N.L., LÉON, T.N. Resistência de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. isolado de citros a benomyl. *Summa Phytopathologica*, v.20, p.52, 1994.
- ROMERO, R.A., SUTTON, T.B. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black Sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Disease*, v.82, p.931-4, 1998.
- 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, Recife, 1981. *Anais...* Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. p.641-54.

- SANDERS, G.M., KORSTEN, L., WEHNER, F.C. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, v.106, p.745-52, 2000.
- SONODA, R.M., PELOSI, R.R. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida. *Proceedings of Florida State Horticulture Society*, v.101, p.36-8, 1988.
- SOUZA FILHO, B.F. de, BATISTA, F.A.S., EMIDIO FILHO, J., TRINDADE, J. Controle químico da mancha aureolada e da queda dos frutos jovens em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, Pelotas, 1979. *Anais...* Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p.216-20.
- SZKOLNIK, M. Techniques involved in greenhouse evaluation of deciduous tree fruit fungicides. *Annual Review of Phytopathology*, v.16, p.103-29, 1978.
- SZKOLNIK, M. Postinfection evaluation of fungicides in the greenhouse for apple scab control. *Fungicide and Nematicide Tests*, v.35, p.21, 1979.
- SUN MICROSYSTEMS, INC. Overview of servlets. In: The Java Tutorial (<http://java.sun.com/docs/books/tutorial/servlets/overview/index.html>), 2001.
- TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus – symptoms, disease cycle and control. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society*, v.106, p.102-5, 1993.
- TIMMER, L.W. Evaluation of fungicides for control of postbloom fruit drop by *Colletotrichum acutatum*. *Fungicide and Nematicide Tests*, v.53, p.335, 1998.
- TIMMER, L.W., ZITKO, S.E. Aerial applications of fungicide for control of postbloom fruit drop. *Citrus Industry*, v.73, p.26-7, 1991.

- TIMMER, L.W., ZITKO, S.E. Timing of fungicide applications for control of postbloom fruit drop citrus in Florida. *Plant Disease*, v.76, p.820-3, 1992.
- TIMMER, L.W., ZITKO, S.E. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. *Plant Disease*, v.77, p.501-4, 1993.
- TIMMER, L.W., ZITKO, S.E. Early season indicators of postbloom fruit drop of citrus and the relationship of disease and fruit production. *Plant Disease*, v.79, p.1017-20, 1995.
- TIMMER, L.W., ZITKO, S.E. Evaluation of model for prediction of postbloom fruit drop of citrus. *Plant Disease*, v.80, p.380-3, 1996.
- TIMMER, L.W., BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D., FREEMAN, S., DICKMAN, M.B. (eds) Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interactions of *Colletotrichum*. APS Press Inc., St. Paul, p.300-16, 2000.
- TIMMER, L.W., ROBERTS, P.D., CHUNG, K.R. Postbloom fruit drop. In: L.W. TIMMER. 2002 Florida Citrus Pest Management Guide. University of Florida Coopérative Extension Service, IFAS, Gainesville, FL, 2002. p.85-8.
- 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*, v.78, p.329-34, 1994.
- TUITE, J. *Plant pathological methods: fungi and bacteria*. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.
- TYSON, J.L., FULLERTON, R.A. First report of benomyl resistance in *Elsinoe fawcettii* in New Zealand citrus orchards. *Australasian Plant Pathology*, v.30, p.69, 2001.
- WHITESIDE, J.O. The possibilities of using ground sprays to control citrus greasy spot. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, v.96, p.19-23, 1973.



WHITESIDE, J.O. Sites of action of fungicides in the control of citrus melanose.

*Phytopathology*, v.67, p.1067-72, 1977.

WHITESIDE, J.O. Tolerance of *Mycosphaerella citri* to benomyl in Florida citrus groves.

*Plant Disease*, v.64, p.300-2, 1980a.

WHITESIDE, J.O. Detection of benomyl tolerant strains of *Elsinoe fawcettii* in Florida citrus

groves and nurseries. *Plant Disease*, v.64, p.871-2, 1980b.

WORTING, C.R. *The pesticide manual: a world compendium*. 6.ed. Croydon: British Crop

Protection Council, 1979.

YARDEN, O., KATAN, T. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of

beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of

*Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, v.83, p.1478-83, 1993.

ZULFIQAR, M., BRLANSKY, R.H., TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative

tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia*, v.88,

p.121-8, 1996.

## APÊNDICE

**Quadro 26.** Dados climáticos provenientes da estação climática. Fazenda Umuarama, Itapetininga, 1999.

| Data     | Temperatura máxima (°C) | Temperatura mínima (°C) | Temperatura média (°C) | Quantidade chuva (mm) |
|----------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| 05/07/99 | 13,0                    | 11,0                    | 12,0                   | 4,0                   |
| 06/07/99 | 13,0                    | 12,0                    | 12,5                   | 0                     |
| 07/07/99 | 14,0                    | 11,0                    | 12,5                   | 37,6                  |
| 08/07/99 | 21,0                    | 12,0                    | 16,5                   | 0                     |
| 09/07/99 | 17,0                    | 11,0                    | 14,0                   | 0                     |
| 10/07/99 | 21,0                    | 12,0                    | 16,5                   | 0                     |
| 11/07/99 | 21,0                    | 10,0                    | 15,5                   | 0                     |
| 12/07/99 | 22,0                    | 9,0                     | 15,5                   | 0                     |
| 13/07/99 | 22,0                    | 10,0                    | 16,0                   | 0                     |
| 14/07/99 | 25,0                    | 11,0                    | 18,0                   | 0                     |
| 15/07/99 | 26,0                    | 12,0                    | 19,0                   | 0                     |
| 16/07/99 | 25,0                    | 12,0                    | 18,5                   | 0                     |
| 17/07/99 | 28,0                    | 12,0                    | 20,0                   | 0                     |
| 18/07/99 | 22,0                    | 13,0                    | 17,5                   | 0                     |
| 19/07/99 | 26,0                    | 14,0                    | 20,0                   | 0                     |
| 20/07/99 | 26,0                    | 15,0                    | 20,5                   | 0                     |
| 21/07/99 | 21,0                    | 11,0                    | 16,0                   | 0                     |
| 22/07/99 | 21,0                    | 11,0                    | 16,0                   | 0                     |
| 23/07/99 | 21,5                    | 12,0                    | 16,8                   | 0                     |
| 24/07/99 | 21,5                    | 11,0                    | 16,3                   | 2,0                   |
| 25/07/99 | 26,0                    | 11,0                    | 18,5                   | 0                     |
| 26/07/99 | 26,0                    | 12,0                    | 19,0                   | 0                     |
| 27/07/99 | 29,0                    | 13,0                    | 21,0                   | 0                     |
| 28/07/99 | 21,0                    | 12,0                    | 16,5                   | 0                     |
| 29/07/99 | 26,0                    | 12,0                    | 19,0                   | 0                     |
| 30/07/99 | 26,0                    | 12,0                    | 19,0                   | 0                     |
| 31/07/99 | 16,0                    | 11,0                    | 13,5                   | 0                     |
| 01/08/99 | 18,0                    | 11,0                    | 14,5                   | 0                     |
| 02/08/99 | 21,0                    | 10,0                    | 15,5                   | 0                     |
| 03/08/99 | 21,0                    | 11,0                    | 16,0                   | 0                     |
| 04/08/99 | 25,0                    | 10,0                    | 17,5                   | 0                     |
| 05/08/99 | 25,0                    | 11,0                    | 18,0                   | 0                     |
| 06/08/99 | 23,0                    | 10,0                    | 16,5                   | 0                     |
| 07/08/99 | 25,0                    | 14,0                    | 19,5                   | 0                     |
| 08/08/99 | 17,0                    | 8,0                     | 12,5                   | 0                     |
| 09/08/99 | 21,0                    | 6,0                     | 13,5                   | 0                     |
| 10/08/99 | 26,0                    | 7,0                     | 16,5                   | 0                     |

|          |      |      |      |   |
|----------|------|------|------|---|
| 11/08/99 | 29,0 | 9,0  | 19,0 | 0 |
| 12/08/99 | 30,0 | 11,0 | 20,5 | 0 |
| 13/08/99 | 29,0 | 12,0 | 20,5 | 0 |
| 19/01/00 | 14,0 | 6,0  | 10,0 | 0 |
| 15/08/99 | 14,0 | 6,0  | 10,0 | 0 |
| 16/08/99 | 17,0 | 8,0  | 12,5 | 0 |
| 17/08/99 | 20,0 | 9,0  | 14,5 | 0 |
| 18/08/99 | 21,0 | 10,0 | 15,5 | 0 |
| 19/08/99 | 25,0 | 11,0 | 18,0 | 0 |
| 20/08/99 | 26,0 | 19,0 | 22,5 | 0 |
| 21/08/99 | 27,0 | 19,0 | 23,0 | 0 |
| 22/08/99 | 28,0 | 17,0 | 22,5 | 0 |
| 23/08/99 | 24,0 | 11,0 | 17,5 | 0 |
| 24/08/99 | 25,0 | 11,0 | 18,0 | 0 |
| 25/08/99 | 26,0 | 11,0 | 18,5 | 0 |
| 26/08/99 | 30,0 | 11,0 | 20,5 | 0 |
| 27/08/99 | 29,0 | 14,0 | 21,5 | 0 |
| 28/08/99 | 30,0 | 11,0 | 20,5 | 0 |
| 29/08/99 | 30,0 | 12,0 | 21,0 | 0 |
| 30/08/99 | 30,0 | 12,0 | 21,0 | 0 |
| 31/08/99 | 30,0 | 13,0 | 21,5 | 0 |
| 01/09/99 | 32,0 | 11,0 | 21,5 | 0 |
| 02/09/99 | 33,0 | 12,0 | 22,5 | 0 |
| 03/09/99 | 33,0 | 12,0 | 22,5 | 0 |
| 04/09/99 | 33,0 | 14,0 | 23,5 | 0 |
| 05/09/99 | 32,0 | 10,0 | 21,0 | 0 |

---

**Quadro 27.** Dados climáticos provenientes da estação climática. Fazenda Umuarama, Itapetininga, 2000.

| Data            | Temperatura máxima (°C) | Temperatura mínima (°C) | Temperatura média (°C) | Quantidade chuva (mm) | Molhamento foliar (h) |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 01/08/00        | 19,6                    | 11,0                    | 14,4                   | 0,4                   | 16,8                  |
| 02/08/00        | 25,9                    | 12,5                    | 18,5                   | 0                     | 9,0                   |
| 03/08/00        | 17,6                    | 12,5                    | 15,4                   | 0                     | 16,3                  |
| 04/08/00        | 13,7                    | 7,4                     | 10,6                   | 0                     | 13,3                  |
| 05/08/00        | 21,6                    | 5,1                     | 11,4                   | 0                     | 13,8                  |
| 06/08/00        | 23,5                    | 8,6                     | 15,3                   | 0                     | 11,5                  |
| 07/08/00        | 28,2                    | 13,3                    | 19,6                   | 0                     | 9,8                   |
| 08/08/00        | 30,2                    | 10,6                    | 20,0                   | 0                     | 9,0                   |
| 09/08/00        | 30,6                    | 11,8                    | 20,2                   | 0                     | 8,3                   |
| 10/08/00        | 15,3                    | 12,1                    | 13,6                   | 0,8                   | 8,5                   |
| 11/08/00        | 14,1                    | 6,7                     | 10,8                   | 0                     | 1,8                   |
| 12/08/00        | 12,9                    | 6,3                     | 8,8                    | 0                     | 1,0                   |
| 13/08/00        | 20,4                    | 6,3                     | 12,0                   | 0                     | 12,5                  |
| 14/08/00        | 27,8                    | 7,1                     | 16,2                   | 0                     | 11,3                  |
| 15/08/00        | 29,4                    | 9,8                     | 17,7                   | 3,4                   | 15,5                  |
| 16/08/00        | 15,3                    | 10,6                    | 13,2                   | 3,8                   | 8,3                   |
| 17/08/00        | 20,4                    | 9,8                     | 14,2                   | 15                    | 17,8                  |
| 18/08/00        | 22,7                    | 9,0                     | 15,7                   | 0                     | 8,8                   |
| 19/08/00        | 23,5                    | 8,2                     | 14,7                   | 0                     | 6,0                   |
| 20/08/00        | 28,6                    | 11,4                    | 18,0                   | 0                     | 11,5                  |
| 21/08/00        | 30,2                    | 11,8                    | 20,5                   | 0                     | 8,3                   |
| 22/08/00        | 29,8                    | 11,4                    | 20,3                   | 0                     | 3,3                   |
| 23/08/00        | 30,2                    | 12,1                    | 20,7                   | 0                     | 0,8                   |
| 24/08/00        | 31,0                    | 11,4                    | 20,9                   | 0                     | 7,0                   |
| 25/08/00        | 32,9                    | 11,4                    | 23,1                   | 0                     | 8,3                   |
| 26/08/00        | 32,9                    | 16,5                    | 24,6                   | 0                     | 3,5                   |
| 27/08/00        | 19,6                    | 14,1                    | 16,6                   | 18,8                  | 17,8                  |
| 28/08/00        | 16,9                    | 12,9                    | 15,1                   | 15                    | 20,8                  |
| 29/08/00        | 13,3                    | 12,5                    | 13,0                   | 0                     | 7,5                   |
| 30/08/00        | -                       | -                       | -                      | 0                     | 8,0                   |
| 31/08/00        | 19,6                    | 13,7                    | 17,0                   | 5                     | 15,0                  |
| <b>01/09/00</b> | <b>18,8</b>             | <b>10,6</b>             | <b>14,1</b>            | <b>58,4</b>           | <b>19,0</b>           |
| <b>02/09/00</b> | <b>11,8</b>             | <b>10,2</b>             | <b>11,0</b>            | <b>30,2</b>           | <b>9,5</b>            |
| <b>03/09/00</b> | <b>15,3</b>             | <b>10,6</b>             | <b>12,5</b>            | <b>0,6</b>            | <b>6,3</b>            |
| <b>04/09/00</b> | <b>15,3</b>             | <b>10,6</b>             | <b>12,4</b>            | <b>0</b>              | <b>0,0</b>            |
| <b>05/09/00</b> | <b>22,0</b>             | <b>9,8</b>              | <b>14,8</b>            | <b>0</b>              | <b>4,5</b>            |
| 06/09/00        | 20,4                    | 12,1                    | 15,2                   | 0                     | 6,5                   |
| 07/09/00        | 23,1                    | 11,4                    | 16,2                   | 0                     | 10,3                  |
| 08/09/00        | 23,9                    | 10,2                    | 16,5                   | 0                     | 12,8                  |
| 09/09/00        | 25,5                    | 12,9                    | 19,2                   | 0                     | 8,5                   |
| 10/09/00        | 28,6                    | 13,7                    | 21,3                   | 0                     | 9,5                   |
| 11/09/00        | 31,0                    | 17,6                    | 24,2                   | 0                     | 7,3                   |

|                 |             |             |             |             |             |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 12/09/00        | 20,4        | 15,3        | 17,3        | 41          | 19,0        |
| <b>13/09/00</b> | <b>23,1</b> | <b>16,5</b> | <b>18,4</b> | <b>17,2</b> | <b>19,8</b> |
| <b>14/09/00</b> | <b>26,3</b> | <b>16,1</b> | <b>20,4</b> | <b>0,2</b>  | <b>12,5</b> |
| <b>15/09/00</b> | <b>28,2</b> | <b>16,1</b> | <b>20,6</b> | <b>8,4</b>  | <b>14,5</b> |
| <b>16/09/00</b> | <b>19,6</b> | <b>13,7</b> | <b>15,7</b> | <b>0</b>    | <b>2,8</b>  |
| 17/09/00        | 20,8        | 12,9        | 15,7        | 0,4         | 1,8         |
| 18/09/00        | 29,4        | 13,7        | 19,5        | 0           | 10,0        |
| 19/09/00        | 16,5        | 16,5        | 16,5        | 0           | 10,5        |
| 20/09/00        | 31,0        | 15,7        | 22,8        | 0           | 9,8         |
| 21/09/00        | 31,4        | 16,5        | 24,3        | 0           | 7,8         |
| 22/09/00        | 21,6        | 14,5        | 17,8        | 0           | 7,0         |
| 23/09/00        | 30,2        | 14,1        | 20,8        | 0           | 12,5        |
| 24/09/00        | 31,8        | 14,9        | 22,0        | 0,2         | 10,0        |
| 25/09/00        | 15,7        | 10,2        | 12,3        | 0           | 1,3         |
| 26/09/00        | 14,5        | 9,4         | 11,5        | 0           | 3,0         |
| 27/09/00        | 22,4        | 11,0        | 15,7        | 0           | 8,8         |
| 28/09/00        | 27,8        | 12,9        | 18,2        | 0           | 13,3        |
| 29/09/00        | 29,4        | 12,9        | 19,3        | 0           | 12,8        |
| 30/09/00        | 29,4        | 11,0        | 19,3        | 0           | 10,5        |

\* Os períodos em negrito correspondem a recomendação de aplicação de fungicida pelo modelo de previsão (Timmer & Brown, 2000)

**Quadro 28.** Dados climáticos provenientes da estação climática. Fazenda Umuarama, Itapetininga, 2001.

| Data            | Temperatura máxima (°C) | Temperatura mínima (°C) | Temperatura média (°C) | Quantidade chuva (mm) | Molhamento foliar (h) |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 15/07/01        | 24,7                    | 10,2                    | 16,2                   | 0                     | 16,0                  |
| 16/07/01        | 26,7                    | 12,5                    | 18,3                   | 0                     | 14,8                  |
| 17/07/01        | 26,7                    | 12,1                    | 18,6                   | 0                     | 10,8                  |
| 18/07/01        | 28,2                    | 9,4                     | 19,0                   | 0                     | 10,8                  |
| 19/07/01        | 24,7                    | 14,1                    | 18,0                   | 0,6                   | 17,0                  |
| 20/07/01        | 29,8                    | 13,3                    | 22,2                   | 0                     | 6,8                   |
| 21/07/01        | 29,0                    | 14,5                    | 22,2                   | 2                     | 6,8                   |
| 22/07/01        | 17,6                    | 11,4                    | 14,1                   | 2,2                   | 12,3                  |
| 23/07/01        | 15,3                    | 11,0                    | 12,6                   | 0                     | 13,3                  |
| 24/07/01        | 18,0                    | 10,6                    | 13,8                   | 0                     | 16,8                  |
| 25/07/01        | 25,9                    | 11,4                    | 17,4                   | 0,4                   | 14,8                  |
| 26/07/01        | 23,9                    | 13,7                    | 18,0                   | 16,2                  | 15,8                  |
| <b>27/07/01</b> | <b>19,6</b>             | <b>10,6</b>             | <b>14,6</b>            | <b>20,8</b>           | <b>21,5</b>           |
| <b>28/07/01</b> | <b>14,9</b>             | <b>4,7</b>              | <b>8,9</b>             | <b>2,2</b>            | <b>11,5</b>           |
| <b>29/07/01</b> | <b>19,2</b>             | <b>3,1</b>              | <b>10,6</b>            | <b>0</b>              | <b>13,8</b>           |
| <b>30/07/01</b> | <b>25,9</b>             | <b>10,6</b>             | <b>15,4</b>            | <b>0</b>              | <b>15,3</b>           |
| <b>31/07/01</b> | <b>26,3</b>             | <b>12,1</b>             | <b>17,2</b>            | <b>0</b>              | <b>15,3</b>           |
| 01/08/01        | 28,2                    | 11,0                    | 18,7                   | 0                     | 14,3                  |
| 02/08/01        | 27,8                    | 11,0                    | 18,3                   | 0                     | 14,0                  |
| 03/08/01        | 27,8                    | 8,6                     | 17,7                   | 0                     | 13,5                  |
| 04/08/01        | 29,0                    | 10,2                    | 18,5                   | 0,2                   | 14,5                  |
| 05/08/01        | 27,8                    | 8,6                     | 17,2                   | 0                     | 14,8                  |
| 06/08/01        | 28,2                    | 9,8                     | 16,7                   | 0                     | 15,0                  |
| 07/08/01        | 28,2                    | 11,8                    | 18,3                   | 0,2                   | 13,0                  |
| 08/08/01        | 22,7                    | 11,4                    | 15,7                   | 0                     | 15,8                  |
| 09/08/01        | 25,5                    | 9,4                     | 16,2                   | 0,2                   | 14,3                  |
| 10/08/01        | 23,9                    | 11,0                    | 15,9                   | 0                     | 15,3                  |
| 11/08/01        | 23,1                    | 11,8                    | 15,9                   | 0                     | 16,8                  |
| 12/08/01        | 25,1                    | 12,5                    | 17,3                   | 0                     | 14,5                  |
| 13/08/01        | 26,3                    | 11,8                    | 17,1                   | 0                     | 15,5                  |
| 14/08/01        | 25,5                    | 7,4                     | 16,9                   | 0,2                   | 13,5                  |
| 15/08/01        | 25,9                    | 10,2                    | 17,5                   | 0                     | 14,0                  |
| 16/08/01        | 25,9                    | 10,6                    | 17,0                   | 0,2                   | 15,0                  |
| 17/08/01        | 25,5                    | 11,0                    | 17,5                   | 0                     | 13,5                  |
| 18/08/01        | 27,0                    | 8,6                     | 18,2                   | 0                     | 12,5                  |
| 19/08/01        | 28,2                    | 10,6                    | 19,3                   | 0                     | 12,5                  |
| 20/08/01        | 26,7                    | 12,1                    | 18,6                   | 0                     | 15,3                  |
| 21/08/01        | 24,7                    | 13,3                    | 17,6                   | 6,4                   | 16,5                  |
| 22/08/01        | 17,6                    | 11,8                    | 14,0                   | 3,8                   | 10,5                  |
| 23/08/01        | 21,6                    | 11,4                    | 15,4                   | 0,2                   | 14,3                  |
| 24/08/01        | 21,2                    | 13,3                    | 16,6                   | 2,4                   | 13,3                  |
| 25/08/01        | 27,5                    | 12,5                    | 19,2                   | 0,2                   | 10,0                  |

|                 |             |             |             |             |             |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 26/08/01        | 25,1        | 14,1        | 18,8        | 4,2         | 8,3         |
| 27/08/01        | 26,3        | 16,5        | 19,7        | 18,6        | 11,3        |
| <b>28/08/01</b> | <b>24,3</b> | <b>15,7</b> | <b>18,5</b> | <b>15,6</b> | <b>13,5</b> |
| <b>29/08/01</b> | <b>23,5</b> | <b>15,3</b> | <b>18,1</b> | <b>3,4</b>  | <b>14,0</b> |
| <b>30/08/01</b> | <b>29,0</b> | <b>12,9</b> | <b>20,9</b> | <b>0</b>    | <b>8,0</b>  |
| 31/08/01        | 29,8        | 15,7        | 22,6        | 0           | 8,0         |
| 01/09/01        | 30,6        | 15,3        | 22,5        | 0           | 12,0        |
| 02/09/01        | 30,2        | 15,3        | 22,3        | 0           | 11,8        |
| 03/09/01        | 30,6        | 14,5        | 22,0        | 0,2         | 9,3         |
| 04/09/01        | 31,0        | 14,1        | 22,0        | 0           | 11,8        |
| 05/09/01        | 22,7        | 15,3        | 18,3        | 0           | 15,3        |
| 06/09/01        | 22,7        | 15,3        | 18,3        | 0           | 15,5        |
| 07/09/01        | 23,1        | 12,5        | 17,1        | 0           | 13,3        |
| 08/09/01        | 29,0        | 9,4         | 18,2        | 0           | 14,5        |
| 09/09/01        | 28,6        | 14,1        | 19,7        | 0           | 13,3        |
| 10/09/01        | 31,4        | 12,5        | 19,9        | 0           | 15,0        |
| 11/09/01        | 20,8        | 11,4        | 16,2        | 0,4         | 15,8        |
| 12/09/01        | 22,0        | 8,6         | 14,1        | 0,2         | 13,3        |

\* Os períodos em negrito correspondem a recomendação de aplicação de fungicida pelo modelo de previsão (Timmer & Brown, 2000)