

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE ESTRUTURAS REPRODUTIVAS E
EFEITO DO AMBIENTE NOS TIPOS DE SINTOMAS
PRODUZIDOS POR *Guignardia citricarpa* EM *Citrus* spp.**

Márcia de Holanda Nozaki

Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO DE ESTRUTURAS REPRODUTIVAS E
EFEITO DO AMBIENTE NOS TIPOS DE SINTOMAS
PRODUZIDOS POR *Guignardia citricarpa* EM *Citrus* spp.**

Márcia de Holanda Nozaki

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2007

N961p Nozaki, Márcia de Holanda
Produção de estruturas reprodutivas e efeito do ambiente nos tipos de sintomas produzidos por *Guignardia citricarpa* em *Citrus* spp. / Márcia de Holanda Nozaki. -- Jaboticabal, 2007
xviii, 85 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Antonio de Goes
Banca examinadora: Edson Luiz Furtado, Kátia Cristina Kupper, Rita de Cássia Panizzi, Jaime Maia dos Santos
Bibliografia

1. pinta preta. 2. *Phyllosticta citricarpa*. 3. severidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:634.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MÁRCIA DE HOLANDA NOZAKI - nascida em 31 de Outubro de 1978, no Rio de Janeiro - RJ, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR, em Dezembro de 2000. Foi bolsista de Iniciação Científica pelo Programa PET/CAPEs (Programa Especial de Treinamento) e diretora cultural do Centro Acadêmico José Lutzemberger (CAJOL/UEM). Em 1999 recebeu o prêmio “Menção Honrosa Santa Catarina” pelo trabalho intitulado “Produção de Óleos Essenciais no Estado do Paraná: Rendimento e Viabilidade”. Em 2001, ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, no Departamento de Fitossanidade da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como bolsista CAPES. Foi membro da Associação de Pós-graduandos da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, na gestão 2001-2002. Sócia-estudantil da Sociedade Brasileira de Fitopatologia desde 1997. Concluiu mestrado na Unesp de Jaboticabal, no curso de Agronomia (Produção Vegetal) com a dissertação intitulada “Caracterização de *Diaporthe citri*, agente causal da melanose”.

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário"

(Albert Einstein)

**"Aquele que luta contra nós fortalece nossos nervos e aprimora nossas
qualidades. Nosso antagonista trabalha por nós"**

(Edmund Burke)

"Pedras no caminho? Guardo todas. No futuro construirei um castelo..."

(Fernando Pessoa)

"O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra"

(Aristóteles)

**"Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais
vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda.**

Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna."

Baltasar Gracián

*Dedico e ofereço essa tese
e mais essa etapa vencida...*

*Aos meus queridos pais Jorge Nozaki (in memorian) e Maria Horalgisa
que sempre acreditaram em mim e, mesmo distantes compartilharam
sua paciência, incentivo, coragem, exemplo de vida e amor incondicional!*

*Ao meu pai, um grande homem e pesquisador,
que perdi durante o curso, mas pelo qual serei eternamente
grata pelo exemplo que deixou e a minha mãe pelo exemplo de força.*

Obrigada SEMPRE!

Ao meu irmão Júlio César, pelo apoio.

*Ao meu marido Sérgio Ricardo pelo amor, compreensão,
apoio em todos os momentos, de alegria ou de ausência.*

Sem você não teria chego até aqui.

*Obrigada por me fazer feliz e fazer minha vida melhor
a cada dia. Você, sem dúvida, foi o melhor presente
que a vida me ofereceu.*

*A todos os amigos e familiares
que direta ou indiretamente sempre
estiveram ao meu lado me incentivando.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV), pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Prof. Dr. Antonio de Goes, pela amizade e orientação.

Aos meus pais, Jorge (*in memoriam*) e Maria Horalgisa, pela formação pessoal e profissional que deram, essenciais para que sou hoje, por todo sacrifício e renúncia, por acreditarem em mim e me apoiarem acima de tudo e por serem exemplos de vida.

Ao meu marido, Sérgio Ricardo, meu companheiro sempre, pelo amor, compreensão, carinho, incentivo, confiança, apoio e ajuda direta e indireta, em todos os momentos da minha vida e deste trabalho. Por estar presente nos momentos de alegria ou de tristeza, tornando meus dias mais felizes e especiais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Grupo JF Citrus, na pessoa de Fabiano e José Carlos, técnicos responsáveis, pelo auxílio na condução dos experimentos e pela concessão das instalações e materiais para realização do experimento.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia, Vanessa (Rapidex), Fernanda (Caramuja), Andressa (Carangueja), Mario (Tokum), Luis Henrique (Taturana), Cristiane, Eliana, Patrícia, Rachel, dentre outros inúmeros sempre presentes, pela colaboração na execução dos trabalhos, companheirismo, amizade e bons momentos compartilhados. Em especial ao Davi (Jiló), Renato, Luis, Gabriella, Taís, pelo auxílio na implantação e avaliação dos experimentos.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, em especial à Professora Dra. Rita de Cássia Panizzi e ao Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos pelo apoio e amizade sempre presentes.

Aos Professores Dr. Euclides Braga Malheiros e Dr. José Carlos Barbosa, do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, pelas sugestões e auxílio nas análises estatísticas.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e colaborações no trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, Lúcia Rita, Rosângela, Luiz Carlos, Vanderlei e Isabel, pelo carinho, auxílio, atenção e disposição.

Ao amigo Wilson, da UAD, pela amizade e auxílio sempre prestativo.

Aos colegas das Repúblicas Tocaia, Kambuká e Tia Méri pela convivência e amizade construída.

Aos meus amigos Renata, Lucas, Cláudio, Bruno e a todas as inúmeras pessoas impossíveis de enumerar que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que foram obstáculos em nossas existências, por proporcionarem a oportunidade de lutarmos cada vez mais por nossos objetivos, fortalecendo nosso espírito.

A Deus por me proteger, iluminar meus caminhos sempre e ter colocado essas pessoas em meu caminho...

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
I INTRODUÇÃO	1
II REVISÃO DE LITERATURA	3
III MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Obtenção do inóculo.....	12
3.1.1. Obtenção de conídios.....	12
3.1.1.1. Obtenção de conídios através de culturas-estoque de <i>Phyllosticta citricarpa</i>	12
3.1.2. Obtenção de pseudotécios e ascósporos.....	13
3.1.2.1. Obtenção de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas sintomáticas de laranjeira ‘Pêra’ mantidas em caixas Gerbox® e em bandejas plásticas.....	13
Caixas Gerbox®.....	13
Bandejas plásticas.....	14
3.1.2.2. Obtenção de estruturas reprodutivas de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas assintomáticas de laranjeiras ‘Pêra’ e ‘Valência’ inoculadas com discos de colônia.....	16
3.1.2.3. Obtenção de ascósporos de <i>Guignardia citricarpa</i> em discos de folha de laranjeira ‘Pêra’ e estudo da influência de métodos de esterilização de discos foliares na produção de ascósporos.....	17
3.1.2.4. Obtenção de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas de laranjeira ‘Pêra’ destacadas e submetidas a diferentes tratamentos térmicos	19
3.2. Ensaio de germinação <i>in vitro</i> de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> .	21
3.2.1. Avaliação de germinação de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em meio de cultura e folhas cítricas sob diferentes períodos de incubação.....	21
3.2.2. Efeito de tratamentos com ou sem centrifugação, com ou sem substâncias indutoras de germinação, na porcentagem de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> germinados.....	22
3.2.3. Avaliação do efeito da adição de suco de laranja a suspensão de conídios na germinação de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i>	24
Em meio de cultura.....	25
Em folha.....	26
3.3. Ensaio de inoculação de plantas de laranjeira ‘Pêra’ e tanger ‘Murcott’ em casa de vegetação e exposição a condições de ambiente controlado e campo.....	26

3.4. Avaliação a campo do efeito da presença de galhos secos na expressão de sintomas da falsa melanose em plantas cítricas.....	33
3.5. Avaliação a campo do efeito da presença do ácaro da falsa ferrugem na expressão de sintomas de mancha trincada em frutos cítricos..	37
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Obtenção do inóculo.....	41
4.1.1. Obtenção de conídios.....	41
4.1.2. Obtenção de pseudotécios e ascósporos.....	41
4.1.2.1. Obtenção de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas sintomáticas de laranjeira 'Pêra' mantidas em caixas Gerbox® e bandejas plásticas.....	41
Caixas Gerbox®.....	41
Bandejas plásticas.....	43
4.1.2.2. Obtenção de estruturas reprodutivas de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas assintomáticas de laranjeiras 'Pêra' e 'Valência' inoculadas com discos de colônia.....	45
4.1.2.3. Obtenção de ascósporos de <i>Guignardia citricarpa</i> em discos de folha de laranjeira 'Pêra' e estudo da influência de métodos de esterilização de discos foliares na produção de ascósporos.....	48
4.1.2.4. Obtenção de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas de laranjeira 'Pêra' destacadas e submetidas a diferentes tratamentos térmicos.....	52
4.2. Ensaio de germinação <i>in vitro</i> de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i>	55
4.2.1. Avaliação de germinação de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em meio de cultura e folhas cítricas sob diferentes períodos de incubação....	55
Em meio de cultura.....	55
Em folhas.....	57
4.2.2. Efeito de tratamentos com ou sem centrifugação, com ou sem substâncias indutoras de germinação, na porcentagem de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> germinados.....	62
4.2.3. Adição de suco de laranja à suspensão de conídios e o efeito na germinação de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i>	65
Em meio de cultura.....	65
Em folhas.....	66
4.3. Ensaio de inoculação de plantas de laranjeira 'Pêra' e tangor 'Murcott' em casa de vegetação e exposição a condições de ambiente controlado e campo.....	68
4.4. Avaliação a campo do efeito da presença de galhos secos na expressão de sintomas de falsa melanose em frutos cítricos.....	71

4.5. Avaliação a campo do efeito da presença do ácaro da falsa ferrugem na expressão de sintomas do tipo mancha trincada em frutos cítricos.....	76
V CONCLUSÕES	79
VI REFERÊNCIAS	80

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas de laranjeira 'Pêra' mantidas em caixas Gerbox® sob diferentes fotoperíodos e temperaturas.....	42
Quadro 2. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas de laranjeira 'Pêra' mantidas em bandejas plásticas sob diferentes fotoperíodos.....	44
Quadro 3. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> produzidos em folhas de laranjeira 'Pêra' submetidas a diferentes períodos de esterilização.....	45
Quadro 4. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> produzidos em folhas de laranjeira 'Pêra' submetidas a diferentes tratamentos térmicos (temperaturas variadas) por 1 minuto.....	53
Quadro 5. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> produzidos em folhas de laranjeira 'Pêra' submetidas a diferentes tratamentos térmicos (temperaturas variadas) por 5 minutos.....	53
Quadro 6. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> germinados em lâminas contendo diferentes meios de cultura, sob diferentes fotoperíodos.....	56
Quadro 7. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes à germinação de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> , em diferentes concentrações, em folhas de laranjeira 'Valência' em diferentes estádios de desenvolvimento foliar.....	59
Quadro 8. Efeito de tratamentos constituídos com ou sem centrifugação, e com ou sem substâncias indutoras de germinação, na porcentagem de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> germinados após 4 a 40 horas de incubação em estufas para B.O.D. a 25°C	

	e fotoperíodo alternado de 12/12 horas.....	63
Quadro 9.	Equações de regressão do efeito de tratamentos constituídos com ou sem centrifugação e, com ou sem substâncias indutoras de germinação, na porcentagem de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> germinados após 4 a 40 horas de incubação em estufas para B.O.D. a 25°C e fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro.....	65
Quadro 10.	Equações de regressão do efeito de diferentes tratamentos físicos indutores de germinação na suspensão conidial sobre a germinação de conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em folhas de laranja 'Pêra' mantidas a 25°C e sob condições de fotoperíodo alternado (12 horas luz/12 horas escuro).....	67
Quadro 11.	Número de frutos com sintomas de <i>Guignardia citricarpa</i> obtidos mediante diferentes métodos de inoculação, após incubação em ambiente controlado com diferentes condições de temperatura e umidade relativa. Média de 16 frutos por tratamento.....	70
Quadro 12.	Número total de frutos colhidos e número de frutos apresentando sintomas de falsa melanose, com suas respectivas porcentagens de incidência, em área podada e não podada de pomar de laranja 'Natal'. Tambaú/SP, agosto a dezembro, 2006.....	72
Quadro 13.	Influência da poda nos níveis de severidade de sintomas do tipo falsa melanose causados por <i>Guignardia citricarpa</i> em frutos de laranjeiras 'Natal'. Número médio de 50 frutos por planta (50 plantas avaliadas/tratamento). Tambaú/SP, janeiro a dezembro, 2006.....	73
Quadro 14.	Índice de doença em frutos de laranja 'Natal' apresentando sintomas de falsa melanose, causados por <i>Guignardia citricarpa</i> , em plantas podadas e não podadas. Tambaú/SP, agosto a dezembro, 2006.....	74
Quadro 15.	Influência da remoção de galhos secos mediante a poda, no número médio de frutos caídos sob a copa de plantas de laranja 'Natal'. Tambaú/SP, janeiro a dezembro, 2006.....	75
Quadro 16.	Efeito das combinações fungicidas e acaricidas, isoladamente ou em combinação, na severidade de sintomas oriundos de ataques de <i>Phyllocoptruta oleivora</i> (Índice de danos) e <i>Guignardia citricarpa</i> (Índice de doença), em frutos de laranja 'Natal'. Tambaú/SP, 2006.....	76
Quadro 17.	Efeito das combinações fungicidas e acaricidas, isoladamente ou em combinação, na severidade de sintomas oriundos de ataques de <i>Phyllocoptruta oleivora</i> (Índice de danos) e <i>Guignardia citricarpa</i> (Índice de doença), em frutos de laranja 'Natal'. Tambaú/SP, 2006.....	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sintomas de mancha preta dos citros em frutos: A – Mancha dura; B – Mancha sardenta; C – Mancha virulenta; D – Falsa melanose; E – Mancha trincada (Fundecitrus, 2005).....	7
Figura 2. Isolado de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em (A) meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), com 30 dias de crescimento e (B) suspensão de conídios observados em microscópio fotônico com aumento de 40 vezes (B).....	13
Figura 3. Caixas gerbox (A) Vista superior, contendo folhas cítricas sintomáticas, previamente desinfestadas, dispostas interiormente em placas de Petri, isoladas por camadas de papel filtro da perlita, e (B) mantidas a 25°C, sob fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro.....	14
Figura 4. A – Vista superior de folhas sintomáticas de laranjeira ‘Valência’ mantidas em bandeja plástica (335x250x63 mm); B – Vista lateral de bandeja contendo areia esterilizada e sob umidade constante, a 25°C e alternância de luz e escuro.....	15
Figura 5. Folhas cítricas previamente desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 2% e água e, submetidas a autoclavagem por 1 hora, depositadas no interior de placas de plástico de 150mm, mantidas a 25°C, sob fotoperíodo alternado de 12h luz/12 h escuro, visando a produção de pseudotécios.....	17
Figura 6. Discos foliares de laranjeira ‘Pêra’ autoclavados. (A) - dispostos no interior de placas de Petri contendo meio ágar-água, mantidas a 25°C, sob fotoperíodo alternado de 12h luz/12 h escuro, visando a produção de pseudotécios, 49 dias após repicagem. (B) – presença de frutificações do fungo visualizados em estereoscópio, com 3x3,3x2 de aumento.....	18
Figura 7. Vista geral da disposição das redes contendo folhas de laranjeira ‘Pêra’ previamente submetidas a diferentes tratamentos térmicos, seguido da sua exposição a ambiente natural.....	20
Figura 8. Caixa Gerbox® contendo em seu interior folhas de laranjeira ‘Valência’, inoculadas com conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> , os quais, após 8 horas de incubação foram submetidos à suspensão da sua germinação mediante a deposição de esmalte e acetona, visando posteriormente a avaliação da germinação dos conídios. A – Vista superior das folhas contidas nas placas. B- Detalhe de folha inoculada contendo os pontos demarcados, onde foi realizada a deposição de suspensão de conídios.....	22
Figura 9. Vista geral de placas de vidro de 135mm com lâminas contendo meio ágar-água inoculadas com suspensão de <i>Phyllosticta</i>	

	<i>citricarpa</i> na concentração de 1×10^5 conídios/mL, mantidas a 25°C e fotoperíodo alternado de 12h luz/12 h escuro.....	23
Figura 10.	A - Vista geral de plantas de laranjeira 'Pêra-Rio' contendo frutos verdes inoculados, mantidas no interior da câmara de crescimento e, B - aos 15 dias após a inoculação dos frutos em fases iniciais de maturação.....	27
Figura 11.	A - Detalhe da disposição aleatória dos discos de folha de papel filtro embebidos em suspensão conidial de <i>Phyllosticta citricarpa</i> , sobre fruto verde de laranjeira 'Pêra-Rio' e B - Detalhe do revestimento dos frutos inoculados, mediante o uso de saco de papel cristal 15x15cm.....	29
Figura 12.	A - Inoculação dos frutos de laranjeira 'Pêra' através de pulverizador manual empregando suspensão conidial contendo 1×10^5 conídios/mL de <i>Phyllosticta citricarpa</i> ; B – Vista geral das plantas contendo frutos inoculados, em casa de vegetação, recobertos com sacos de papel cristal 15x15cm.....	31
Figura 13.	Fruto de laranjeira 'Pêra-Rio' (A) inoculado com discos foliares contendo estruturas reprodutivas de <i>Phyllosticta citricarpa</i> mantidos em meio de cultura com suco de laranja; (B) detalhe da cobertura do fruto inoculado com gaze na forma de rede após a inoculação; (C) fruto inoculado, recoberto com saco de papel cristal 15x15cm após a colocação de gaze formando uma rede; e, (D) vista geral dos frutos ensacados após inoculação	32
Figura 14.	Sintomas do tipo falsa melanose em frutos de laranjas 'Natal'. (A) Vista superior e (B) Vista lateral.....	33
Figura 15.	Vista geral da área experimental com plantas de laranjeiras 'Natal' podadas.....	34
Figura 16.	Vista geral de plantas de laranjeira 'Natal' apresentando: (A) galhos secos, ainda não podados (B); galhos com sintomas de rubelose, podados e exibindo a presença de frutos removidos pela poda e; (C) aspecto da planta após a poda.....	34
Figura 17.	Escala diagramática para avaliação de severidade (%) de mancha preta dos citros (<i>Guignardia citricarpa</i>). A parte superior corresponde ao sintoma tipo mancha preta e a parte inferior aos sintomas do tipo falsa melanose (Spósito et al., 2004).....	36
Figura 18.	Fruto de laranjeira 'Folha Murcha' apresentando sintoma característico de mancha trincada. A – Vista superior e, B – detalhe parcial da mancha exibindo trincas e ausência de picnídios.....	37
Figura 19.	Escala diagramática de severidade de mancha preta em citros (% de área lesionada), utilizada para avaliação dos sintomas do tipo mancha dura, porém com ajustes para avaliação dos sintomas de mancha trincada. Fonte: Fagan & Goes (2000).....	40

Figura 20. Escala diagramática para avaliação da severidade do ácaro da falsa ferrugem em frutos cítricos, conforme Oliveira et al. (1982)..	40
Figura 21. Curva de regressão da produção de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas sintomáticas de laranjeira 'Pêra', mantidas em caixas Gerbox [®] , a 20°C e 25°C, sob fotoperíodo alternado de 12 horas luz/12 horas escuro, após 30, 60, 90 e 120 dias de incubação.....	42
Figura 22. Curva de regressão da produção de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> em folhas sintomáticas de laranjeira 'Pêra', mantidas em caixas Gerbox [®] , a 20° e 25°C, sob fotoperíodo de luz contínua, após 30, 60, 90 e 120 dias de incubação.....	43
Figura 23. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> produzidos em folhas sintomáticas de laranjeira 'Pêra' mantidas em bandejas plásticas sob condições de temperatura ambiente, fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro) e alternância de secamento/molhamento, após 15, 30, 45 e 60 dias de incubação.....	44
Figura 24. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> presentes em folhas assintomáticas de laranjeira 'Pêra' submetidas a 1 hora de esterilização por autoclavagem, após 0, 30, 45 e 60 dias de inoculação, mantidos à temperatura de 25°C, alternância de luz e de períodos de molhamento/secamento ao ambiente natural por 15 dias (luz solar).....	46
Figura 25. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> presentes em folhas assintomáticas de laranjeira 'Valência' submetidas a 1 hora de esterilização por autoclavagem, após 0, 30, 45 e 60 dias de inoculação, mantidos à temperatura de 25°C, alternância de luz e de períodos de molhamento/secamento ao ambiente natural por 15 dias (luz solar).....	46
Figura 26. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> presentes em folhas assintomáticas de laranjeira 'Pêra' submetidas a 90 minutos de esterilização por autoclavagem, após 0, 30, 45 e 60 dias de inoculação, mantidos à temperatura de 25°C, alternância de luz e de períodos de molhamento/secamento ao ambiente natural por 15 dias (luz solar).....	47
Figura 27. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de <i>Guignardia citricarpa</i> presentes em folhas assintomáticas de laranjeira 'Valência' submetidas a 90 minutos de esterilização por autoclavagem, após 0, 30, 45 e 60 dias de inoculação, mantidos a temperatura de 25°C, alternância de luz e de períodos de molhamento/secamento ao ambiente natural por 15 dias (luz solar).....	47

- Figura 28.** Curva de regressão e equação do número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* presentes em discos foliares de laranjeira 'Pêra' depositados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA) e mantidos em estufas para B.O.D. a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro). Dados transformados em $\log(x+1)$ 48
- Figura 29.** Curva de regressão e equação do número médio de ascósporos de *Guignardia citricarpa* produzidos em discos foliares de laranjeira 'Pêra' depositados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA), incubados em estufas para B.O.D. a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sob fotoperíodo alternado (12 horas luz/12 horas escuro). Dados transformados em $\log(x+1)$ 49
- Figura 30.** Ascósporos de *Guignardia citricarpa* produzidos em discos foliares de laranjeira 'Pêra' mantidos em meio de cultura ágar-água (AA) e observados em lâminas de vidro ao microscópio fotônico, aumento de 40x, após 63 dias de incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo alternado (12 horas luz/12 horas escuro)..... 50
- Figura 31.** Curva de regressão e equação do número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em discos foliares de laranjeira 'Pêra' submetidos a diferentes tratamentos de esterilização (autoclavagem e sem autoclavagem), depositados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA) com discos de colônia fúngica e incubados em estufas para B.O.D. a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro) durante diferentes períodos de incubação..... 51
- Figura 32.** Número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* em folhas de laranjeira 'Pêra' submetidas a diferentes tratamentos térmicos (temperaturas variadas) por 1 minuto após 0, 30, 45 e 60 dias de incubação..... 54
- Figura 33.** Número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* em folhas de laranjeira 'Pêra' submetidas a diferentes tratamentos térmicos (temperaturas variadas) por 5 minutos aos 0, 30, 45 e 60 dias de incubação..... 54
- Figura 34.** Curva de regressão da germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em meio de cultura ágar-água (AA), a 25°C , sob duas condições de fotoperíodo (alternado 12h luz/12h escuro e luz contínua). Dados transformados em $\log(x+1)$ 56
- Figura 35.** Curva de regressão da germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em meio de cultura ágar-dextrose (AD) mantidos a 25°C sob duas condições de fotoperíodo (alternado 12h luz/12h escuro e luz contínua). Dados transformados em $\log(x+1)$ 57

- Figura 36.** Efeito das diferentes concentrações da suspensão de conídios (10^3 , 10^4 e 10^5 conídios/mL) de *Phyllosticta citricarpa* na sua germinação em folhas recém-emitidas de laranjeira 'Valência', mantidas a 25°C e sob fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro), em diferentes tempos de avaliação..... 60
- Figura 37.** Efeito das diferentes concentrações da suspensão de conídios (10^3 , 10^4 e 10^5 conídios/mL) de *Phyllosticta citricarpa* na sua germinação em folhas jovens de laranjeira 'Valência', mantidas a 25°C, e sob fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro) em diferentes tempos de avaliação..... 60
- Figura 38.** Efeito das diferentes concentrações da suspensão de conídios (10^3 , 10^4 e 10^5 conídios/mL) de *Phyllosticta citricarpa* na sua germinação em folhas fisiologicamente maduras de laranjeira 'Valência', mantidas a 25°C e sob fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro) em diferentes tempos de avaliação..... 61
- Figura 39.** A - Conídios correspondentes a suspensão (1×10^5 conídios/mL) conidial de *Phyllosticta citricarpa* observados após 8 horas da inoculação em folha jovem de laranjeira 'Valência'. B - Conídio germinado após 72 horas da inoculação de folhas jovens, observado ao microscópio fotônico, com aumento de 100x..... 61
- Figura 40.** Efeito de diferentes tratamentos na germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa*, onde: 1) Testemunha; 2) Suspensão de conídios centrifugada com água esterilizada; 3) Suspensão de conídios lavada com Tween 20, centrifugada com solução de sacarose e ao final adicionado ácido cítrico; 4) Suspensão de conídios lavada com Tween 20. A diferença mínima significativa, calculada pelo teste de Tukey ($P \geq 5\%$), está representada pelas barras verticais no Tratamento 3..... 63
- Figura 41.** A - Conídios de *Phyllosticta citricarpa* não germinados. B - Conídios de *Phyllosticta citricarpa* germinado após 40 horas de incubação, no tratamento T3 (suspensão de conídios lavada com Tween 20, centrifugação com solução de sacarose e adição de ácido cítrico), observados ao microscópio fotônico em aumento de 40x..... 64
- Figura 42.** Efeito de diferentes tratamentos na germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa*, onde: 1) Testemunha; 2) Suspensão de conídios centrifugada com água esterilizada; 3) Suspensão de conídios lavada com Tween 20 e com adição suco de laranja; 4) adição de Tween 20 (0,02%) à suspensão conidial com agitação..... 66
- Figura 43.** Efeito de diferentes tratamentos físicos na germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em folhas de laranjeira 'Pêra', onde: 1) Testemunha; 2) Suspensão de conídios centrifugada com água esterilizada; e 3) Suspensão de

conídios lavada com Tween 20 com adição suco de laranja, mantidas em placas de Petri armazenadas em estufas para B.O.D.s a 25°C e fotoperíodo alternado (12h luz/12 escuro).....	67
Figura 44. Fruto de laranjeira 'Pêra' apresentando marca da deposição do disco foliar, sem ou previamente colonizado por <i>Phyllosticta citricarpa</i> . (A) Testemunha; (B) Deposição do disco foliar colonizado, 45 dias após inoculação e; (C) Sintoma presente no fruto 75 dias após a inoculação mediante a deposição do disco foliar colonizado.....	69

PRODUÇÃO DE ESTRUTURAS REPRODUTIVAS E EFEITO DO AMBIENTE NOS TIPOS DE SINTOMAS PRODUZIDOS POR *Guignardia citricarpa* EM *Citrus* spp.

RESUMO - A mancha preta dos citros (MPC) doença causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely [anamorfo: *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.)Van der Aa], deprecia comercialmente os frutos, causando sua queda prematura e elevando o custo de produção. Até o presente momento, informações acerca da etiologia da doença são escassas. Portanto, o presente trabalho teve como objetivos: (i) criar metodologias alternativas de obtenção da estrutura reprodutiva do fungo em laboratório; (ii) observar a taxa de germinação *in vitro* de conídios do fungo; (iii) estudar a influência da poda de plantas cítricas no campo sobre a expressão de sintomas de falsa melanose; (iv) e, a relação entre a presença de sintomas de ácaro da falsa ferrugem e sintomas do tipo mancha trincada em frutos cítricos. De maneira geral, tanto pseudotécios quanto ascósporos foram obtidos em maior número quando da utilização da metodologia de discos foliares autoclavados, bem como a maior expressão dos sintomas mediante inoculações através desta metodologia. Com os resultados obtidos, pode-se afirmar que através da realização de práticas culturais como a poda dos ramos secos, bem como o controle do ácaro da falsa ferrugem, o progresso da MPC no campo é reduzido.

Palavras-chave: controle, incidência, pinta preta, *Phyllosticta citricarpa*, severidade

**REPRODUCTIVE STRUCTURES PRODUCTION AND ENVIRONMENTAL EFFECT
ON THE PRODUCTION OF SYMPTOMS PRODUCED BY *Guignardia citricarpa* ON
Citrus spp.**

SUMMARY – Citrus black spot (CBS) disease caused by the fungus *Guignardia citricarpa* Kiely [anamorph: *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.)Van der Aa], depreciates the fruit commercially, causing its premature fall and elevating production cost. Until the present moment, there is a lack of informations about the etiology of the disease. Therefore, the aim of the present work was: (i) create alternative methodologies to obtain reproductive structures on laboratory; (ii) observe the *in vitro* conidia germination rate; (iii) study the influence of the harvest of citric plants on the expression of false melanose symptoms; (iv) and the relation between the expression of symptoms of citrus rust mite on the presence of cracked spot symptoms. Both pseudothecia and ascospores were obtained in larger rate when using autoclavated leave discs, and also the larger expression of symptoms on inoculations made by this method. By the results obtained, it can be affirmed that the harvest of dead twigs, and the control of the citrus rust mite, the progress of CBS on field is reduced.

keywords: control, incidence, citrus black spot, *Phyllosticta citricarpa*, severity

I INTRODUÇÃO

Desde a década de 90, o Brasil é tido como maior produtor mundial e exportador de suco de laranja, com uma produção média de 18 milhões de toneladas, em uma área colhida de 818 mil hectares, respondendo por um terço da produção de laranja e 47% do suco fabricado mundialmente. Da produção brasileira de fruta, 71% destina-se ao processamento industrial, apenas 0,6% à exportação *in natura* e 28,4% para o consumo interno (Spósito & Bassanezi, 2002; FNP Consultoria & Agroinformativos, 2006). Os Estados Unidos aparecem como segundo maior produtor, seguido do México, China e Espanha. Os maiores exportadores mundiais de frutas frescas são os Estados Unidos e a Espanha, correspondendo ao equivalente de 18 e 38%, respectivamente (Boteon, 2006).

Segundo a FNP Consultoria & Comércio (2006), o Estado de São Paulo é responsável por aproximadamente 80% da produção brasileira de frutas, com produção média de 314 milhões de caixas no ano de 2006. Devido à composição das variedades de laranja, a colheita se dá durante todo o ano. Porém, apenas algumas variedades são próprias para a produção de suco, como por exemplo, a laranjeira 'Pêra', representando 38% do total de árvores no parque citrícola mineiro e paulista (Boteon, 2006).

A tecnificação da cultura ao longo do tempo fez com que as plantas fossem multiplicadas por enxertia, trazendo vantagens como precocidade e uniformidade dos pomares, diminuindo, porém, a variabilidade entre as plantas, tornando-a alvo de inúmeras pragas e doenças. Com isso, os custos com produtos fitossanitários e fertilizantes ultrapassam 60% do custo de produção. Se medidas de controle não forem adotadas, a qualidade da produção de frutos cai devido aos danos resultantes de doença e pragas, tornando o pomar improdutivo ou levando-o à sua erradicação (Boteon, 2006).

A mancha preta dos citros (MPC), doença causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, cuja forma imperfeita corresponde a *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der Aa (Sutton & Waterston, 1966), deprecia os frutos comercialmente e pode provocar a sua queda precoce (Calavan, 1960; Klotz, 1978). Devido ao longo período de

suscetibilidade dos frutos, várias pulverizações com fungicidas protetores ou sistêmicos, isolados ou combinados, são necessárias, elevando o custo de produção. O controle realizado no Brasil é baseado em informações geradas por outros países, principalmente na África do Sul, onde a doença é relevante (Goes, 2002), embora na última década tenham sido realizados inúmeros trabalhos experimentais, cujos resultados tem contribuído sobremaneira ao controle do patógeno.

A MPC é responsável por elevados prejuízos na cultura, atingindo as variedades cítricas mais importantes em diferentes continentes como África, Ásia, Oceania e América do Sul. Entretanto, o primeiro relato da doença no mundo ocorreu na Austrália em 1895 (Kiely, 1948; Sutton & Waterston, 1966). Para o mercado de frutas frescas, os com sintomas tem o seu valor comercial depreciado, porém podem ser utilizados para o processamento de sucos (Kotzé, 1988; Goes, 2002).

A doença foi constatada pela primeira vez em pomares paulistas em 1992. Entretanto em 1937, já havia relatos de sintomas da doença, observados em frutos de uma feira livre na cidade de Piracicaba, no estado de São Paulo (Averna-Saccá, 1940). Nesse Estado, até por volta de 1997, a doença encontrava-se presente em cerca de 44 municípios (Fundecitrus, 1998). Atualmente, entretanto, estima-se que a doença esteja presente em praticamente todos os municípios produtores de citros (Goes et al., 2000).

Não obstante a importância da doença, ressurte-se, ainda, de informações básicas, incluindo estudos relacionados aos aspectos etiológicos, notadamente quanto à relação ambiente *versus* expressão de sintomas. Certamente o conhecimento de tais informações poderá contribuir à melhoria de controle do patógeno.

Os objetivos do presente trabalho foram: (i) avaliar em condições laboratoriais diferentes metodologias de obtenção de estruturas reprodutivas de *G. citricarpa*; (ii) observar a taxa de germinação *in vitro* de conídios do fungo; (iii) estudar a influência da presença de ramos e galhos secos na expressão dos sintomas e; (iv) avaliar a influência da relação entre sintomas resultantes de ataques do ácaro da falsa ferrugem, causados por *Phyllocoptruta oleivora*, e presença de sintomas do tipo mancha trincada, conseqüentes de infecções causadas por *G. citricarpa*.

II REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com uma área cultivada de 820 mil hectares, 77% dos quais na região Sudeste. A laranja representa 49% de toda a produção brasileira de frutas. Cerca de 80% dessa produção é destinada à industrialização, cujo suco produzido é exportado para países como Rússia, Bélgica, Países Baixos, Estados Unidos da América e Japão (Abecitrus, 2006).

O maior produtor de citros do Brasil, o Estado de São Paulo, possui cerca de 760 mil hectares (Agrianual, 2000), distribuídos em 330 municípios e em cerca de 29.000 propriedades. Cerca de 80% dessa produção é destinada à industrialização, cujo suco produzido é exportado para vários países. Além disso, o setor citrícola é responsável por cerca de 400 mil empregos, diretos e indiretos, gerando uma renda e receita superior a cinco bilhões de dólares por ano (Agrianual, 2000; Bessalho-Filho, 2002). Na safra de 2005-2006, foram produzidas aproximadamente 352 milhões de caixas de laranja no Estado de São Paulo (Abecitrus, 2006).

Não obstante a pujança da indústria citrícola no Brasil, particularmente para o Estado de São Paulo, a cultura do citros é afetada por grande número de patógenos, destacando-se o fungo *Guignardia citricarpa*, responsável pela mancha preta ou pinta preta dos frutos cítricos. A fase anamórfica deste patógeno corresponde a *Phyllosticta citricarpa* McAlp. Van Der Aa., embora conste na literatura referência quanto a *Phoma citricarpa* e *Phyllostictina citricarpa* (Goes & Kupper, 2002).

A doença afeta folhas, ramos e, principalmente frutos, os quais, quando severamente afetados, ficam depreciados ou impróprios para o mercado de fruta fresca. As perdas provocadas podem ser muito severas, principalmente em limões e laranjas doces de maturação tardia. Em ataques severos, os frutos podem cair prematuramente. A pinta preta já foi relatada em limões, laranjas doces, mexericas do 'Rio' e tangor 'Murcott', nos Estados do Rio de Janeiro. No Rio Grande do Sul, a ocorrência desta doença foi descrita inicialmente na tangerina Montenegrina', em meados da década de 1980. No estado de São Paulo, embora exista relato da sua ocorrência anteriormente

(Averna-Saccá, 1940), os maiores prejuízos foram constatados a partir do início da década de 1990, notadamente a partir de 1994.

Segundo McOnie (1964), as espécies cítricas mais suscetíveis correspondem aos limoeiros, laranjeiras doces, pomeleiros e tangerineiras. No caso do Brasil, e também em vários outros países, os maiores prejuízos têm sido verificados em frutos de laranjeiras de maturação tardia, como 'Valência' e 'Natal'.

Nos frutos, as lesões restringem-se à casca, prejudicando, dessa forma, sua aparência, inviabilizando a sua comercialização para o mercado de frutas frescas (Mauch-Mani & Metraux, 1998).

O período de suscetibilidade dos frutos corresponde desde a fase de queda das pétalas, até cerca de 20-24 semanas após (Klotz, 1978; Baldassari, 2001), sendo que, após esta fase, estes tornam-se resistentes (Kellerman, 1977).

Segundo Kotzé (1981), um aspecto importante a ser destacado refere-se ao longo período de incubação apresentado pelo fungo. Na presença de umidade, o fungo emite um "peg" de infecção, o qual penetra na cutícula e se expande para dentro do tecido, na forma de uma massa de micélio, permanecendo entre a cutícula e a epiderme. Essa se constitui na chamada infecção quiescente, que, posteriormente, dará origem às lesões típicas da doença. Os mecanismos envolvidos no processo de formação destas infecções não são conhecidos. Porém, sabe-se que sintomas em níveis mais severos normalmente estão associados à elevação de temperatura por ocasião da maturação dos frutos, maior incidência de raios solares nos frutos mais expostos, estresse hídrico e debilidade das plantas resultante de vários fatores, como por exemplo, doenças e desequilíbrio nutricional. As plantas mais velhas e estressadas são geralmente as mais afetadas (Feichtenberger et al., 1997).

A mancha preta é considerada uma doença quarentenária A1 para os países da União Européia e Estados Unidos, limitando sobremaneira a possibilidade de exportação para os mesmos.

O atual nível de incidência e severidade, demonstrada pela doença nos pomares cítricos do Estado de São Paulo, demonstra o seu nível de gravidade e as boas condições de adaptação encontradas pelo patógeno, nas condições bio-ecológicas

existentes nos pomares citrícolas deste Estado. Dessa forma, as medidas de controle adotadas apenas têm contribuído para minimizar as perdas potenciais.

Sintomas

Feichtenberger et al. (1997) relataram que os sintomas em folhas, ramos e frutos são sempre mais freqüentes nas faces das plantas mais expostas aos raios solares.

Segundo Herbert (1989), quatro tipos de sintomas podem ocorrer em frutos: mancha dura: sintoma mais comum e típico da doença. Em geral, aparece quando os frutos iniciam a maturação. Em frutos verdes, um halo amarelado aparece circundando as lesões, enquanto que no caso de frutos maduros ocorre o contrário, sendo produzido um halo verde ao redor das lesões, que apresentam o centro deprimido de cor marrom-claro ou cinza-escuro e os bordos salientes, de coloração marrom-escuro. No interior dessas lesões aparecem pequenas pontuações negras, que são os picnídios do fungo; manchas sardentas: aparecem depois que os frutos já atingiram a maturação, estando com a casca apresentando coloração bem amarelada ou laranja. As lesões são levemente deprimidas e avermelhadas. Elas podem coalescer, formando uma grande lesão, ou permanecerem pequenas e individualizadas; manchas virulentas: desenvolvem-se normalmente no final da safra, quando os frutos estão maduros e as temperaturas mais elevadas, e podem também ocorrer após a colheita, durante o transporte e o armazenamento dos frutos. As lesões aparecem como resultado do desenvolvimento e coalescência de lesões dos dois tipos anteriores, dando origem a grandes lesões deprimidas, de centro acinzentado e bordos salientes de coloração marrom-escuro ou vermelho-escuro. No centro dessas lesões aparecem muitas pontuações escuras, que são os picnídios. A casca do fruto fica necrosada na área da lesão, mas a parte interna do fruto não é afetada; manchas do tipo falsa melanose: normalmente aparecem quando o fruto encontra-se com cerca de 4-5 meses após a queda das pétalas, caracterizam-se pela presença de manchas irregulares, com textura áspera ao tato, de tamanho variado, mas predominantemente pequenas, com cerca de 2mm de diâmetro. Nas fases subseqüentes, as lesões individualizadas são

normalmente circundadas por numerosos pontos escuros, constituindo as lesões satélites. Em tais lesões, ao contrário das anteriores, não são formados picnídios. Além dos sintomas anteriores, no Brasil encontra-se descrito o sintoma designado mancha trincada (Goes et al., 2000), o qual aparece em frutos ainda verdes e caracterizam-se pela presença de manchas superficiais, irregulares, lisas, e de tamanho variado, inicialmente de aspecto oleoso, castanhas, que evoluem para a coloração escura. Em tais manchas não são produzidos picnídios e, de forma semelhante aos sintomas do tipo falsa melanose, normalmente não causa a queda dos frutos, mesmo quando esses encontram-se severamente atingidos. Quando os frutos atingem a maturidade, sua casca apresenta trincas ou fissuras. De acordo com Goes et al. (2000) há suspeita de que a mancha trincada esteja associada à presença e, conseqüentes danos causados pelo ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*). E ainda, de acordo com Fundecitrus (2005), um sexto sintoma também encontra-se associado, denominado mancha rendilhada, caracterizada pela presença de lesões superficiais, sem borda definida, e textura lisa, que aparecem quando os frutos ainda estão verdes. Entretanto, tal sintoma, segundo Goes (2001), é caracterizada como uma variante do sintoma tipo falsa melanose. Todos os sintomas descritos anteriormente encontram-se apresentados na Figura 1.

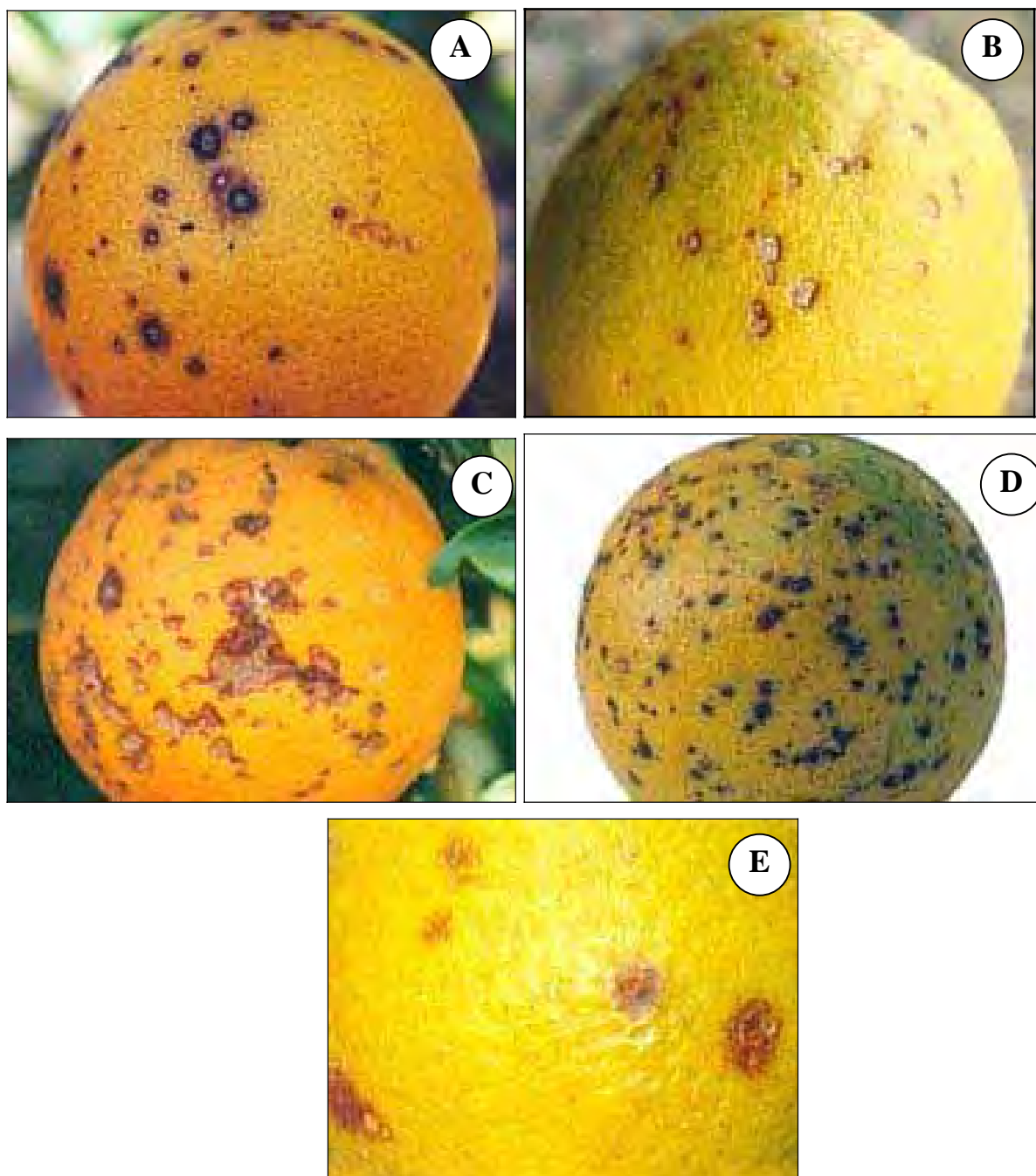


Figura 1. Sintomas de mancha preta dos citros em frutos: A – Mancha dura; B – Mancha sardenta; C – Mancha virulenta; D – Falsa melanose; E – Mancha trincada (Fundecitrus, 2005).

Etiologia

A pinta preta é causada por *Guignardia citricarpa*, cuja forma imperfeita corresponde a *Phyllosticta citricarpa*. Possui duas fontes de inóculo: conídios e ascósporos (McOnie, 1964; Kotzé, 1981), cuja importância individual nas epidemias não foi completamente esclarecida.

Na fase perfeita, o fungo produz pseudotécios e ascósporos somente em folhas em decomposição no solo (McOnie, 1964; Sutton & Waterston, 1966), não sendo encontrados em lesões de frutos e em folhas ainda aderidas às plantas. Os pseudotécios são globosos (100-175 μm de diâmetro), apresentando um ostíolo circular e não papilado, podendo encontrar-se isolados ou agregados. Os ascos são cilíndrico-clavados, bitunicados, apresentando 8 ascósporos em seu interior. Os ascósporos são unicelulares, hialinos, multigutulados, cilíndricos com o centro dilatado, apresentando apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (Sutton & Waterston, 1966).

De acordo com Kotzé (1981), para as condições da África do Sul, os ascósporos constituem-se na principal fonte de inóculo, e se desenvolvem em folhas em decomposição, de 40 a 180 dias depois da queda dessas folhas ao solo. A produção desses esporos é favorecida pela alternância entre períodos de molhamento e secamento das folhas, condição freqüente durante a estação chuvosa do ano. Podem ser disseminados a longas distâncias pelo vento, ou a curtas distâncias através do respingo de gotas d'água das folhas caídas ao solo, até a superfície de órgãos da parte baixa da copa das plantas (Feichtenberger et al., 1997).

Dada à dificuldade de obtenção dos ascósporos sob condições artificiais, os testes de patogenicidade têm sido realizados através dos ascósporos liberados a partir de pseudotécios maduros contidos em folhas coletadas do solo, sob as plantas (Kiely, 1948; Mauch-Mani & Metraux, 1998). Entretanto, embora McOnie (1967) mencione que em folhas velhas, com mais de 50% de pseudotécios maduros, a presença de conídios seja rara, não há, na literatura, uma metodologia apropriada para a sua obtenção dos ascósporos de forma seletiva.

Na fase imperfeita, o fungo produz picnídios em lesões contidas em frutos e em folhas aderidas e, ocasionalmente, no pedúnculo de frutos (Sivanesan, 1984). São também produzidos em grande quantidade em folhas cítricas caídas sob a copa das plantas (McOnie, 1964). Os picnídios são de coloração marrom-escura ou preta, solitários ou agregados, globosos (115-190 μm de diâmetro), apresentando um ostíolo levemente papilado, circular, de 12-14,5 μm de diâmetro. Os conídios apresentam forma obovóide a elíptica (8-10,5 x 5,5-7 μm de diâmetro), são hialinos, unicelulares, multigutulados, com um apêndice hialino numa das extremidades, que é facilmente destacado dos conídios (Punithalingam & Woodhams, 1982; Feichtenberger et al., 1997).

Os conídios são produzidos em picnídios formados em lesões de frutos, em folhas (McOnie, 1964) e em ramos secos, e são disseminados mais apropriadamente a curtas distâncias. Esses conídios emergem através do ostíolo e são envolvidos por uma substância mucilaginosa. Sob condições naturais, essa mucilagem apresenta coloração creme claro, de aspecto brilhante. Tal mucilagem serve de proteção contra o ressecamento das estruturas do fungo, quando expostas em ambiente adverso (Punithalingam & Woodhams, 1982). São importantes na epidemiologia da doença quando, numa mesma planta, são encontrados frutos infectados produzindo esses esporos, e frutos jovens suscetíveis, ou seja, frutos de até 4-5 meses de idade a contar da queda das pétalas, ou quando há grande quantidade de galhos secos. Essa situação pode ocorrer com relativa freqüência em pomares cujas variedades apresentam vários surtos de florescimento, ou mesmo em anos cujas condições climáticas atípicas contribuam para a ocorrência de vários surtos de florescimentos (Feichtenberger et al., 1997). Ainda não foram encontrados relatos quanto à magnitude da importância dos conídios formados nos ramos secos, no incremento da doença e a sua relação quanto aos tipos de sintomas produzidos.

Os esporos germinam na superfície de órgãos suscetíveis, produzindo apressórios. Uma delgada hifa de infecção é então formada a partir do apressório, que penetra através da cutícula e forma uma pequena massa de hifas entre a cutícula e a epiderme (Kotzé, 1981). Nessa forma de micélio subcuticular quiescente, o fungo pode

permanecer dormente por até 12 meses. Esse período de dormência pode ser interrompido quando o fruto atinge seu tamanho final e inicia a maturação, ou com condições ambientais representadas por exposição dos frutos à intensa radiação.

Até o presente momento, não foram encontrados relatos relacionados à origem dos diferentes tipos de sintomas. Admite-se que, alguns deles, devido à individualização das lesões, estejam relacionados às infecções originárias de ascósporos, já que esses podem ser levados pelo vento e dessa forma serem espalhados aleatoriamente. Outros tipos de sintomas, em razão do baixo nível de individualização das lesões, pressupõem-se sejam originários de conídios, já que os mesmos embora possam ser espalhados na superfície dos frutos, na maioria das vezes apresentam-se concentrados dada a sua remoção através da mucilagem. Dessa forma, pesquisas envolvendo a relação ambiente, fonte de inóculo e a influência de outras variáveis, fazem-se importantes com o intuito de se determinar a origem de tais sintomas e, dessa forma, traçar estratégias que redirecionem em melhorias ao nível de controle de *Guignardia citricarpa*.

Controle

De acordo com Feichtenberger et al. (1997), as medidas de controle para pinta preta incluem: plantio de mudas sadias, produzidas em regiões livres da doença; remoção de frutos temporões infectados antes do início da florada, visando reduzir a fonte de inóculo representada pelos picnídios em lesões de frutos; controle das plantas daninhas nas linhas de plantio com herbicidas pós-emergentes, antes do início da florada, visando a formação de uma cobertura morta sobre as folhas caídas ao solo, reduzindo a fonte de inóculo (ascósporos); eliminação de plantas em estado de depauperamento avançado do pomar; manutenção das plantas em boas condições de nutrição e sanidade; pulverizações visando a proteção dos frutos durante o principal período de suscetibilidade, de até 4-5 meses após a queda das pétalas, com fungicidas sistêmicos (benzimidazóis ou estrobilurinas) ou de contato (cúpricos ou ditiocarbamatos), preferencialmente de forma associada, acrescidos de óleos mineral ou vegetal.

Não obstante a uma série de cuidados adotados visando um controle eficiente do patógeno, nem sempre os resultados atingem os níveis desejados, especialmente quando o destino da fruta produzida é o comércio in natura, para as vendas internas no país ou às exportações. Diferentes tipos de sintomas podem ser verificados nessas situações, entretanto, pouco ou nada se sabe acerca de sua origem, razão pela qual o presente trabalho mostra-se importante e imprescindível.

III MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram implantados e conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP.

3.1. Obtenção do inóculo

3.1.1. Obtenção de conídios

3.1.1.1. Obtenção de conídios através de culturas-estoque de *Phyllosticta citricarpa*

Os conídios foram obtidos a partir de culturas-estoque da micoteca do Departamento de Fitossanidade da UNESP/FCAV, de isolados de *Phyllosticta citricarpa* obtidos a partir de frutos sintomáticos. Os isolados previamente identificados pelos códigos 313 e 315, foram obtidos da região de Conchal/SP, os quais são reconhecidamente patogênicos mediante testes de inoculação realizados por Baldassari (2001) e testes culturais e moleculares, conforme protocolo publicado por Baayen et al. (2002) e Bonants et al. (2003).

Os isolados cultivados previamente em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e posteriormente transferidos para tubos de ensaio contendo óleo mineral foram novamente transferidos para placas contendo meio de cultura BDA, as quais foram incubadas a temperatura de 25°C e fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro) por 30 dias. A partir dessa cultura, obteve-se uma suspensão conidial calibrada para uma concentração contendo 1×10^5 conídios/mL (Figura 2), a qual foi posteriormente utilizada em ensaios realizados no presente trabalho.

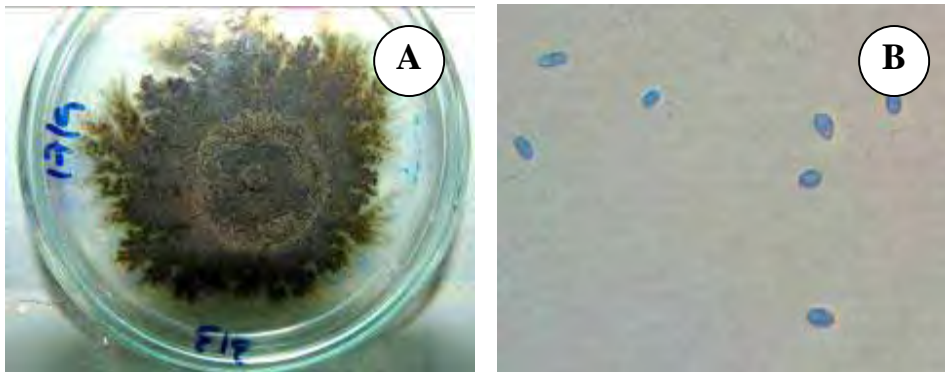


Figura 2. Isolado de *Phyllosticta citricarpa* em (A) meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), com 30 dias de crescimento e (B) suspensão de conídios observadas em microscópio fotônico com aumento de 40 vezes.

3.1.2. Obtenção de pseudotécios e ascósporos

3.1.2.1. Obtenção de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* em folhas sintomáticas de laranjeira ‘Pêra’ mantidas em caixas Gerbox® e bandejas plásticas

Caixas Gerbox®

No presente trabalho seguiu-se a metodologia adotada por Traperro-Casa & Kaiser (1992) para a obtenção do teleomorfo de *Didymella rabies*. Para tal, folhas fisiologicamente maduras de laranjeira ‘Pêra’, oriundas de pomar infestado com *Guignardia citricarpa*, foram desinfestadas mediante imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% (com cloro ativo 2%):água (v:v), seguido da sua deposição em caixas de germinação do tipo Gerbox®, contendo Hidrosolo® para manter a umidade constante. Sobre o Hidrosolo® foi depositada uma camada de 10 cm de perlita, a qual foi recoberta por duas folhas de papel de filtro. Sobre as folhas de papel de filtro foi colocada uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo duas folhas de plantas cítricas (Figura 3). A seguir, as caixas Gerbox foram incubadas em estufas para B.O.D. às temperaturas de 20°C e 25°C, sob duas condições de fotoperíodo, sendo: fotoperíodo alternado 12h luz/12h escuro e luz contínua.

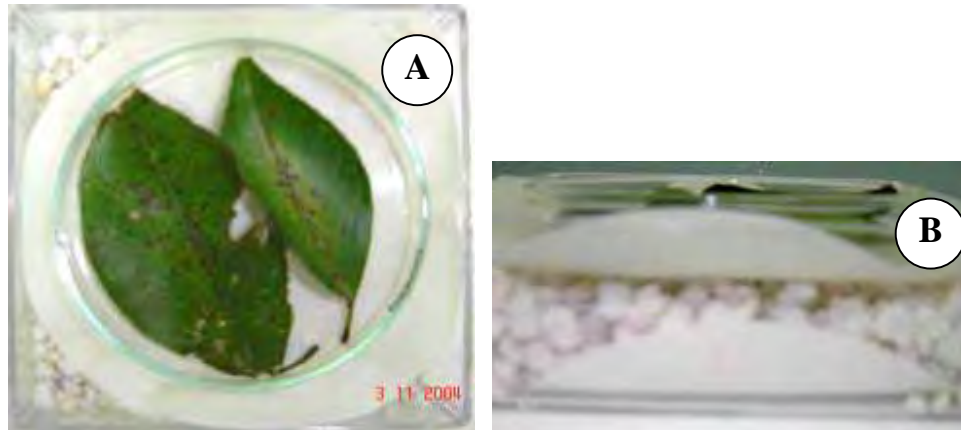


Figura 3. Caixas Gerbox: (A) Vista superior, contendo folhas cítricas sintomáticas, previamente desinfestadas, dispostas interiormente em placas de Petri, isoladas por camadas de papel filtro da perlita, e (B) vista lateral, mantidas a 25°C, sob fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro.

A cada 15 dias, o papel de filtro foi umedecido, visando manter a umidade do substrato e favorecer a produção de pseudotécios. As avaliações deram-se mediante inspeção sob estereoscópio quanto à presença de pseudotécios, dissecação das estruturas e avaliações qualitativas quanto à presença de ascos e ascósporos sob microscópio fotônico. Tais avaliações foram realizadas aos 21, 50, 80 e 130 dias após a incubação.

Bandejas plásticas

Quanto à avaliação em bandejas plásticas adotou-se procedimento semelhante, sendo empregadas folhas sintomáticas de laranja 'Valência' coletadas de propriedade comercial localizada em Mococa/SP. Tais folhas foram desinfestadas conforme procedimentos anteriormente mencionados, mediante imersão em solução hipoclorito de sódio 2% (com cloro ativo 2%) : água (v:v), durante 5 minutos. A comprovação acerca das infecções de *G. citricarpa* nas folhas deu-se mediante isolamentos prévios e realização de testes para identificação, conforme metodologia empregada por Baayen et al. (2002), Bonants et al. (2003) e Baldassari (2001).

No caso das bandejas (135x135x45 mm) com tampa, a parte inferior foi perfurada, sendo obtidas 2 fileiras de furos de 10mm de diâmetro. Posteriormente, em tais bandejas foi depositada uma camada de 2 cm de areia, previamente autoclavada por uma hora a 120°C, sob 1,0 atm. A areia foi mantida permanentemente úmida mediante o contato do fundo das bandejas furadas, com uma lâmina d'água de cerca de 2 cm existente no interior de uma bandeja adicional (Figura 4). Tais bandejas foram mantidas em locais de temperatura ambiente, de cerca de 25°C ± 2°C, sob alternância de luz e escuro. Sobre a camada de areia foram colocadas 20 folhas fisiologicamente maduras de laranjeira 'Pêra'. Para avaliação adotou-se procedimento semelhante ao descrito anteriormente, sendo, porém, as inspeções realizadas aos 15, 30, 45 e 60 dias após a deposição das folhas sobre a camada de areia.

Para ambos os ensaios, utilizando caixas Gerbox® e bandejas plásticas, a análise estatística foi realizada mediante programa ESTAT (v.2.0), o qual gerou curvas e equações de regressão dos tratamentos avaliados.

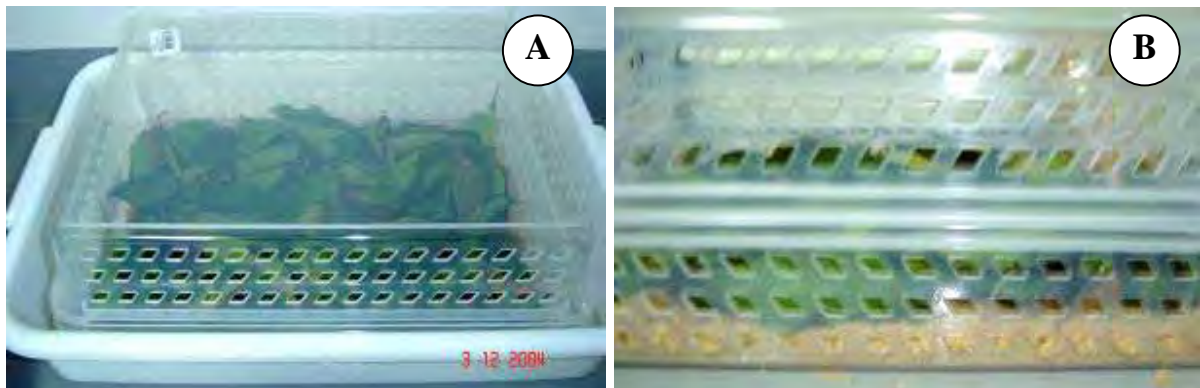


Figura 4. A - Vista superior de folhas sintomáticas de laranjeira 'Valência' mantidas em bandeja plástica (335x250x63 mm); B- Vista lateral de bandeja contendo areia esterilizada e sob umidade constante, a 25°C e alternância de luz e escuro.

3.1.2.2. Obtenção de estruturas reprodutivas de *Guignardia citricarpa* em folhas assintomáticas de laranjeiras 'Pêra' e 'Valência' inoculadas com discos de colônia

Folhas maduras e assintomáticas de laranjeiras 'Pêra' e 'Valência' foram coletadas de área experimental do pomar do Departamento de Fitossanidade da UNESP, em área sem antecedente de *G. citricarpa*, as quais, após desinfestação superficial em solução de hipoclorito de sódio 2% (com cloro ativo 2%) : água (v:v) foram submetidas a 2 tratamentos de esterilização e posterior inoculação, sendo: (i) folhas autoclavadas durante 1 hora a 120°C, 1 atm, seguido da sua exposição a ambiente de laboratório até o seu resfriamento, e inoculadas com disco de colônia de *P. citricarpa* mantidas a 25°C, sob fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro; (ii) idem ao anterior, porém as folhas foram mantidas a 25°C, e sob luz contínua; (iii) folhas autoclavadas durante 90 minutos, inoculadas com disco de colônia de *P. citricarpa* e mantidas a 25°C sob fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro e; (iv) idem ao (iii), porém folhas mantidas a 25°C, sob luz contínua.

Após a esterilização, as folhas foram justapostas sobre 2 folhas de papel de filtro contidas em placas de plástico de 150mm de diâmetro. Em cada placa foram depositadas duas folhas de citros e, sobre as mesmas, na sua região intermediária, foram justapostos dois discos de 5 mm de diâmetro obtidos da periferia de colônias de *P. citricarpa*, cultivadas em BDA a 24°C ± 1°C por 30 dias (Figura 5).



Figura 5. Folhas cítricas previamente desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 2% e água e, submetidas a autoclavagem por 1 hora, depositadas no interior de placas de plástico de 150mm, mantidas a 25°C, sob fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro, visando a produção de pseudotécios.

Aos 30 dias após a inoculação, as folhas foram retiradas das placas e colocadas em bandejas de plástico, mantidas em ambiente natural (a céu aberto, com luz solar ou exposição noturna), durante 15 dias. Nesse período, as folhas foram submetidas a períodos de molhamento/secamento em dias alternados.

As avaliações quanto à produção de pseudotécios nas folhas foram realizadas aos zero (antes de submeter as folhas às condições externas de ambiente), 30, 45 e 60 dias após a instalação do ensaio. As avaliações quanto à presença de pseudotécios deram-se mediante inspeção ao estereoscópio.

Para a análise estatística foi utilizado o programa ESTAT (v.2.0).

3.1.2.3. Obtenção de ascósporos de *Guignardia citricarpa* em discos de folha de laranja 'Pêra' e estudo da influência de métodos de esterilização de discos foliares na produção de ascósporos

A partir de folhas de laranja 'Pêra', coletadas no pomar da UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal, foram retirados discos de 5mm de diâmetro, com auxílio de um

vazador de metal e, em seguida, esses foram autoclavados a 120°C e 1 atm, durante uma hora. Após a esterilização, quatro discos foliares foram depositados equidistantes na periferia do interior de placas de Petri contendo meio ágar-água (AA). Posteriormente, no centro da placa, foram depositados dois discos de colônias de *P. citricarpa*, obtidos da periferia de colônias de cultura mantida em estufas para B.O.D. a 24°C ± 1°C, por 30 dias (Figura 6). As placas contendo os discos foliares e discos de colônia foram incubadas em estufas para B.O.D. a 25°C e fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro.

As avaliações foram realizadas semanalmente, com auxílio de estereoscópio, iniciando-se após 7 dias de incubação. As avaliações foram qualitativas e quantitativas, mediante a contagem de estruturas reprodutivas do fungo formadas no meio e sobre os discos de folhas.

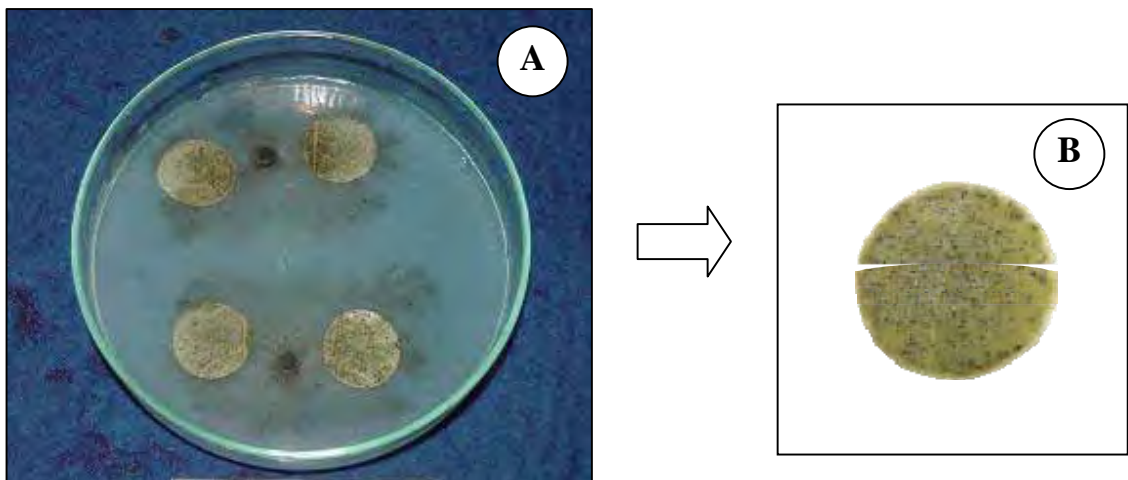


Figura 6. Discos foliares de laranjeira ‘Pêra’ autoclavados. (A) - dispostos no interior de placas de Petri contendo meio ágar-água, mantida a 25°C, sob fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro, visando a produção de pseudotécios, 49 dias após repicagem. (B) – presença de frutificações do fungo visualizadas em estereoscópio, com 3x3,3x2 de aumento.

Em estudo complementar foi também avaliada a influência de métodos de esterilização dos discos foliares na produção de ascósporos. Para tal, adotou-se metodologia semelhante ao do ensaio de produção de estruturas reprodutivas de *G. citricarpa* em discos de folha. Entretanto, incluiu-se o método de desinfestação. No presente ensaio foram empregados: (i) discos foliares de laranja 'Pêra' não autoclavados, apenas desinfestados superficialmente mediante imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% : água (1:1) por 5 minutos e; (ii) discos foliares de laranja 'Pêra' autoclavados a 120 °C e 1 atm por 90 minutos.

Em cada placa de Petri contendo meio ágar-água (AA) foram colocados eqüidistantes, na periferia, 2 discos de folhas de 10mm de diâmetro. No centro de tais placas procedeu-se também a deposição de um disco de colônia, de 5 mm de diâmetro, obtido do isolado 315 de cultura-estoque de *P. citricarpa*.

Para a análise estatística foi utilizado o programa ESTAT (v.2.0).

3.1.2.4. Obtenção de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* em folhas de laranja 'Pêra' destacadas e submetidas a diferentes tratamentos térmicos

No presente trabalho, folhas fisiologicamente maduras de laranja 'Pêra', oriundas de um pomar infestado com *Guignardia citricarpa* foram desinfestadas mediante imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% : água (v:v) e, em seguida, submetidas a tratamentos térmicos diferenciados, objetivando-se promover o rompimento estrutural das paredes celulares e degradar os componentes químicos existentes nas mesmas e, dessa forma, simulando as condições que ocorrem em condições naturais, estimular à formação das estruturas reprodutivas. Foram utilizadas 100 folhas por tratamento.

Os tratamentos térmicos realizados foram: (i) testemunha: água destilada esterilizada mantida sob temperatura ambiente; (ii) folhas imersas em banho-maria a 25°C durante 1 minuto; (iii) idem ao (ii), porém as folhas foram imersas por 5 minutos; (iv) folhas imersas em banho-maria a 30°C por 1 minuto; (v) idem ao (iv), porém as

folhas foram imersas por 5 minutos; (vi) folhas imersas em banho-maria a 40°C por 1 minuto; (vii) idem ao (vi), porém as folhas imersas por 5 minutos.

Após a realização dos tratamentos térmicos, as folhas foram separadamente dispostas em bancada sobre folhas de papel toalha, de forma a promover secagem das mesmas. Uma vez secas, as folhas foram colocadas no interior de redes plásticas (do tipo às utilizadas para o armazenamento de frutas no comércio varejista), e submetidas às condições de ambiente externo, com exposição a ambiente natural e à alternância molhamento/secamento (Figura 7).

As avaliações visuais foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias após a realização dos tratamentos térmicos. Estas avaliações consistiram da coleta das folhas contidas nas embalagens mantidas no campo, seguido de dissecação das estruturas de morfologia semelhante aos pseudotécios, seguido de visualização ao estereoscópio quanto à produção e quantidade de estruturas reprodutivas do fungo presentes.

Para a análise estatística foi utilizado o programa estatístico ESTAT (v.2.0).



Figura 7. Vista geral da disposição das redes contendo folhas de laranjeira 'Pêra' previamente submetidas a diferentes tratamentos térmicos, seguido da sua exposição a ambiente natural.

3.2. Ensaios de germinação *in vitro* de conídios de *Phyllosticta citricarpa*

3.2.1. Avaliação de germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em meio de cultura e folhas cítricas sob diferentes períodos de incubação

O presente trabalho consistiu na determinação da porcentagem de germinação de conídios de *P. citricarpa* em lâminas de vidro e em folhas de laranjeira 'Valência'.

Para a produção dos conídios *in vitro* foram testados os meios de cultura ágar-água (AA: 10g de ágar, 1000mL de água) e ágar-dextrose (AD: 20g de dextrose, 10g de agar, 1000mL água), em lâminas de vidro, sob duas condições de fotoperíodo: contínuo (24h luz) e alternado de 12 horas luz/12horas escuro, a 25°C. Quatro lâminas, duas por meio de cultura, contendo 2 mL de meio de cultura em cada uma delas foram previamente montadas e colocadas em placas de Petri de 120mm. Sobre tais lâminas e, em área previamente demarcada, foram depositadas duas gotas de 30µL de suspensão contendo 10⁴ conídios/mL, seguido de incubação em estufas para B.O.D., nas condições de fotoperíodo previamente citadas. As avaliações foram realizadas às 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48 e 72 horas de incubação, sendo retirada uma das placas de cada uma das estufas para B.O.D., correspondentes aos respectivos tratamentos. Nas lâminas, sobre os pontos demarcados, fez-se deposição de uma gota de azul láctico para interromper o processo de germinação dos conídios, em cada período de tempo, a qual foi posteriormente determinada mediante observação e contagem ao microscópio fotônico, com aumento 20x. Foram avaliados 100 conídios ao acaso, sendo considerado germinado apenas os de tubo germinativo com comprimento maior ou igual à largura mediana dos conídios.

Em estudo adicional de avaliação de germinação, foram empregadas folhas de laranja 'Valência' nos estádios: (i) recém-emitidas, porém em expansão; (ii) folhas jovens, de cerca de 20-30 dias e; (iii) folhas fisiologicamente maduras. Em cada folha, em áreas previamente demarcadas, foram aplicadas quatro gotas de 30µL de suspensão contendo 10⁴ conídios/mL, seguido de incubação em estufas para B.O.D.s a 25°C, sob luz constante (Figura 8). As avaliações foram realizadas às 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48 e 72 horas de incubação, aplicando-se quatro gotas de esmalte

(base) : acetona (1:1) sobre os pontos demarcados na folha, conforme metodologia adotada por Fitzell et al. (1984). Após secagem, a película formada foi retirada e justaposta numa lâmina com azul lático para visualização ao microscópio e determinação da estimativa da porcentagem de conídios germinados.

Para a análise estatística foi utilizado o programa ESTAT (v.2.0).

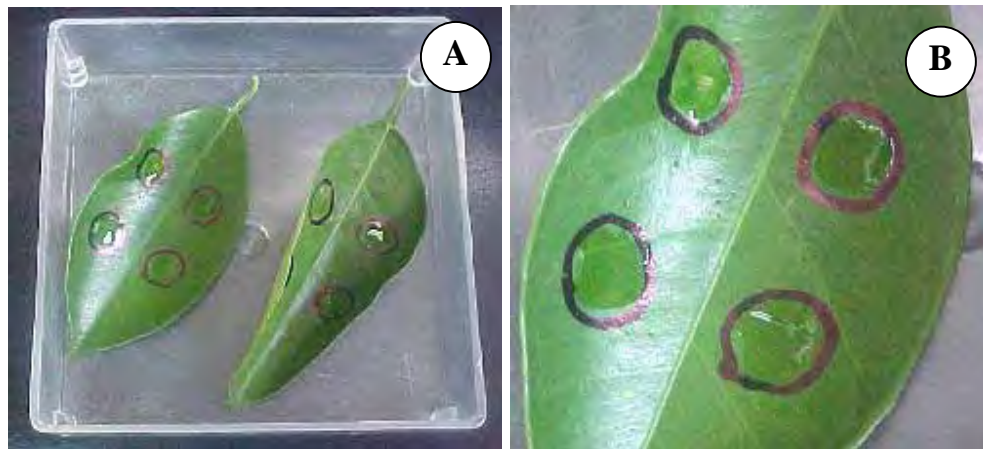


Figura 8. Caixa Gerbox® contendo em seu interior folhas de laranjeira 'Valência', inoculadas com conídios de *Phyllosticta citricarpa*, os quais, após 8 horas de incubação foram submetidos à suspensão da sua germinação mediante a deposição de esmalte e acetona, visando posteriormente a avaliação da germinação dos conídios. A – Vista superior das folhas contidas nas placas. B - Detalhe de folha inoculada contendo os pontos demarcados, onde foi realizada a deposição de suspensão de conídios.

3.2.2. Efeito de tratamentos com ou sem centrifugação, com ou sem substâncias indutoras de germinação, na porcentagem de conídios de *Phyllosticta citricarpa* germinados

Para o ensaio, uma suspensão conidial de 10^5 conídios/mL foi preparada a partir de placas de culturas puras do isolado 315 de *P. citricarpa*, anteriormente descrito, com 28 dias de incubação. Para tanto, as colônias do fungo foram raspadas com auxílio de alça de Drigalsky e adição de água esterilizada ao meio. Após esse processo, a

suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze e realizou-se a contagem dos conídios em câmara de Neubauer.

Discos de meio de cultura ágar-água (AA) foram obtidos com o auxílio de um vazador de metal de 10mm de diâmetro. Tais discos foram dispostos individualmente em lâminas de vidro, as quais foram dispostas internamente em placas de vidro de 135mm contendo papel de filtro umedecido ao fundo, de forma a se manter a umidade do ambiente.

Após a montagem das lâminas com os discos de meio AA, 50 μ L de suspensão conidial foi depositada no centro dos discos, com auxílio de micropipeta. As placas foram mantidas sob condições de ambiente natural, com temperatura aproximada de 25°C (Figura 9).



Figura 9. Vista geral de placas de vidro de 135mm com lâminas contendo meio ágar-água inoculadas com suspensão de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de 1×10^5 conídios/mL, mantidas a 25°C e fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro.

Foram realizados quatro tratamentos, sendo: (T1) correspondente a testemunha, sem agitação e sem adição de substâncias indutoras de germinação (apenas a suspensão conidial); (T2) suspensão de conídios submetida ao processo de

centrifugação a uma velocidade de 5.600g por 5 minutos. Tal prática foi efetuada três vezes consecutivamente, retirando-se o sobrenadante e adicionando água esterilizada, na tentativa de remover ou diluir a concentração da mucilagem que, segundo a literatura (Leite & Nicholson, 1992), possui auto-inibidores da germinação; (T3) suspensão de conídios lavada inicialmente com solução de Tween 20 (0,02%), seguida de agitação manual, uniforme, durante 1 minuto. Neste tratamento, logo após a primeira centrifugação, adicionou-se à suspensão conidial uma solução de sacarose (30g/L). Ao final de três centrifugações, adicionou-se ácido cítrico 0,3% à suspensão, seguindo a metodologia proposta por Kiely (1948), visando favorecer o processo de germinação; (T4) apenas adição de Tween 20 (0,02%) à suspensão conidial, promovendo boa agitação, baseado na sua ação dispersante e removedora da mucilagem, já que essa, na maior parte das vezes, é constituída por proteínas e glicoproteínas (Leite et al., 2001).

O processo de germinação dos conídios foi paralisado em horários pré-determinados, pela adição de azul láctico sobre os mesmos, nos respectivos tempos. As avaliações foram realizadas após 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32 e 40 horas da deposição da suspensão do inóculo no meio. Para tal, as lâminas contendo os conídios foram observadas ao microscópio fotônico, para determinação da porcentagem de germinação. Considerou-se germinado o conídio que, na avaliação, apresentou tubo germinativo com tamanho igual ou superior à largura da sua região mediana.

Para a análise estatística foi utilizado o programa ESTAT (v.2.0).

3.2.3. Avaliação do efeito da adição de suco de laranja à suspensão de conídios na germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa*

Neste ensaio, a metodologia utilizada foi semelhante à descrita no ensaio quanto à avaliação do efeito de diferentes tratamentos físicos e químicos na germinação, porém, o tratamento T3 consistiu da adição de suco cítrico à suspensão, de forma a verificar um possível incremento na taxa de germinação dos conídios do fungo.

Em meio de cultura

Empregou-se suspensão contendo 10^5 conídios/mL a qual foi preparada a partir de placas de culturas puras *P. citricarpa*, isolado 315, anteriormente descrito, de 28 dias de incubação. As colônias do fungo, após adição de água esterilizada sobre o meio foram raspadas com auxílio de alça de Drigalsky. Após esse processo, a suspensão obtida foi filtrada em camada dupla de gaze e realizou-se a contagem dos conídios em câmara de Neubauer.

Os tratamentos visando a avaliação da taxa de germinação de conídios em discos de meio de cultura ágar-água foram: (i) Testemunha, sem agitação e sem adição de substâncias indutoras de germinação (apenas suspensão conidial); (ii) suspensão de conídios submetida à centrifugação a 5.600g por 5 minutos (3 vezes), retirada do sobrenadante e adição de água esterilizada; (iii) suspensão de conídios lavada inicialmente com solução de Tween 20 (0,02%), agitada manualmente por 1 minuto. Neste tratamento, logo após a primeira centrifugação, adicionou-se à suspensão conidial de suco de laranja 'Pêra' madura a 0,5% (v/v) (acrescido de 20 µg/mL de sulfato de streptomicina); (iv) apenas adição de Tween 20 (0,02%) à suspensão conidial, seguido de agitação manual por cerca de um minuto.

Discos de meio de cultura ágar-água (AA) foram obtidos com o auxílio de um vazador de metal de 10mm de diâmetro. Tais discos foram depositados individualmente em lâminas de vidro, as quais foram dispostas internamente em placas de Petri de 135mm, contendo papel de filtro umedecido ao fundo, de forma a se manter bom nível de umidade ambiente.

Após a montagem das lâminas com os discos de meio AA, 50 µL de suspensão conidial foi depositada na parte central dos discos, com auxílio de micropipeta. As placas foram mantidas sob condições de ambiente natural, em temperatura aproximada de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

O processo de germinação dos conídios foi paralisado em horários pré-determinados, pela adição de azul láctico sobre os mesmos após 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32 e 40 horas da deposição da suspensão conidial sobre os discos.

Após a paralisação do processo de germinação, as lâminas contendo os conídios foram observadas ao microscópio ótico, para determinação da porcentagem de germinação. Considerou-se germinado o conídio que, na avaliação, apresentava tubo germinativo com tamanho igual ou superior à sua largura na região mediana.

Em folhas

A germinação de conídios também foi testada em folhas, adotando-se metodologia semelhante à da germinação em discos de meio de cultura, sendo avaliados os mesmos tratamentos do ensaio com meio de cultura, com exceção do último tratamento, o qual não foi testado.

As avaliações foram realizadas às 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32 e 40 horas após incubação, aplicando-se quatro gotas de esmalte (base) : acetona (1:1) (Fitzell et al., 1984), sobre os pontos demarcados na folha,. Após secagem, a película formada foi retirada e justaposta numa lâmina de vidro, sobre a qual foi adicionada uma gota de azul lático para visualização ao microscópio fotônico e determinação da estimativa da porcentagem de conídios germinados.

Para a análise estatística foi utilizado o programa ESTAT (v.2.0).

3.3. Ensaio de inoculação de plantas de laranjeira 'Pêra' e tangor 'Murcott' em casa de vegetação e exposição a condições de ambiente controlado e campo

Para determinar a influência do ambiente na expressão de sintomas realizou-se ensaio mediante a inoculação de frutos verdes e alguns próximos à maturação (fase de mudança da cor verde para amarela) de plantas de laranjeira 'Pêra' e tangor 'Murcott', com aproximadamente dois anos de idade, mantidas em baldes de plástico, com capacidade para 20L de solo, mantidos em casa de vegetação. Para cada método de inoculação foram empregadas quatro plantas. Cada planta continha, ao final, no mínimo 4 frutos previamente selecionados e inoculados. Os isolados utilizados no ensaio foram identificados pelos códigos 313 e 315, obtidos da região de Conchal/SP, reconhecidamente patogênicos, determinada mediante testes de inoculação realizados

por Baldassari (2001) e testes culturais e moleculares, conforme protocolo publicado por Baayen et al. (2002) e Bonants et al. (2003).

Os frutos foram inoculados através de diferentes metodologias de inoculação e, 15 dias após a sua realização, as plantas foram transferidas para diferentes condições de ambiente, como casa de vegetação climatizada e posteriormente para câmara de crescimento a: (i) temperatura de 25°C e 70% de umidade relativa e (ii) temperatura de 25°C e 90% de umidade relativa (Figura 10), até que os frutos atingissem a fase de maturação. Nesta fase, as plantas foram novamente transferidas para o campo e expostas às condições de ambiente natural.



Figura 10. A - Vista geral de plantas de laranjeira 'Pêra-Rio' contendo frutos verdes inoculados mantidas no interior da câmara de crescimento e; B - aos 15 dias após a inoculação dos frutos em fases iniciais de maturação.

As metodologias de inoculação testadas foram:

- (i) discos de papel filtro umedecidos em suspensão conidial de *P. citricarpa*;
- (ii) discos foliares autoclavados mantidos em meio de cultura ágar-água por 45 dias, contendo picnídios/conídios de *P. citricarpa*;
- (iii) pulverização da suspensão conidial de *P. citricarpa* contendo 1×10^5 conídios/mL, agitados em centrífuga com adição de ácido cítrico a 0,3% (p/v) previamente à inoculação;
- (iv) e, discos foliares autoclavados mantidos em meio de cultura ágar-água contendo suco de laranja 'Pêra' madura por 45 dias, apresentando picnídios/conídios de *P. citricarpa*;

Com relação à inoculação mediante o uso de discos de papel de filtro umedecidos adotou-se técnica semelhante à empregada por Baldassari (2001). Porém, para tal, discos de papel filtro de 5mm de diâmetro feitos com auxílio de furador de metal, foram imersos em suspensão conidial contendo 1×10^5 conídios/mL, obtida a partir de culturas puras de um isolado de *P. citricarpa* em placas previamente incubadas a $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, durante 30 dias. À medida que os discos ficaram embebidos na suspensão conidial, foram posteriormente depositados sobre o fruto.

No presente ensaio foram utilizados dez discos de papel filtro, os quais foram depositados de forma aleatória na superfície do fruto. Posteriormente, tais frutos foram cobertos com sacos de papel cristal 15x15cm durante 15 dias (Figura 11). Após tal período, os saquinhos foram retirados e os frutos tornaram-se expostos ao ambiente natural.

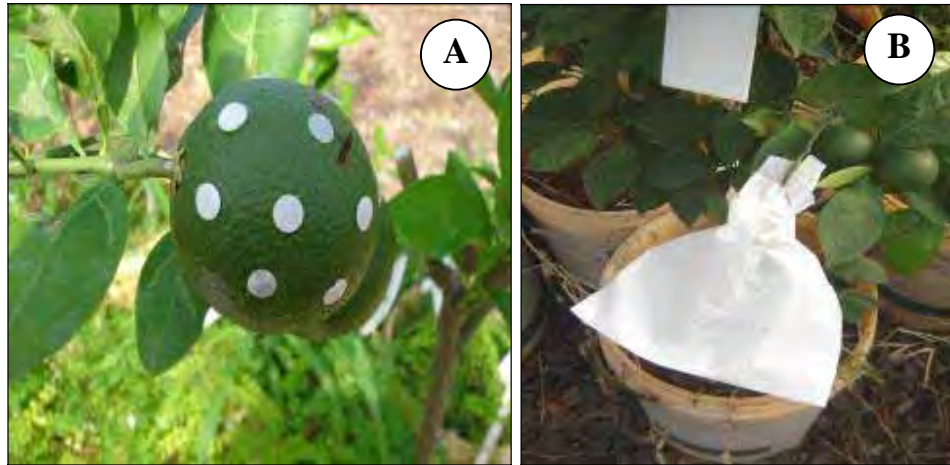


Figura 11. A - Detalhe da disposição aleatória dos discos de folha de papel filtro, previamente embebidos em suspensão conidial de *Phyllosticta citricarpa*, sobre fruto verde de laranjeira 'Pêra-Rio' e; B - Detalhe do revestimento dos frutos inoculados, mediante o uso de saco de papel cristal 15x15cm.

No caso da inoculação com discos foliares autoclavados, a metodologia adotada foi semelhante à descrita por Baldassari (2001), na qual discos foliares foram obtidos com auxílio de um vazador de metal de 5mm de diâmetro, a partir de folhas cítricas assintomáticas coletadas no campo e desinfestadas previamente, e, posteriormente, submetidas a autoclavagem a 120°C e 1 atm durante 90 minutos. Após a esterilização, dois discos foliares foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA), sendo justapostos em pontos opostos na parte interna e periférica da placa. Em seguida, no centro de tais placas foi depositado um disco de colônia de *P. citricarpa*, obtido de cultura pura previamente incubada a 25°C e fotoperíodo alternado (12 horas luz/12 horas escuro), durante 20 dias. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufas para B.O.D. a 25°C e fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro) durante 60 dias, quando então foram retirados os discos foliares do interior das placas e depositados sobre o fruto. Para cada fruto foram depositados dois discos foliares colonizados por *P. citricarpa*. Posteriormente, os frutos foram recobertos por um pedaço pequeno de gaze, formando uma rede protetora de forma a permitir o melhor contato do disco foliar com a superfície do fruto. Após recobrir o fruto com a gaze, procedeu-se ao ensacamento deste com saco de papel cristal 15x15cm. Após 15

dias, os saquinhos foram retirados e os frutos tornaram-se expostos a condições de ambiente controlado com temperatura de 25°C e umidade relativa de 70 ou 90%, conforme tratamento realizado.

A suspensão conidial do fungo contendo conídios para inoculação por pulverização foi obtida a partir de culturas puras de um isolado de *P. citricarpa* em placas contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), previamente incubado a 24°C ± 1°C durante 30 dias. A partir dessa cultura foi obtida suspensão conidial mediante a deposição de 10mL de água destilada esterilizada acrescida de uma gota de Tween 20 e adição de ácido cítrico 3%, seguido de raspagem superficial com pincel de cerdas macias para abertura dos ostíolos e liberação dos conídios. Após filtragem em camada dupla de gaze, a suspensão foi submetida à agitação em água destilada esterilizada em centrífuga a 5.600g por 3 vezes, durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e a suspensão teve sua concentração calibrada para 1x10⁵ conídios/mL, mediante emprego de hemocítmetro. A pulverização foi realizada através de pulverizador manual comum, empregando-se volume suficiente para atingir o ponto de escorrimento. Após a inoculação, cada fruto inoculado foi coberto com um saco de papel cristal de 15x15cm (Figura 12). Após 15 dias, os saquinhos foram retirados e os frutos tornaram-se expostos a condições de ambiente controlado, com temperatura de 25°C e umidade relativa de 70 ou 90%, conforme o tratamento avaliado.



Figura 12. A - inoculação dos frutos de laranjeira 'Pêra' através de pulverizador manual empregando suspensão conidial contendo 1×10^5 conídios/mL de *Phyllosticta citricarpa*; B - Vista geral das plantas contendo frutos inoculados, em casa de vegetação, recobertos com sacos de papel cristal 15x15cm.

Quanto à inoculação mediante o uso de discos foliares mantidos em meio de cultura acrescido de suco de laranja, realizou-se a mesma metodologia descrita para a avaliação de discos foliares autoclavados, modificado apenas mediante o acréscimo de suco de laranja 'Pêra' madura a 0,5% (v/v) ao meio ágar-água, antes da deposição dos discos foliares e das colônias do fungo (Figura 13).

Em todas as metodologias testadas, as avaliações quanto aos tipos de sintomas foram realizadas semanalmente até a fase de maturação dos frutos, determinando-se o número de frutos com sintomas típicos da doença e os tipos de sintomas produzidos. No presente ensaio, não foram realizadas análises estatísticas, sendo realizado apenas comparação das variáveis obtidas entre os tratamentos avaliados.



Figura 13. Fruto de laranjeira 'Pêra-Rio' (A) inoculado com discos foliares contendo estruturas reprodutivas de *Phyllosticta citricarpa* mantidos em meio de cultura com suco de laranja; (B) detalhe da cobertura do fruto com gaze na forma de rede após inoculação; (C) fruto inoculado, recoberto com saco de papel cristal 15x15cm, após a colocação de gaze formando uma rede; e, (D) vista geral dos frutos ensacados após inoculação.

3.4. Avaliação a campo do efeito da presença de galhos secos na expressão de sintomas da falsa melanose em plantas cítricas

O presente trabalho teve como objetivo determinar a relação entre presença de galhos e ramos secos e sintomas de falsa melanose. Para tal, o trabalho foi implantado e conduzido em propriedade particular localizada em Tambaú/SP, em área de elevada pressão de inóculo, em pomar de laranjeira 'Natal' com 14 anos de idade. Tais plantas, assim, exibiam muitos galhos secos e expressivo número de frutos com sintomas de falsa melanose (Figura 14).

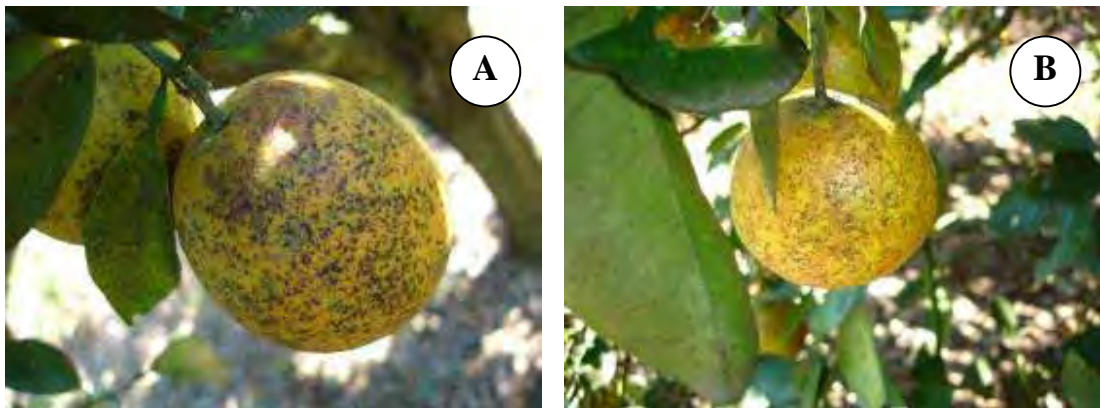


Figura 14. Sintomas do tipo falsa melanose em frutos de laranjas 'Natal'. (A) Vista superior e frontal e (B) Vista lateral.

Previamente, em tais áreas foi realizada poda em 28/06/2005, em duas linhas de 78 e 76 plantas, sendo cortados e removidos os galhos secos e outros que exibiam sintomas de rubelose causada por *Erytricum salmonicolor*, uma importante doença fúngica que leva ao secamento e morte de ramos e galhos (Figuras 15 e 16), assim como da própria planta. Os frutos removidos, resultantes da poda, foram contados e, a partir de tais dados estabelecida a porcentagem de frutos com e sem sintomas do tipo falsa melanose. Nesta primeira avaliação foram realizadas observações somente quanto ao número de frutos sintomáticos nas áreas podadas, visto que, o objetivo inicial foi o de preparar a área para as avaliações subseqüentes, mediante experimento implantado e conduzido no ano seguinte, em 2006.



Figura 15. Vista geral da área experimental com plantas de laranjeiras 'Natal' podadas.

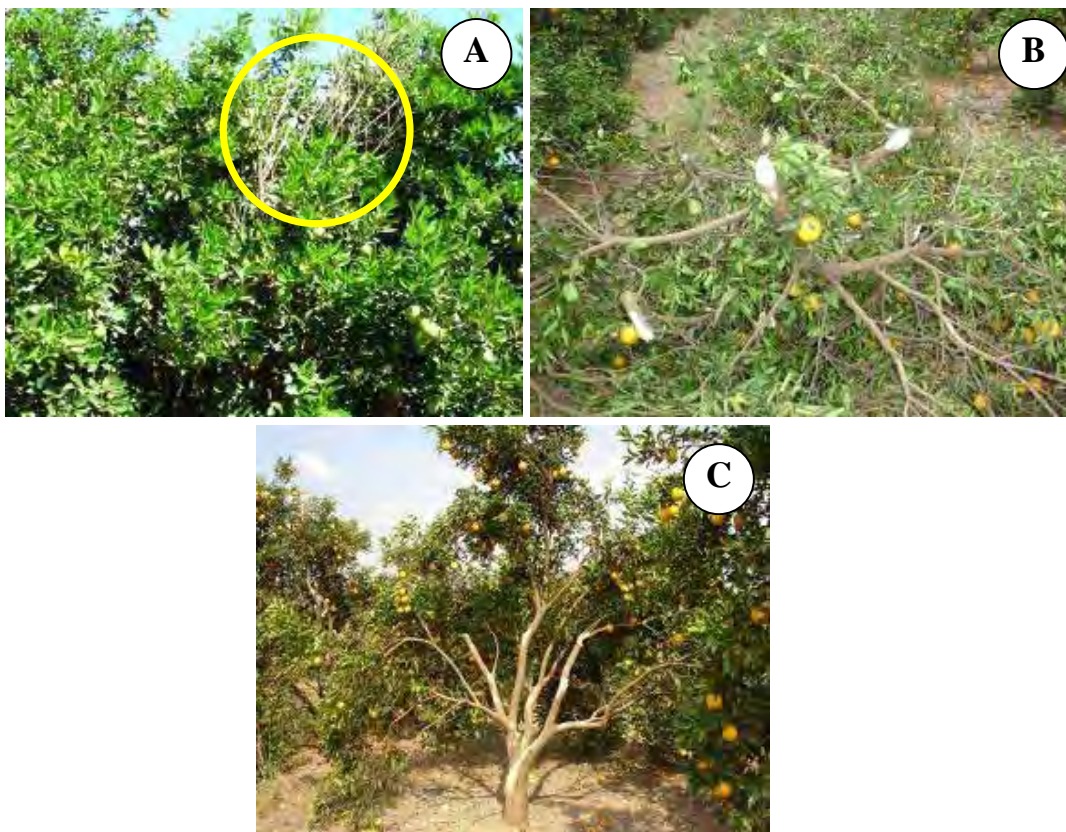


Figura 16. Vista geral de plantas de laranjeira 'Natal' apresentando: (A) galhos secos, ainda não podados; (B) galhos com sintomas de rubelose, podados e exibindo a presença de frutos removidos pela poda e; (C) aspecto da planta após a poda.

No ciclo de cultivo seguinte foram realizadas duas pulverizações com fungicidas cúpricos, em intervalos de 4 semanas, sendo a primeira na fase de $\frac{3}{4}$ de pétalas caídas. Posteriormente, após 35 dias da segunda pulverização com fungicida cúprico, foram realizadas duas pulverizações adicionais de carbendazim (0,25g/L) + mancozeb (0,80g/L) + óleo mineral a 0,5% (v/v), em intervalos de sete semanas. Neste ciclo, foram avaliados os seguintes tratamentos: (i) áreas podadas anteriormente, acompanhadas das pulverizações de fungicidas cúpricos e das combinações envolvendo fungicidas sistêmicos + protetores + óleo mineral; (ii) áreas não podadas anteriormente, acompanhadas das pulverizações de fungicidas cúpricos e das combinações de fungicidas sistêmicos + protetores + óleo mineral.

As avaliações realizadas foram incidência (número de frutos com sintomas de falsa melanose) e severidade (níveis de sintomas) avaliados mediante escala de notas adotada por Spósito et al. (2004) com modificação para sintomas de falsa melanose (Figura 17), a partir da qual foi determinado o índice de doença (ID), conforme a seguinte fórmula (Cirulli & Alexander, 1966):

$$ID = \sum((fv)/n) \text{ onde,}$$

f= número de frutos com determinado grau de infecção; v= grau de infecção, n= número total de frutos analisados.

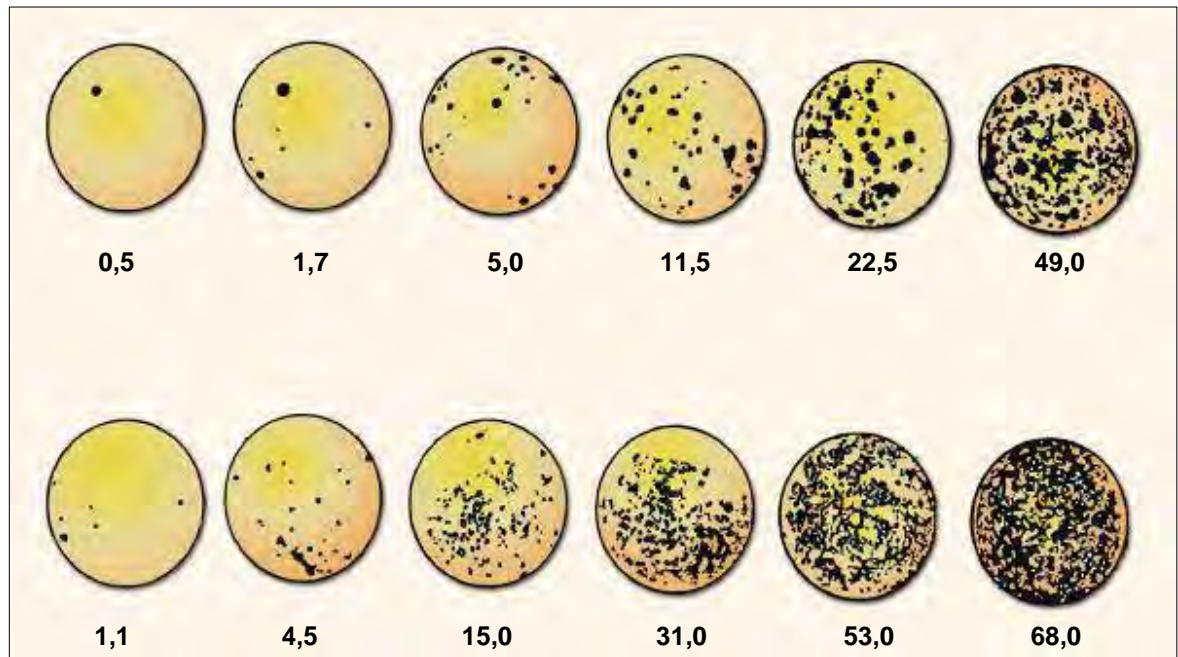


Figura 17. Escala diagramática para avaliação de severidade (%) de mancha preta dos citros (*Guignardia citricarpa*). A parte superior corresponde ao sintoma tipo mancha preta e a parte inferior aos sintomas do tipo falsa melanose (Spósito et al., 2004).

As avaliações, em número de 5, foram realizadas durante 5 meses consecutivos, nos dias 31/08, 13/09, 04/10, 23/10 e 22/11/2006. Para tal, foram avaliados 50 frutos em cada uma das 50 plantas previamente marcadas ao acaso, ao longo da linha de plantio, em plantas podadas em 2005, e procedimento semelhante para plantas que propositadamente não foram podadas em 2005.

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, com 2 tratamentos e 25 repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma planta. Para a análise estatística foi utilizado o programa ESTAT versão 2.0 e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

3.5. Avaliação a campo do efeito da presença do ácaro da falsa ferrugem na expressão de sintomas do tipo mancha trincada em frutos cítricos

Dentre os seis tipos de sintomas causados por *G. citricarpa*, inclui-se o designado mancha trincada (Figura 18), cujas manchas se mantêm restritas à superfície dos frutos, normalmente em pequeno número quando comparadas aos demais tipos de sintomas. Suspeita-se que tal sintoma esteja associado ao ataque e conseqüente sintomas resultantes do efeito do ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*). Porém, até o momento, não foi realizado nenhum estudo para a comprovação de tal hipótese.

Dessa forma, o presente trabalho foi conduzido com o intuito de se estabelecer, de forma indireta, a relação quanto à presença do ácaro da falsa ferrugem e conseqüente produção de sintomas típicos, e presença de sintomas do do tipo mancha trincada, conseqüente de infecções de *G. citricarpa*.

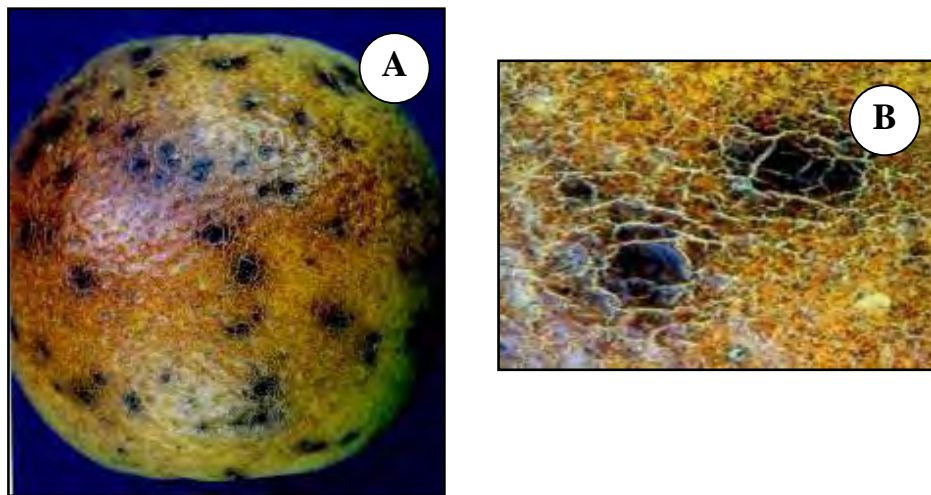


Figura 18. Fruto de laranja 'Folha Murcha' apresentando sintoma característico de mancha trincada. A - Vista superior e, B - detalhe parcial da mancha exibindo trincas e ausência de picnídios.

O presente trabalho foi implantado em propriedade localizada em Tambaú (SP), em pomar de laranjeira 'Valência', com aproximadamente 14 anos de idade, com histórico de forte ocorrência de frutos com sintomas de mancha trincada e forte bronzeamento resultante da infestação do ácaro da falsa ferrugem.

Na área avaliada, foram realizadas pulverizações com diferentes fungicidas, durante os anos de 2005-2006, em intervalos variados de acordo com a categoria dos fungicidas empregados. Na fase de $\frac{3}{4}$ de pétalas caídas, todas as plantas dos diferentes tratamentos receberam pulverizações com fungicida cúprico a 0,2% (p/v), a qual foi repetida 28 dias depois, porém acrescido de óleo mineral a 0,5% (v/v).

Os tratamentos avaliados foram: (i) T1 - aplicação de oxicleto de cobre (Recop[®]) a 0,2% (p/v) nas fases de $\frac{3}{4}$ de pétalas caídas e 4 semanas posteriores (X), e enxofre (Kumulus[®]) a 0,2% (p/v) na fase cujos frutos encontravam-se do tamanho de uma bola de "ping-pong"; (ii) T2 - X + tiofanato metílico (75mL p.c./100L água) + óleo mineral 0,5% (v/v); (iii) T3 - X + pyraclostrobin (15g p.c./100 L água) + óleo mineral 0,5% (v/v); (iv) T4 - X + pyraclostrobin (15g p.c./100L água) + mancozeb (100g p.c./100L) + óleo mineral 0,5%; (v) T5 - carbendazim (50 mL p.c./100L) + mancozeb (100g p.c./100L) + óleo mineral 0,5%; (vi) T6 - X + hidróxido de cobre (75g p.c./100L) + óleo mineral 0,5%). Enquanto que para o caso dos tratamentos onde foram usados fungicidas sistêmicos foram realizadas duas pulverizações específicas de controle de *G. citricarpa*, no tratamento o qual foi constituído de hidróxido de cobre, estas deram-se em número de 4, a cada 4 semanas, além das pulverizações prévias de florada.

As pulverizações foram realizadas através de pulverizador tratorizado dotado de pistola, empregando-se bicos de número 6, e vazão média de 9,8 litros por planta.

Usou-se delineamento de blocos ao acaso com 4 repetições, constituído de 3 plantas por parcela. As avaliações foram realizadas em 23/10, 22/11 e 15/12/2006, ocasião esta em que os frutos mostravam-se maduros, apresentando bom contrastes em termos de incidência e severidade dos sintomas oriundos de infecções de *G. citricarpa* e ataques do ácaro da falsa ferrugem. Para tal foram coletados 100 frutos ao acaso na planta central de cada parcela que, a partir dos mesmos foi determinada a incidência e severidade mediante escala de notas adaptada de Fagan & Goes (2000),

variando de 0 (ausência de sintomas) a 6 (sintomas severos), para os sintomas causados por *G. citricarpa* (Figura 19, com as devidas modificações por tratar-se de sintomas do tipo mancha trincada), enquanto que para o ácaro da falsa ferrugem usou-se a escala adotada por Oliveira et al. (1982), conforme ilustração apresentada na Figura 20. A partir de tais dados foi determinado o índice de doença (ID), para o caso das infecções causadas por *G. citricarpa* e o índice de danos (IDa), para o caso dos níveis de severidade oriundos do ataque de *P. oleivora*. A metodologia para tais procedimentos encontra-se no item 3.4, sendo empregada a fórmula ID (Índice de doença) = $\sum((fv)/n)$, ou IDa (Índice de danos) = $\sum((fv)/n)$, com os devidos ajustes para os casos de infecções de *G. citricarpa* ou danos oriundos de *P. oleivora*, respectivamente. Para a análise estatística foi utilizado o programa ESTAT versão 2.0 e as médias foram comparadas pelo teste de T.

Na avaliação, inicialmente procedeu-se a análise quanto aos sintomas do tipo mancha trincada. Posteriormente, os frutos enquadrados nas diferentes categorias foram reclassificados quanto aos níveis de sintomas em relação ao ácaro da falsa ferrugem.

Além das análises quantitativas, foram realizadas análises para verificar o nível de independência entre as variáveis dos sintomas causados pelo ácaro da falsa ferrugem e os do tipo mancha trincada. Para tanto, foi utilizado o programa estatístico SAS, cujo intuito foi estabelecer o índice Qi-Quadrado (χ^2), bem como suas probabilidades para verificar a provável dependência entre as variáveis analisadas.

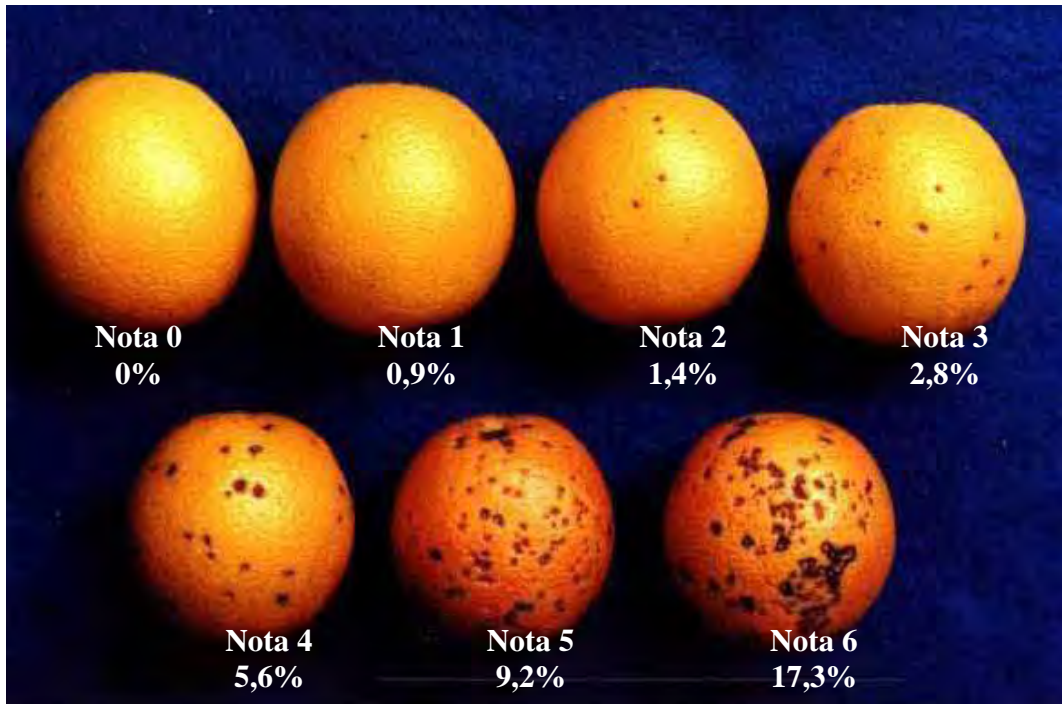


Figura 19. Escala diagramática de severidade de mancha preta em citros (% de área lesionada, utilizada para avaliação dos sintomas do tipo mancha dura, porém com ajustes para avaliação dos sintomas de mancha trincada. Fonte: Fagan & Goes (2000)



Figura 20. Escala diagramática para avaliação da severidade do ácaro da falsa ferrugem em frutos cítricos, conforme Oliveira et al. (1982).

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção do inóculo

4.1.1. Obtenção de conídios

Como descrito anteriormente, os isolados utilizados nos ensaios de germinação e inoculação foram obtidos a partir de culturas-estoque da micoteca do Departamento de Fitossanidade da UNESP/FCAV, a partir da transferência de culturas puras mantidas em óleo mineral para placas contendo meio de cultura BDA, seguido de incubação a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 30 dias.

4.1.2. Obtenção de pseudotécios e ascósporos

4.1.2.1. Obtenção de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* em folhas sintomáticas de laranjeira 'Pêra' mantidas em caixas Gerbox® e bandejas plásticas

Caixas Gerbox®

Os dados referentes à obtenção de pseudotécios de *G. citricarpa* a partir de folhas sintomáticas de laranjeira 'Pêra' mantidas em caixas Gerbox® encontram-se apresentados nas Figuras 21 e 22.

De acordo com os dados obtidos, observa-se que após 60 dias de incubação, houve maior produção de pseudotécios a 25°C , em relação a 20°C , tanto sob luz contínua, quanto em fotoperíodo alternado. Entretanto, de maneira geral, no tratamento de folhas mantidas sob luz contínua, observou-se maior produção de pseudotécios, quando comparada à exposição em ambiente de fotoperíodo alternado (Quadro 1; Figura 22).

Quadro 1. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em folhas de laranjeira 'Pêra' mantidas em caixas Gerbox® sob diferentes fotoperíodos e temperatura.

Tratamentos	Equações de regressão [^]	R ²	P
Fotoperíodo Alternado – 20°C	$y = 0,4313x - 0,294$	0,91	0,01 ^{ns}
Fotoperíodo Alternado – 25°C	$y = 0,4551x - 0,235$	0,85	0,01 ^{ns}
Fotoperíodo Contínuo – 20°C	$y = 0,4828x - 0,327$	0,88	0,05*
Fotoperíodo Contínuo – 25°C	$y = 0,6579x - 0,4722$	0,94	0,05*

[^]Dados transformados em log (x+1)

Y = produção média de pseudotécios; x = período de incubação

*P≥0,05 (significativo a 5%); ns=não significativo

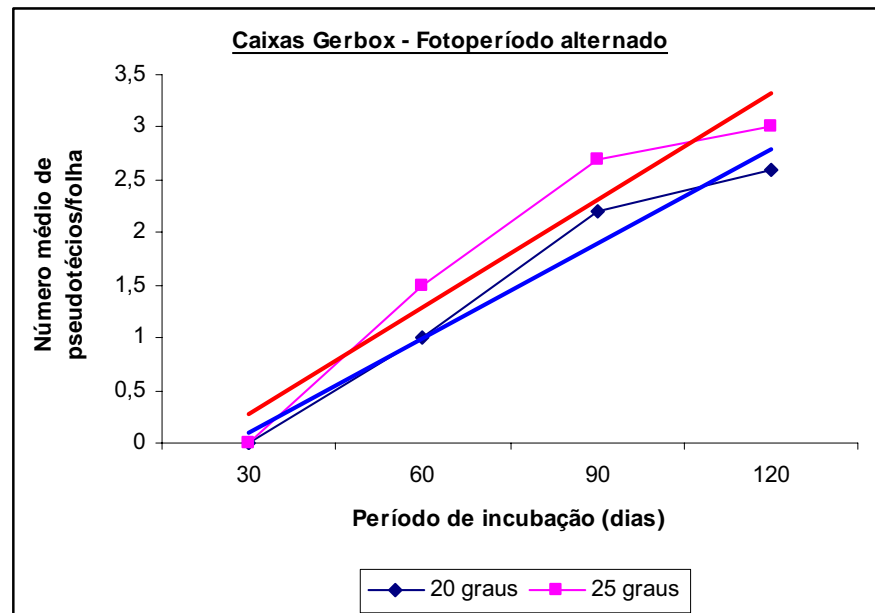


Figura 21. Curva de regressão da produção de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* em folhas sintomáticas de laranjeira 'Pêra', mantidas em caixas Gerbox®, a 20°C e 25°C, sob fotoperíodo alternado de 12 horas luz/12 horas escuro, após 30, 60, 90 e 120 dias de incubação.

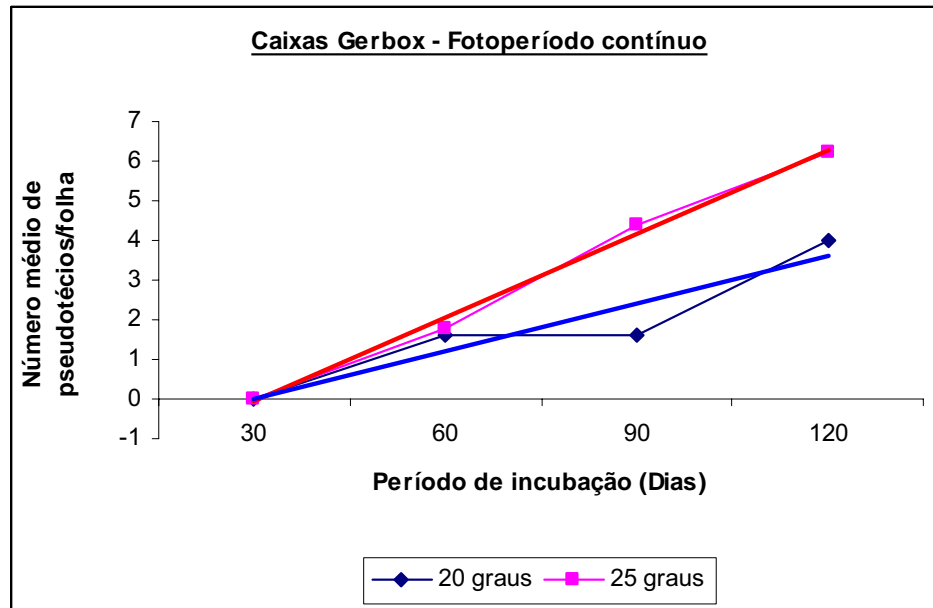


Figura 22. Curva de regressão de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* em folhas sintomáticas de laranjeira 'Pêra', mantidas em caixas Gerbox®, a 20°C e 25°C, sob fotoperíodo de luz contínua, após 30, 60, 90 e 120 dias de incubação.

Do ponto de vista prático, observou-se que, quanto maior foi o período de incubação das folhas em caixas Gerbox®, à temperatura de 25°C, independente da luminosidade (contínua ou alternada), houve maior produção de pseudotécios, do que quando comparado à exposição das folhas à temperatura de 20°C. Esses resultados, ainda que a produção das estruturas reprodutivas obtidas tenham sido em número aquém dos desejáveis, constituem-se em informações relevantes a estudos adicionais que poderão advir e, que, uma vez os objetivos tenham sido alcançados na sua plenitude, serão importantes para os vários estudos que se fazem necessários, incluindo-se os relacionados à epidemiologia e estudos genéticos.

Bandejas plásticas

No ensaio com folhas assintomáticas de laranjeira 'Pêra' mantidas em bandejas plásticas, observou-se a presença de pseudotécios nas folhas após 30 dias de

incubação. Entretanto, o maior número de estruturas reprodutivas foi observado aos 60 dias de incubação, a 25°C, sob condições de luz contínua e alternância de molhamento/secamento (Quadro 2; Figura 23). Diferentemente do ensaio com folhas armazenadas em caixas Gerbox®, sob luz alternada, as folhas mantidas em bandejas apresentaram maior número de pseudotécios. Assim como no ensaio utilizando caixas Gerbox®, os ascósporos observados apresentavam-se imaturos.

Quadro 2. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em folhas de laranjeira 'Pêra' mantidas em bandejas plásticas sob diferentes fotoperíodos.

Tratamentos	Equações de regressão [^]	R ²	P
Fotoperíodo contínuo	$Y = 0,8319x - 0,752$	0,98	0,05*
Fotoperíodo alternado	$Y = 0,602x - 0,515$	0,95	0,01

[^]Dados transformados em log (x+1)

y = produção média de pseudotécios; x = período de incubação

*P_≥0,05 (significativo a 5%); ns=não significativo

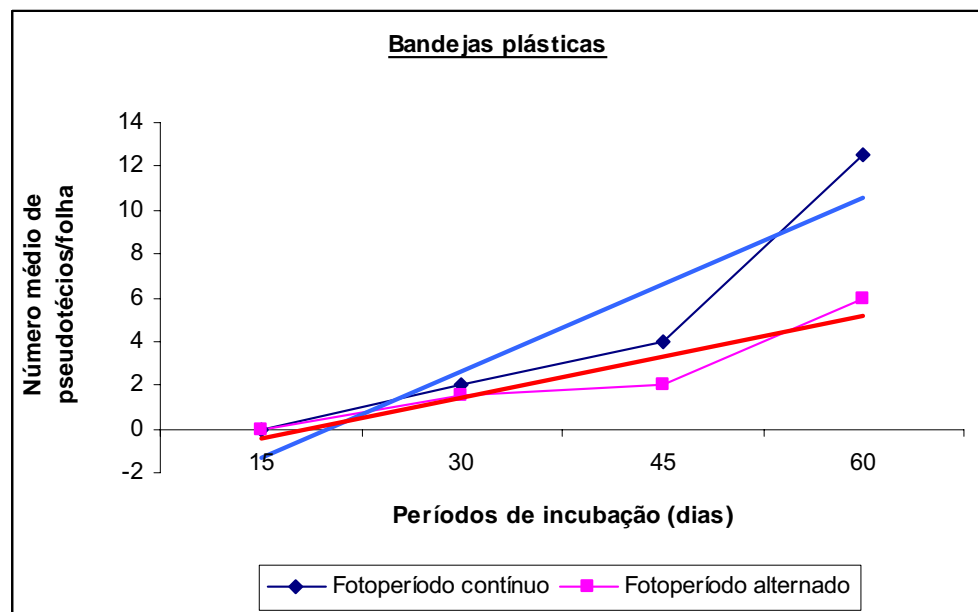


Figura 23. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em folhas sintomáticas de laranjeira 'Pêra' mantidas em bandejas plásticas sob condições de temperatura ambiente, fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro) e alternância de secamento/molhamento, após 15, 30, 45 e 60 dias de incubação.

No que se refere à obtenção de estruturas reprodutivas de *G. citricarpa*, independentemente do método testado, seja de caixas Gerbox® ou bandejas plásticas utilizadas para o armazenamento de folhas, uma melhor produção foi atingida nas condições de temperatura a 25°C e fotoperíodo de luz contínua.

4.1.2.2. Obtenção de estruturas reprodutivas de *Guignardia citricarpa* em folhas assintomáticas de laranjeiras ‘Pêra’ e ‘Valência’ inoculadas com discos de colônia

De acordo com os dados obtidos, observou-se baixa produção de pseudotécios em todos os tratamentos cujas folhas foram termicamente esterilizadas por diferentes períodos, sem diferenciação quanto à variedade de laranjeira utilizada. Não obstante a baixa produção de pseudotécios obtidos, o maior número foi obtido aos 60 dias de incubação, para laranjeira ‘Valência’, no tratamento de esterilização por 90 minutos, independente do fotoperíodo avaliado. Entretanto, nesta condição não foi constatada a presença de ascósporos de *G. citricarpa* (Quadro 3 e Figura 27).

Em termos práticos, ainda que a produção das estruturas obtidas tenha sido baixa, há indícios de que a otimização da obtenção das mesmas poderá ser alcançada mediante a inoculação de folhas, seguido posteriormente de exposição a condições de luz contínua.

Quadro 3. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em folhas de laranjeira ‘Pêra’ e ‘Valência’ sob diferentes períodos de esterilização.

Tratamentos	Equações de regressão [^]	R ²	P
Laranjeira ‘Pêra’ - Fotoperíodo contínuo (1h)	y = 0,5298x-0,35	0,92	0,01 ^{ns}
Laranjeira ‘Pêra’ - Fotoperíodo alternado (1h)	y = 0,3766x-0,44	0,98	0,03 ^{ns}
Laranjeira ‘Pêra’ - Fotoperíodo contínuo (90min.)	y = 0,5234x-0,46	0,99	0,01 ^{ns}
Laranjeira ‘Pêra’ - Fotoperíodo alternado (90min.)	y = 0,4564x-0,35	0,96	0,01 ^{ns}
Laranjeira ‘Valência’ - Fotoperíodo contínuo (1h)	y = 0,4629x-0,23	0,84	0,01 ^{ns}
Laranjeira ‘Valência’ - Fotoperíodo alternado (1h)	y = 0,3701x-0,20	0,85	0,03 ^{ns}
Laranjeira ‘Valência’ - Fotoperíodo contínuo (90min.)	y = 0,6777x-0,41	0,90	0,05*
Laranjeira ‘Valência’ - Fotoperíodo alternado (90min.)	Y = 0,5298x-0,35	0,92	0,01 ^{ns}

[^]Dados transformados em log (x+1)

y = produção média de pseudotécios; x = período de incubação

*P_≥0,05 (significativo a 5%); ns=não significativo

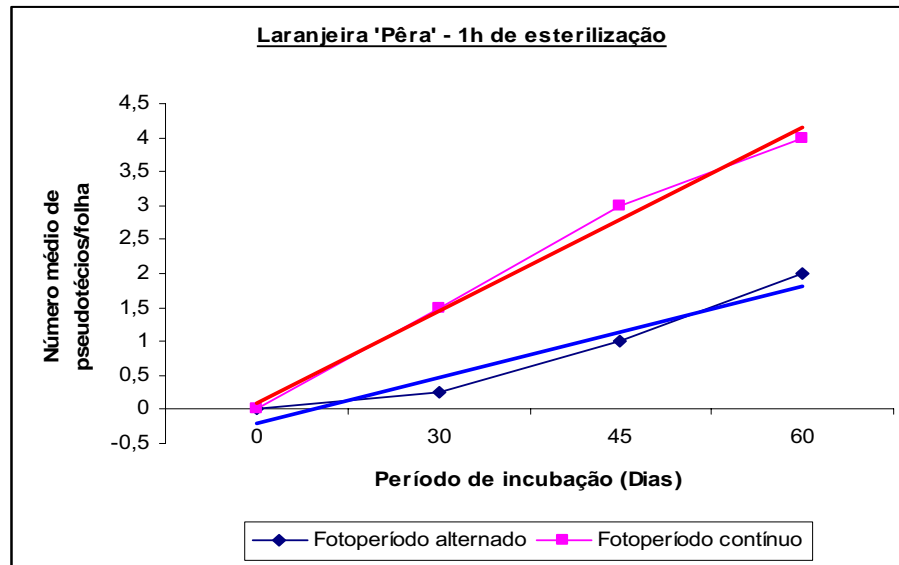


Figura 24. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* presentes em folhas assintomáticas de laranjeira 'Pêra' submetidas a 1 hora de esterilização por autoclavagem, após 0, 30, 45 e 60 dias de inoculação, mantidos à temperatura de 25°C, alternância de luz e de períodos de molhamento/secamento ao ambiente natural por 15 dias (luz solar).

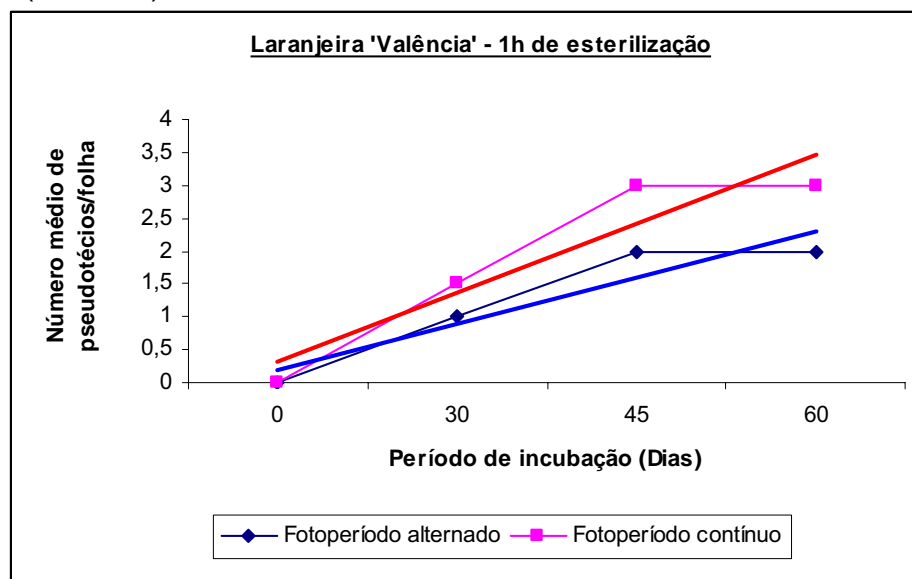


Figura 25. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* presentes em folhas assintomáticas de laranjeira 'Valência' submetidas a 1 hora de esterilização por autoclavagem, após 0, 30, 45 e 60 dias de inoculação, mantidos à temperatura de 25°C, alternância de luz e de períodos de molhamento/secamento ao ambiente natural por 15 dias (luz solar).

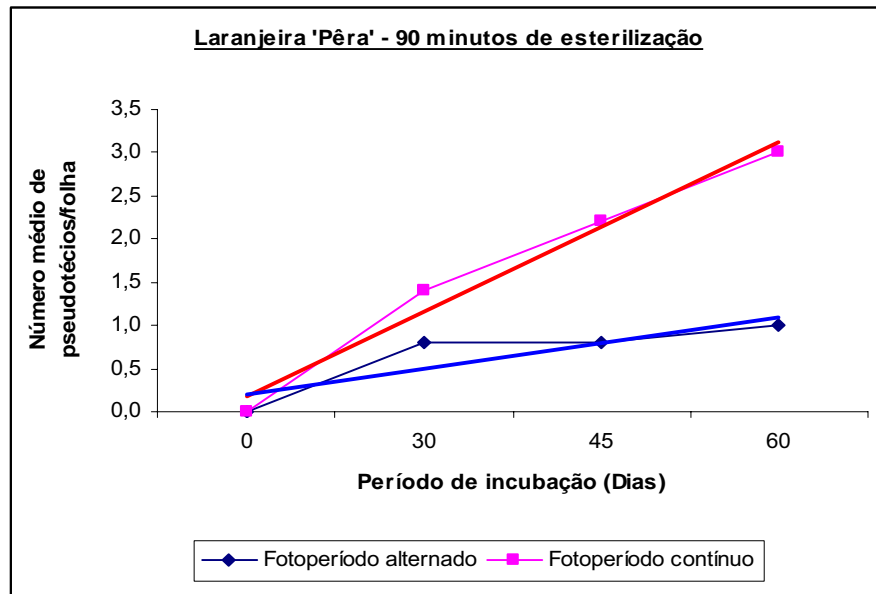


Figura 26. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* presentes em folhas assintomáticas de laranjeira 'Pêra' submetidas a 90 minutos de esterilização por autoclavagem, após 0, 30, 45 e 60 dias de inoculação, mantidos à temperatura de 25°C, alternância de luz e de períodos de molhamento/secamento ao ambiente natural por 15 dias (luz solar).

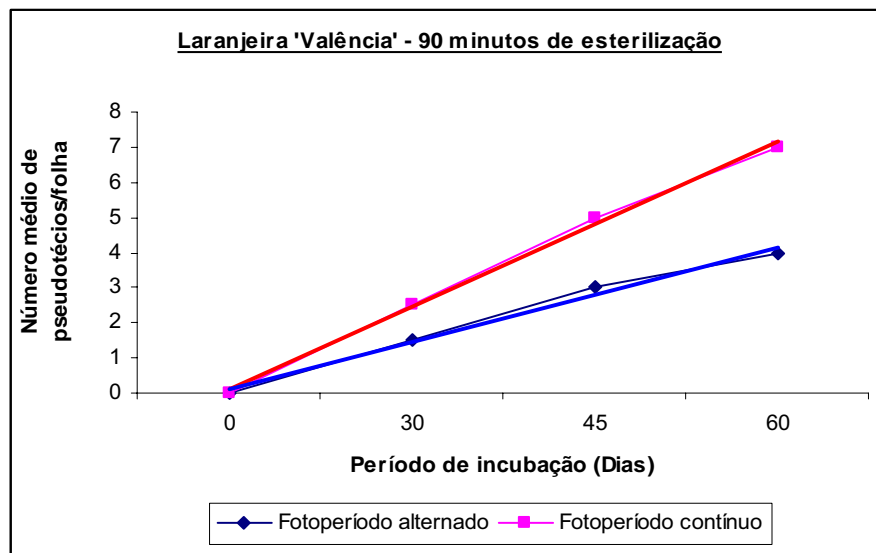


Figura 27. Curva de regressão do número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* presentes em folhas assintomáticas de laranjeira 'Valência' submetidas a 90 minutos de esterilização por autoclavagem, após 0, 30, 45 e 60 dias de inoculação, mantidos à temperatura de 25°C, alternância de luz e de períodos de molhamento/secamento ao ambiente natural por 15 dias (luz solar).

4.1.2.3. Obtenção de ascósporos de *Guignardia citricarpa* em discos de folha de laranjeira 'Pêra' e estudo da influência de métodos de esterilização de discos foliares na produção de ascósporos

Em relação à produção de pseudotécios em discos foliares mantidos em meio de cultura ágar-água (AA), observou-se que, aproximadamente 14 dias após a deposição dos discos, a presença de picnídios e outras estruturas, morfológicamente semelhantes aos pseudotécios que, ao longo do tempo evoluíram para a sua conformação definitiva, sendo formadas em maior número aos 63 dias de incubação, cuja diferença numérica em relação aos 56 dias de incubação foi muito pequena (Figura 28). A partir de tais estruturas foi observada a presença de ascósporos após 49 dias de incubação das placas a 25°C e fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro (Figura 29).

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que, a partir de 35 dias de incubação, a produção de pseudotécios apresenta um incremento, aspecto a ser considerado quando da utilização em ensaios de inoculação.

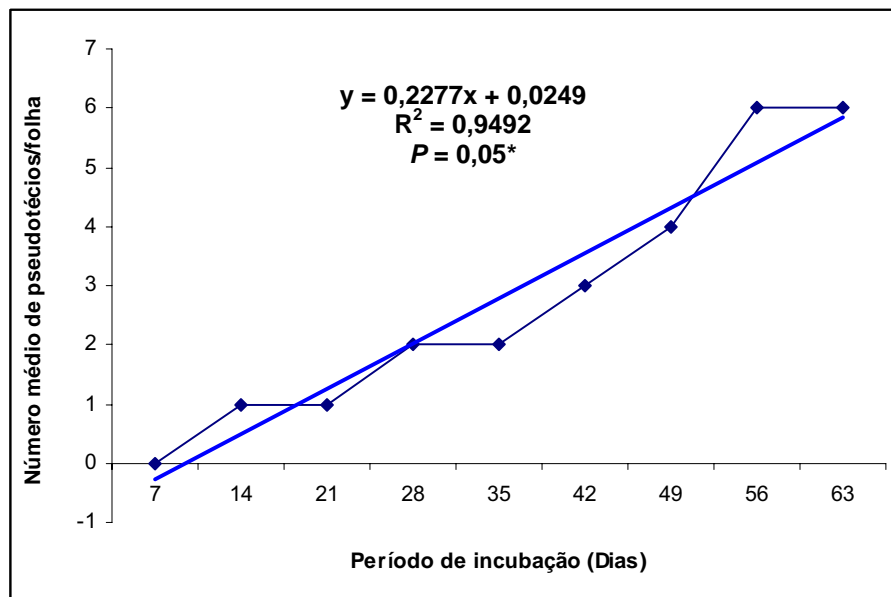


Figura 28. Curva de regressão e equação do número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* presentes em discos foliares de laranjeira 'Pêra' depositados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA) e mantidos em estufas para B.O.D. a 25°C ± 1°C e fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro). Dados transformados em log (x+1).

Ao término das avaliações, aos 63 dias de incubação, após o esmagamento dos pseudotécios foi observada nos discos foliares colonizados, em lâminas contendo corante azul lático, a presença dos ascósporos produzidos (Figura 30). Ainda que as diferenças metodológicas tenham sido muito expressivas, resultados semelhantes foram obtidos por Aguilar-Vildoso (1996), o qual induziu a produção de pseudotécios de *G. citricarpa* pela adição de fragmentos de tecido foliar de plantas como *Eucaliptus*, milho e citros em meio ágar-água.

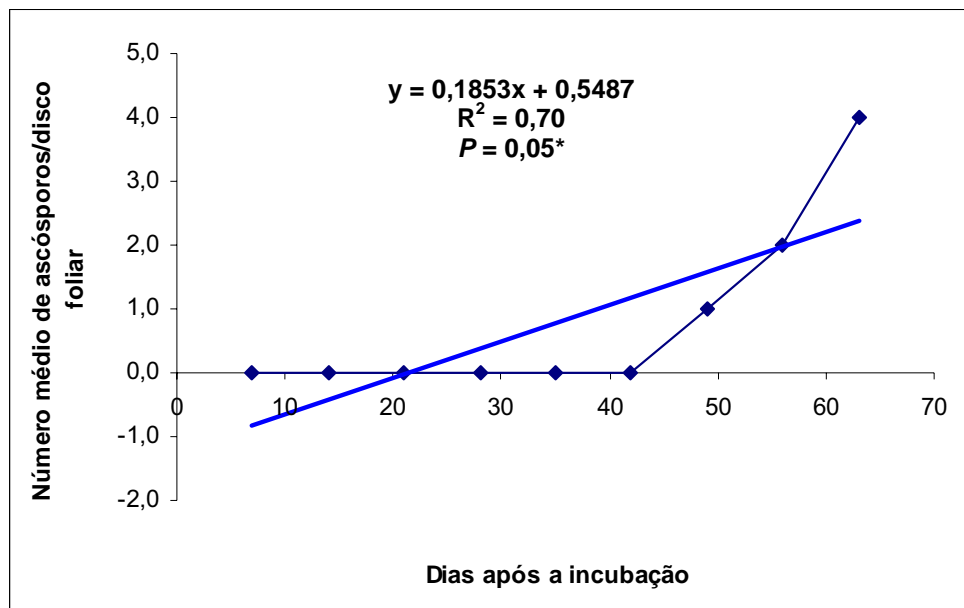


Figura 29. Curva de regressão e equação do número médio de ascósporos de *Guignardia citricarpa* produzidos em discos foliares de laranjeira 'Pêra' depositados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA), incubados em estufas para B.O.D. a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sob fotoperíodo alternado (12 horas luz/12 horas escuro). Dados transformados em $\log(x+1)$.

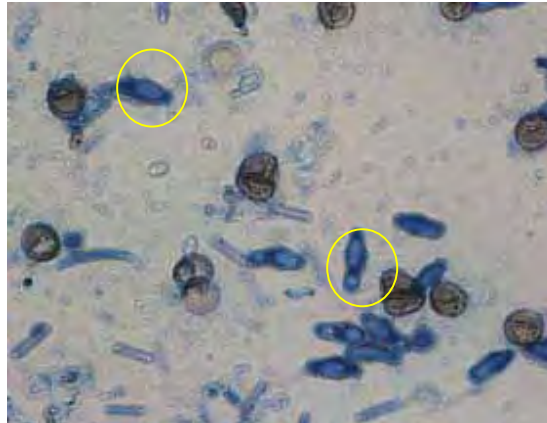


Figura 30. Ascósporos de *Guignardia citricarpa* produzidos em discos foliares de laranjeira 'Pêra' mantidos em meio de cultura ágar-água (AA) e observados em lâminas de vidro ao microscópio fotônico, aumento de 40x, após 63 dias de incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo alternado (12 horas luz/12 horas escuro).

Em relação ao ensaio de esterilização dos discos foliares através de autoclavagem, observou-se que quando essa foi realizada previamente à sua deposição no meio de cultura, o fungo apresentou crescimento micelial abundante, em todas as direções sobre o meio de cultura, e produção de pseudotécios sobre a superfície dos discos, porém, não no meio de cultura. O início da produção de pseudotécios nos discos foliares autoclavados foi observado a partir de 28 dias de incubação. No caso de discos não autoclavados, o crescimento da colônia do fungo foi inferior ao tratamento de autoclavagem dos discos foliares, apresentando desenvolvimento lento e menor produção de ascósporos (Figura 31), demonstrando a significância dos tratamentos testados.

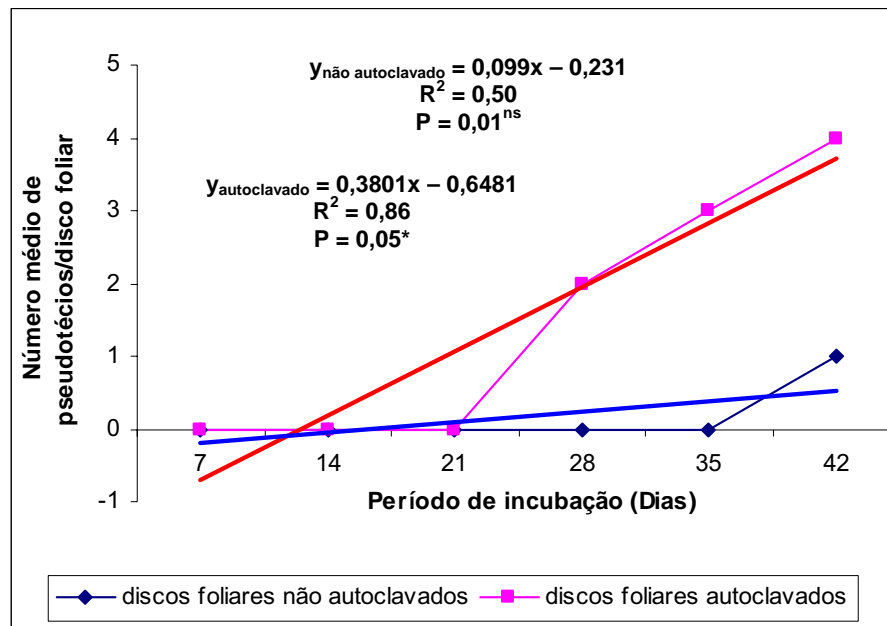


Figura 31. Curvas de regressão e equações do número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em discos foliares de laranjeira 'Pêra' submetidos a diferentes tratamentos de esterilização (autoclavagem e sem autoclavagem), depositados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA), com discos de colônia fúngica e incubados em estufas para B.O.D. a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro), durante diferentes períodos de incubação.

Trabalhos semelhantes, com o intuito da obtenção de ascósporos de *G. citricarpa* foram exaustivamente realizados por Timossi et al. (2003), os quais, dentre outros estudos, avaliaram a influência da temperatura e luminosidade sobre a produção de pseudotécios em discos foliares de limoeiro 'Cravo' autoclavados e depositados em meio ágar-água 2% (AA), acompanhados da deposição de discos de colônia de *G. citricarpa*. Em tal trabalho, os autores verificaram que a produção de pseudotécios foi possível mediante a deposição dos discos foliares e de colônia em meio AA submetidos a temperatura de 27°C e fotoperíodo de luz contínua. Em estudo adicional, os autores observaram que o percentual de germinação de ascósporos apresentou aumento gradativo, a medida que o tempo de incubação foi estendido.

A obtenção de estruturas reprodutivas de *G. citricarpa* foi também obtida por Moran Lemir et al. (2000), os quais, mediante a deposição de suspensão de esporos e micélio em meio de cultura acrescido de extrato de folhas de limão e malte obtiveram grande produção de ascósporos, os quais mostravam-se viáveis e patogênicos, comprovado mediante testes de patogenicidade. Entretanto, estudos semelhantes realizados no Brasil, usando metodologia semelhante e, em repetidas ocasiões, os resultados foram infrutíferos (A. de Goes, Fevereiro de 2006, informações pessoais).

Para o caso de alguns fungos da divisão Ascomycota, Alexopoulos et al. (2004) e Taylor et al. (2006) explicam a razão da dificuldade de obtenção das estruturas reprodutivas em condições laboratoriais. Segundo esses autores, nestes casos, as culturas do fungo apresentam talo sexualmente auto-estéril, não reproduzindo sexualmente por si mesmo, sem auxílio de outro talo, caracterizando-se numa situação de heterotalismo. Em razão deste fato, a provável explicação quanto à dificuldade na obtenção destas estruturas reprodutivas em condições controladas, deve-se à necessidade da presença de talos geneticamente competentes para a compatibilização sexual. Entretanto, novas metodologias devem ser testadas, visto que, em trabalhos realizados por Vailancourt & Hanau (1991), foi observado que um isolado homotático de *Colletotrichum graminicola*, em milho, originou tanto progênies homotáticas quanto heterotáticas, mostrando seu potencial de variabilidade genética e de compatibilidade sexual. Portanto, não se pode ignorar tal possibilidade em *G. citricarpa*, não obstante as grandes diferenças existentes entre tais fungos.

4.1.2.4. Obtenção de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* em folhas de laranjeira 'Pêra' destacadas e submetidas a diferentes tratamentos térmicos

De acordo com os resultados obtidos no ensaio, pode-se observar que a produção de pseudotécios de *G. citricarpa* teve início aos 30 dias após a realização dos diferentes tratamentos térmicos nas folhas, seguido da sua exposição às condições de ambiente externo natural (luz solar direta). Independentemente do tempo de imersão e da

temperatura da água no qual foram imersas as folhas, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Quadros 4 e 5).

Quadro 4. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em folhas de laranjeira 'Pêra' submetidas a diferentes tratamentos térmicos (temperaturas variadas) por 1 minuto.

Tratamentos	Equações de regressão	R ²	P
Testemunha (imersão em água a T ^a ambiente)	$y = 6,0191\text{Ln}(x) - 1,7823$	0,57	0,01 ^s
Folhas imersas a 25°C	$y = 3,2901\text{Ln}(x) + 0,136$	0,92	0,03 ^{ns}
Folhas imersas a 30°C	$y = 17,385\text{Ln}(x) - 2,5628$	0,88	0,05*
Folhas imersas a 40°C	$y = 26,149\text{Ln}(x) - 4,0254$	0,85	0,05*

y = número médio de pseudotécios produzidos; x = tempo de incubação
*P≥0,05 (significativo a 5%); ns=não significativo

Quadro 5. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em folhas de laranjeira 'Pêra' submetidas a diferentes tratamentos térmicos (temperaturas variadas) por 5 minutos.

Tratamentos	Equações de regressão	R ²	P
Testemunha (imersão em água a T ^a ambiente)	$y = 2,7291\text{Ln}(x) - 0,9183$	0,43	0,03 ^{ns}
Folhas imersas a 25°C	$y = 10,525\text{Ln}(x) - 0,862$	0,96	0,01 ^{ns}
Folhas imersas a 30°C	$y = 32,153\text{Ln}(x) - 6,0457$	0,77	0,05*
Folhas imersas a 40°C	$y = 51,612\text{Ln}(x) - 12,257$	0,71	0,05*

Y = produção média de pseudotécios; x = tempo de incubação
*P≥0,05 (significativo a 5%); ns=não significativo

A maior produção de pseudotécios de *G. citricarpa*, deu-se no tratamento de imersão das folhas em água com temperatura de 40°C a 5 minutos (Figuras 32 e 33). Por outro lado, quando em temperaturas inferiores, a 25°C e 30°C, a formação de pseudotécios deu-se em menor número.

Considerando-se que, sob condições naturais a formação/produção de pseudotécios, e conseqüente liberação dos ascósporos se dão a partir de folhas cítricas caídas ao chão e em fases iniciais de decomposição, pressupõe-se que, no presente caso, a temperatura de 40°C possivelmente afetou a estrutura física das folhas e alterou

a composição nutricional das mesmas, tornando o substrato mais pobre, servindo de estímulo à formação das estruturas reprodutivas de *G. citricarpa*.

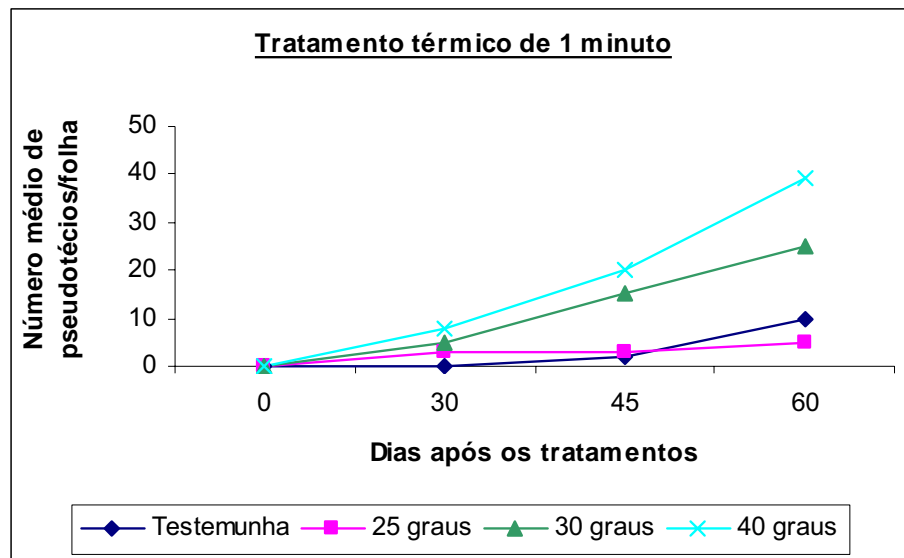


Figura 32. Número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em folhas de laranjeira 'Pêra' submetidas a diferentes tratamentos térmicos (temperaturas variadas) por 1 minuto após 30, 45 e 60 dias de incubação.

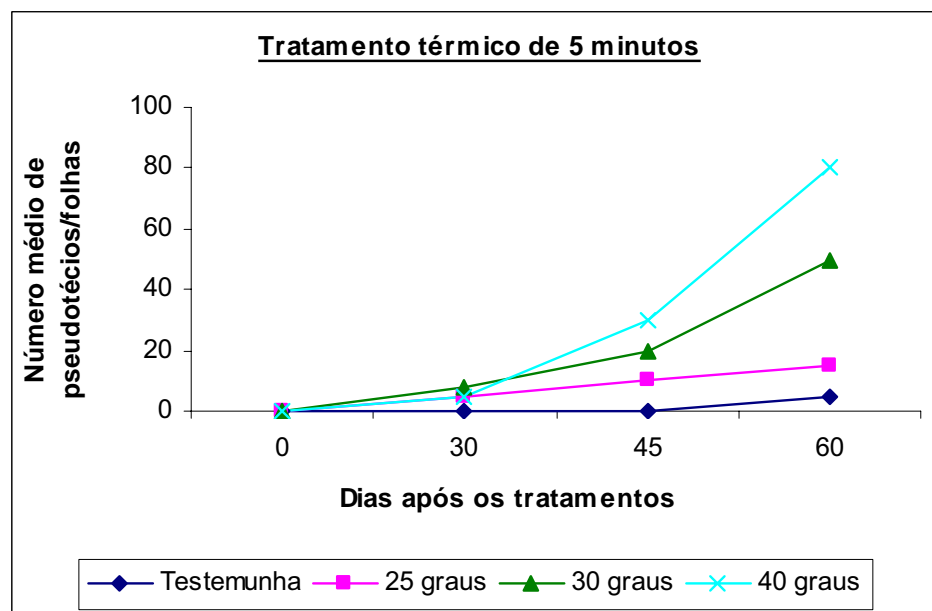


Figura 33. Número médio de pseudotécios de *Guignardia citricarpa* produzidos em folhas de laranjeira 'Pêra' submetidas a diferentes tratamentos térmicos (temperaturas variadas) por 5 minutos aos 0, 30, 45 e 60 dias de incubação.

Considerando-se as metodologias testadas quanto à produção de ascósporos *in vitro*, os resultados mostraram-se positivos, porém estudos mais detalhados referentes aos processos e demais metodologias fazem-se necessários, objetivando a viabilização da produção massal destas estruturas, em menor período de tempo, com vistas à realização de estudos adicionais cuja a produção dos mesmos se faça necessário.

4.2. Ensaio de germinação *in vitro* de conídios de *Phyllosticta citricarpa*

4.2.1. Avaliação de germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em meio de cultura e folhas cítricas sob diferentes períodos de incubação

Em meio de cultura

No presente estudo, onde foram avaliados o efeito de dois diferentes meios de cultura (ágar-água e ágar-dextrose) e duas condições diferentes de fotoperíodo (contínuo de 24h de luz e alternado de 12h luz/12h escuro) na taxa de germinação de conídios de *P. citricarpa*, constatou-se significância entre os tratamentos avaliados, cujas equações de regressão obtidas encontram-se apresentadas no Quadro 6.

No período de 4 horas de incubação, não foi observada a presença de conídios germinados, fato este observado apenas a partir de 8 horas, com ligeiro aumento por volta das 20-24 horas, mantendo-se constante até às 48 horas, com valores aproximados de 2-5% de germinação. Até este período, a porcentagem de germinação foi praticamente semelhante para os dois meios de cultura e condições de fotoperíodo avaliados, porém, decorrido 72 horas de incubação, em fotoperíodo de luz contínua, verificou-se um aumento significativo na porcentagem de germinação dos conídios contidos no meio de cultura ágar-dextrose, quando foi observado 25% de conídios germinados (Figuras 34 e 35).

Quadro 6. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes ao número de conídios de *Phyllosticta citricarpa* germinados em lâminas contendo diferentes meios de cultura, sob dois diferentes fotoperíodos.

Tratamentos	Equações de regressão [^]	R ²	P
Meio AA – Fotoperíodo alternado	$y = 0,1805x + 0,2199$	0,69	0,01 ^{ns}
Meio AA – Fotoperíodo contínuo	$y = 0,2185x + 0,2113$	0,72	0,02 ^{ns}
Meio AD – Fotoperíodo alternado	$y = 0,1926x + 0,468$	0,61	0,05*
Meio AD – Fotoperíodo contínuo	$y = 0,2046x + 0,5605$	0,61	0,05*

[^]Dados transformados em log (x+1)

y = produção média de pseudotécios; x = período de incubação

*P_≥0,05 (significativo a 5%); ns=não significativo

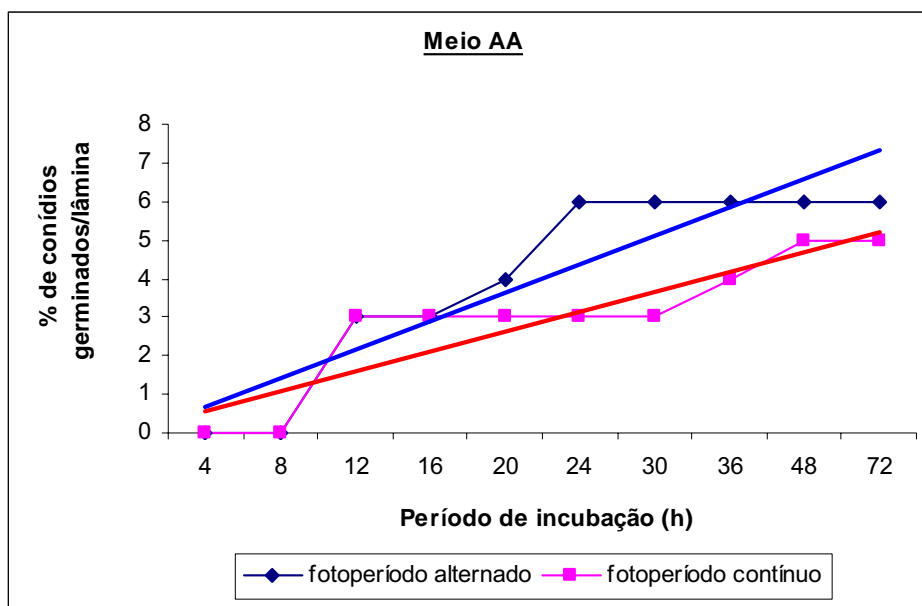


Figura 34. Curva de regressão da germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em meio de cultura ágar-água (AA), a 25°C, sob duas condições de fotoperíodo (alternado 12h luz/12h escuro e luz contínua). Dados transformados em log (x+1).

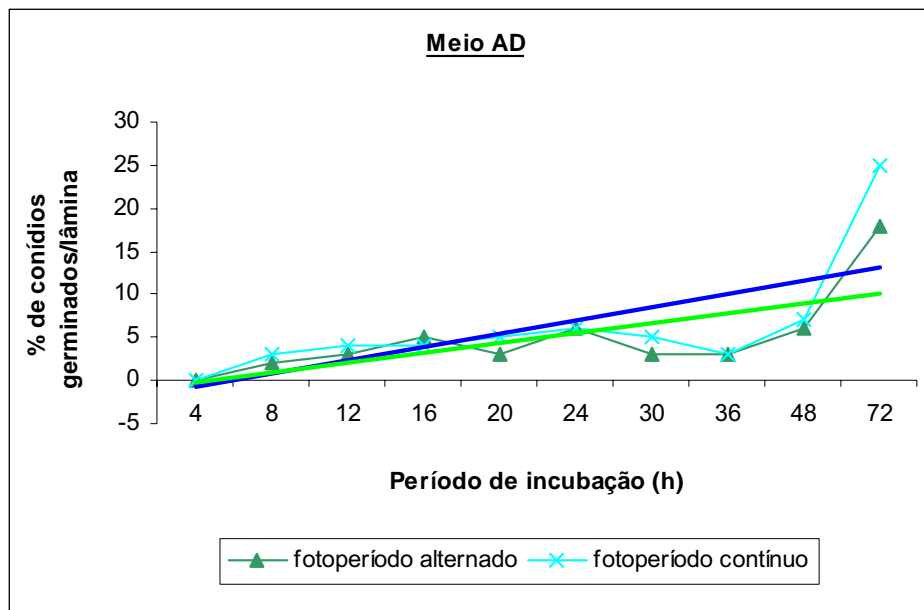


Figura 35. Curva de regressão da germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em meio de cultura ágar-dextrose (AD) mantidos a 25°C sob duas condições de fotoperíodo (alternado 12h luz/12h escuro e luz contínua). Dados transformados em $\log(x+1)$.

Em folhas

Nos diferentes tratamentos avaliados, observou-se nível de significância para as variáveis analisadas (Quadro 7). A germinação dos conídios ocorreu independentemente do estágio de desenvolvimento das folhas, sendo o seu início verificado a partir de 8 horas de incubação (Figuras 36, 37 e 38), independente da concentração avaliada, em folhas fisiologicamente jovens e maduras, cujo índice situou-se em torno de 2-5%. A partir de 20h de incubação, em folhas adultas, e empregando uma maior concentração de suspensão (10^5 conídios/mL), constatou-se pequeno aumento da taxa de germinação, em relação aos demais tratamentos, porém sem alcançar níveis estatisticamente significativos. De forma semelhante, foram verificados aumentos da taxa de germinação entre 44h e 68h, quando da utilização de suspensão de conídios na maior concentração, em todas as idades de folha testadas. A maior germinação de

conídios, independente da concentração testada, para todas as idades de folha, foi observada às 72h de incubação (Figura 39).

Os resultados obtidos no presente trabalho quanto à baixa germinação de conídios mostram-se coerentes aos resultados obtidos por Mendes et. al. (2005), os quais verificaram que essa taxa foi muito baixa. Tais resultados, mostram-se convergentes àqueles obtidos por Gonzáles-Jaime et al. (2005), os quais verificaram que os maiores índices de germinação deram-se em folhas fisiologicamente maduras, quando comparadas com folhas de idade intermediária e folhas jovens. A germinação sobre as folhas jovens constitui-se em indicação de que tais estruturas podem, teoricamente, desenvolver-se nas mesmas, penetrar nos tecidos e, formar infecções quiescentes.

Neste ensaio de germinação em folhas, de maneira geral essa se deu em níveis muito baixos, principalmente quando comparada a outros fungos fitopatogênicos, os quais, às vezes, atingem cerca de 90% após 16 horas de incubação, como no caso de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos (DeNadai, 2003). Essa baixa germinação observada no caso de *P. citricarpa*, aparentemente se deve à presença de substâncias mucilaginosas contidas exogenamente nos conídios, as quais servem como proteção contra a dessecação das estruturas do fungo (Nicholson & Moraes, 1980), proteção contra compostos fenólicos (Nicholson et al., 1986, 1989), armazenamento de enzimas importantes durante a penetração (Ramados et al., 1985; Snyder et al., 1991) e, principalmente, como auto-inibidores da germinação (Leite & Nicholson, 1992). Tais mucilagens, também têm função na adesão (Nicholson & Epstein, 1991), favorecendo a penetração do fungo nos tecidos da planta. De acordo com Leite et al. (2001), sabe-se que essas, na maior parte das vezes, são constituídas por proteínas e glicoproteínas. O próprio incremento havido na taxa de germinação, após 40 horas de incubação, constitui-se em alicerce às pressuposições apresentadas. Também, aspectos intrínsecos do fungo, ou, ainda, à degradação química dos inibidores não podem ser subestimados. Embora fungos do gênero *Colletotrichum* também apresentem substâncias mucilaginosas, as diferenças nos níveis de germinação certamente se devem às características peculiares de cada

um dos gêneros, não obstante as implicações apontadas anteriormente possam ser aplicadas aos mesmos, às vezes, de forma semelhante.

Tais resultados apresentam grande significado prático já que, sob condições normais, o tempo de exposição de folhas jovens é menor do que aquele contendo folhas maduras o que, do ponto de vista epidemiológico pode beneficiar o patógeno no seu processo de sobrevivência. Além disso, embora os ascósporos possam aleatoriamente atingir tecidos de diferentes idades, fato este também possível pelos conídios, na maioria das vezes, essas estruturas apresentam maiores chances de atingir folhas maduras, quando da sua dispersão pela água da chuva, orvalho ou irrigação.

Quadro 7. Equações de regressão e coeficiente de determinação obtidos através do desdobramento dos graus de liberdade correspondentes à germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa*, em diferentes concentrações, em folhas de laranjeira 'Valência' em diferentes estádios de desenvolvimento foliar.

Tratamentos	Equações de regressão	R ²	P
FN – 10 ³ conídios/mL	Y = 0,1769x-0,2276	0,69	0,10 ^{ns}
FN – 10 ⁴ conídios/mL	Y = 0,1146x+0,5054	0,34	0,06 ^{ns}
FN – 10 ⁵ conídios/mL	Y = 0,3088x - 0,1762	0,85	0,04*
FJ – 10 ³ conídios/mL	y = 0,1383x - 0,1044	0,52	0,10 ^{ns}
FJ – 10 ⁴ conídios/mL	y = 0,133x + 0,5171	0,42	0,06 ^{ns}
FJ – 10 ⁵ conídios/mL	y = 0,1733x + 0,5305	0,47	0,03*
FM – 10 ³ conídios/mL	y = 0,1969x - 0,6238	0,70	0,06 ^{ns}
FM – 10 ⁴ conídios/mL	y = 0,2913x - 0,2785	0,75	0,01*
FM – 10 ⁵ conídios/mL	y = 0,1795x + 0,2939	0,42	0,01*

[^]Dados transformados em log (x+1)

Y = número de conídios germinados; x = tempo (dias)

*P≤0,05 (significativo a 5% pelo teste de Tukey)

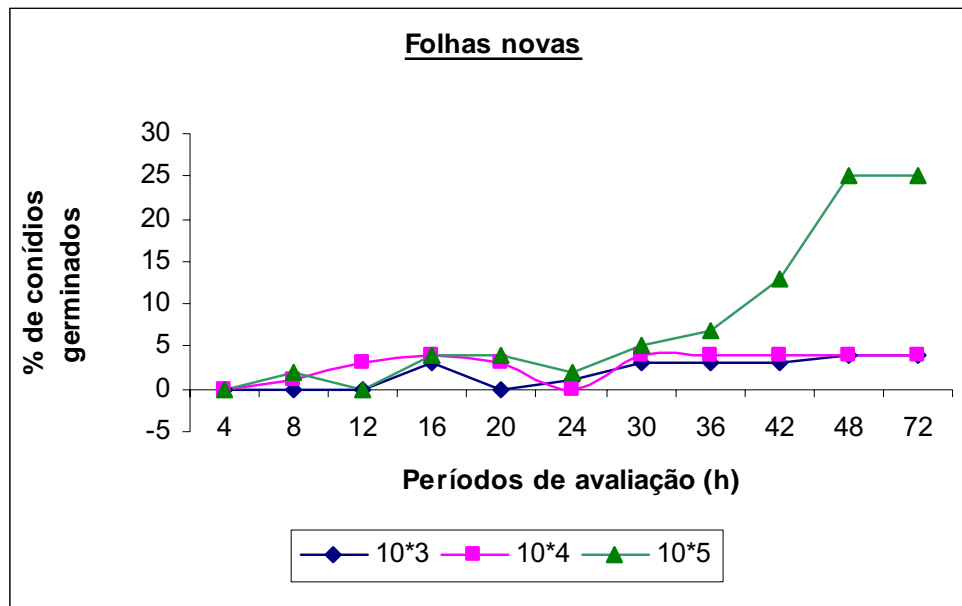


Figura 36. Efeito das diferentes concentrações da suspensão de conídios (10^3 , 10^4 e 10^5 conídios/mL) de *Phyllosticta citricarpa* na sua germinação em folhas recém-emitidas de laranja 'Valência', mantidas a 25°C e sob fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro), em diferentes tempos de avaliação.

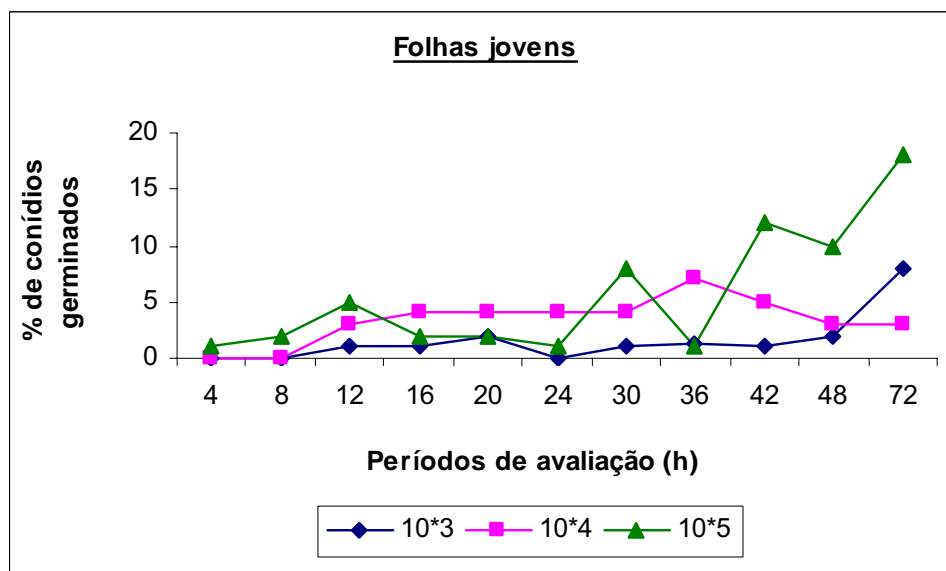


Figura 37. Efeito das diferentes concentrações da suspensão de conídios (10^3 , 10^4 e 10^5 conídios/mL) de *Phyllosticta citricarpa* na sua germinação em folhas jovens de laranja 'Valência', mantidas a 25°C, e sob fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro), em diferentes tempos de avaliação.

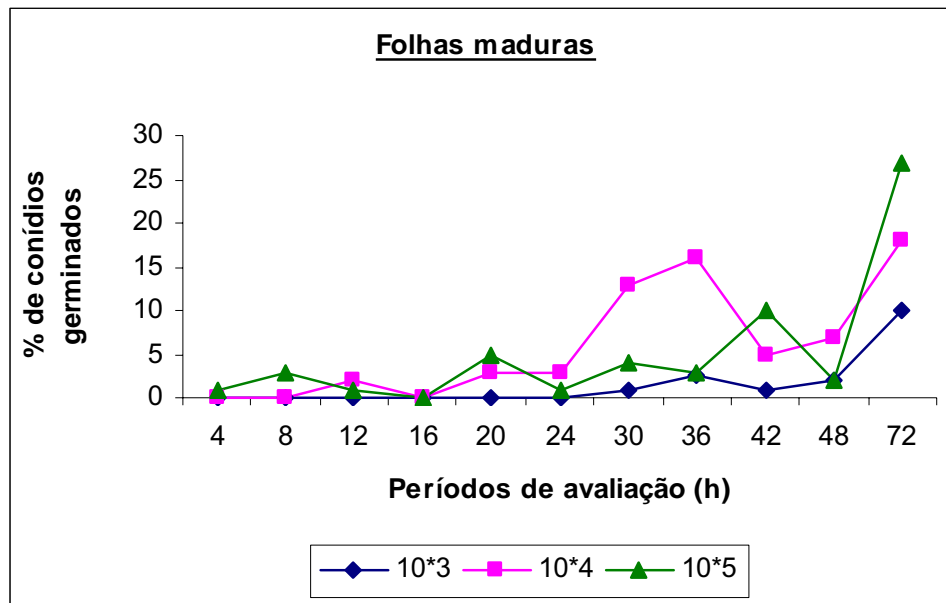


Figura 38. Efeito das diferentes concentrações da suspensão de conídios (10^3 , 10^4 e 10^5 conídios/mL) de *Phyllosticta citricarpa* na sua germinação em folhas fisiologicamente maduras de laranja 'Valência', mantidas a 25°C e sob fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro), em diferentes tempos de avaliação.

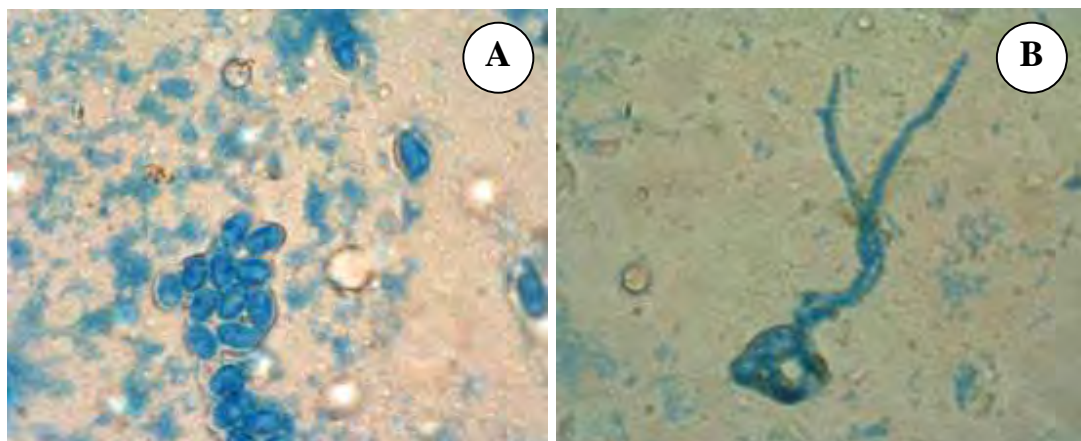


Figura 39. A - Conídios correspondentes a suspensão (1×10^5 conídios/mL) conidial de *Phyllosticta citricarpa* observados após 8 horas da inoculação em folha jovem de laranja 'Valência'. B - Conídio germinado após 72 horas da inoculação de folhas jovens, observado ao microscópio fotônico, com aumento de 100x.

4.2.2. Efeito de tratamentos com ou sem centrifugação, com ou sem emprego de substâncias indutoras de germinação, na porcentagem de conídios de *Phyllosticta citricarpa* germinados

De acordo com os dados obtidos, verificou-se que as maiores porcentagens de germinação foram obtidas no tratamento 3 (T3 - suspensão de conídios lavada com Tween 20, centrifugada com solução de sacarose e adição de ácido cítrico), a partir de 12 horas de incubação. A partir de tal período foram observados incrementos gradativos, atingindo o auge entre 24 a 40 horas de incubação (Figura 40), faixa esta que não foi verificada diferença estatisticamente significativa (Quadro 8).

A maior eficiência na taxa de germinação observada, em torno de 40-45%, pode ser atribuída à influência do ácido cítrico, já que este composto, segundo Kiely (1948), contribui para uma melhor germinação dos conídios. Entretanto, não se pode subestimar a influência da sacarose acrescentada à suspensão por ocasião da centrifugação, já que a mesma representa uma importante fonte de energia para os fungos de um modo geral, e certamente para *P. citricarpa*.

No tratamento onde se empregou Tween 20 (Tratamento 4), observou-se a presença de conídios germinados em menor tempo de incubação, em relação aos demais tratamentos onde não foi empregada tal substância. Acredita-se que tal fato deve-se às possíveis propriedades dispersantes contidas no Tween, proporcionando, dessa forma, melhoria nos níveis de remoção dos auto-inibidores (Figura 41).

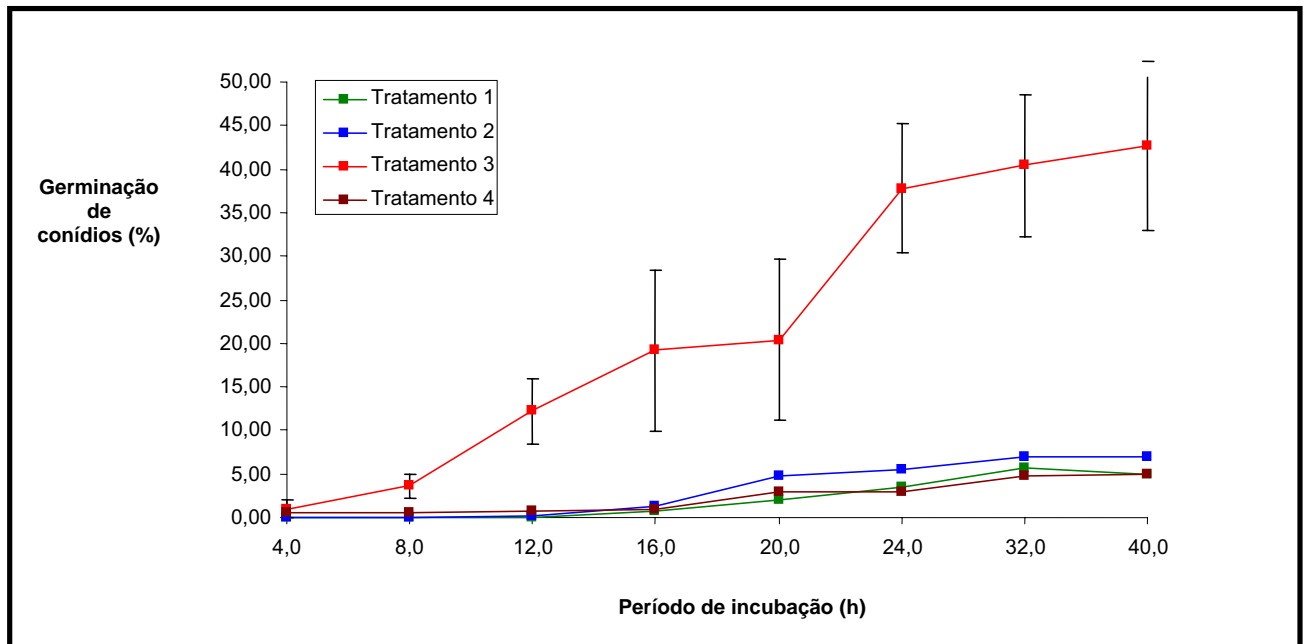


Figura 40. Efeito de diferentes tratamentos na germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa*, onde: 1) Testemunha; 2) Suspensão de conídios centrifugada com água esterilizada; 3) Suspensão de conídios lavada com Tween 20, centrifugada com solução de sacarose e ao final adicionado ácido cítrico; 4) Suspensão de conídios lavada com Tween 20. A diferença mínima significativa, calculada pelo teste de Tukey ($P \geq 5\%$), está representada pelas barras verticais no Tratamento 3.

Quadro 8. Efeito de tratamentos constituídos com ou sem centrifugação, e com ou sem substâncias indutoras de germinação, na porcentagem de conídios de *Phyllosticta citricarpa* germinados após 4 a 40 horas de incubação em estufas para B.O.D. a 25°C e fotoperíodo alternado de 12/12 horas.

Trat	Tempo (horas)							
	4	8	12	16	20	24	32	40
T1	0,0bC	0,0bC	0,0bC	0,7bC	2,0bBC	3,5bc	5,7bA	5,0bA
T2	0,0bB	0,0bB	0,2bB	1,2bB	4,7bA	5,5bA	7,0bA	7,0bA
T3	1,0aC	3,6aC	12,2aCB	19,2aB	20,4aB	37,8aA	40,4aA	42,6aA
T4	0,6aB	0,6bB	0,8bB	1,0bB	3,0bA	3,0bA	4,8bA	5,0bA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas ou maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $P \geq 0,05$).

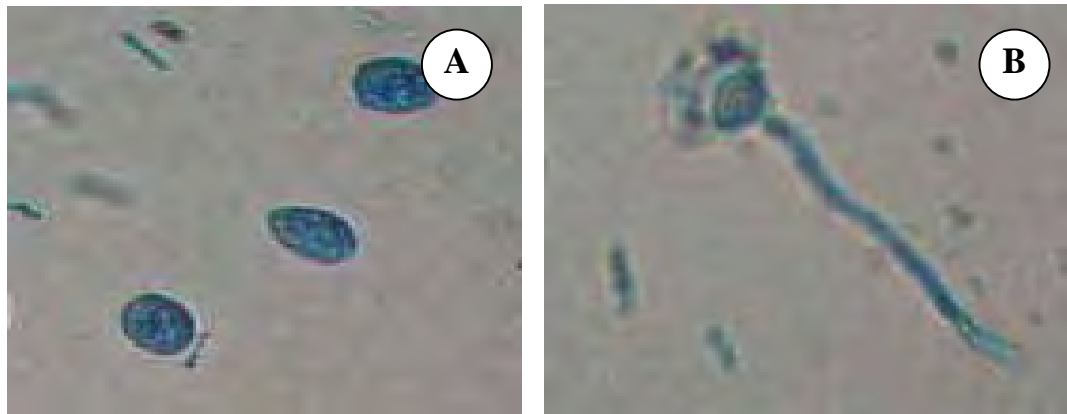


Figura 41. A - Conídios de *Phyllosticta citricarpa* não germinados. B – Conídios de *Phyllosticta citricarpa* germinado, após 40 horas de incubação, no tratamento T3 (suspensão de conídios lavada com Tween 20, centrifugado com solução de sacarose e adição de ácido cítrico), observados ao microscópio fotônico em aumento de 40x.

Os resultados ora obtidos, ainda que não possibilitem o isolamento dos fatores que contribuíram mais significativamente à melhoria da germinação dos conídios de *P. citricarpa*, por outro lado, oferecem subsídios consistentes quanto à melhor alternativa a ser adotada com o objetivo da obtenção da maior porcentagem de conídios germinados. Obviamente, estudos complementares visando a melhoria dos níveis de germinação dos conídios de *P. citricarpa* fazem-se necessários, uma vez que tais níveis mostram-se ainda muito baixos.

O conhecimento das interações entre os diferentes aspectos relacionados à germinação de conídios de *P. citricarpa* pode contribuir de forma relevante para uma melhor compreensão da dinâmica da doença no campo. Aspectos relacionados às influências ambientais no processo de germinação de conídios, demonstradas no presente trabalho, podem constituir em subsídios para estudos epidemiológicos da doença e, conseqüentemente, contribuir para um programa racional de manejo do patógeno.

4.2.3. Avaliação do efeito da adição de suco de laranja à suspensão conidial e o seu efeito na germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa*

Em meio de cultura

Os maiores valores de germinação, de aproximadamente 35-40%, foram observados no tratamento 3 (suspensão de conídios lavada inicialmente com solução de Tween 20 (0,02%), agitada manualmente por 1 minuto, acrescido de suco de laranja 0,5% (v/v). Em tal tratamento não foi observada diferença estatística significativa quanto à germinação conidial no período de 24h a 40h de incubação. Os demais tratamentos apresentaram menores valores de germinação e não foram observados diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Quadro 9; Figura 42).

Os resultados ora obtidos mostraram-se semelhantes aos apresentados no ensaio anterior, adicionando ácido cítrico à suspensão de conídios de *P. citricarpa*.

Quadro 9. Equações de regressão do efeito de tratamentos constituídos com ou sem centrifugação e, com ou sem substâncias indutoras de germinação, na porcentagem de conídios de *Phyllosticta citricarpa* germinados após 4 a 40 horas de incubação em estufas para B.O.D. a 25°C e fotoperíodo alternado de 12h luz/12h escuro.

Tratamentos	Equações de regressão	R ²	P
T1 = Testemunha (suspensão sem agitação e adição de substâncias)	$y = 2,8829\text{Ln}(x) - 1,5715$	0,69	0,06 ^{ns}
T2 = suspensão centrifugada com água estéril	$y = 3,8159\text{Ln}(x) - 1,4332$	0,78	0,07 ^{ns}
T3 = suspensão lavada com Tween 20 e adição de suco cítrico	$y = 22,086\text{Ln}(x) - 7,2388$	0,84	0,01*
T4 = suspensão com adição de Tween 20	$y = 2,5856\text{Ln}(x) - 1,1774$	0,78	0,07 ^{ns}

Y = produção média de pseudotécios; x = fotoperíodo

*P≤0,05 (significativo a 5%)

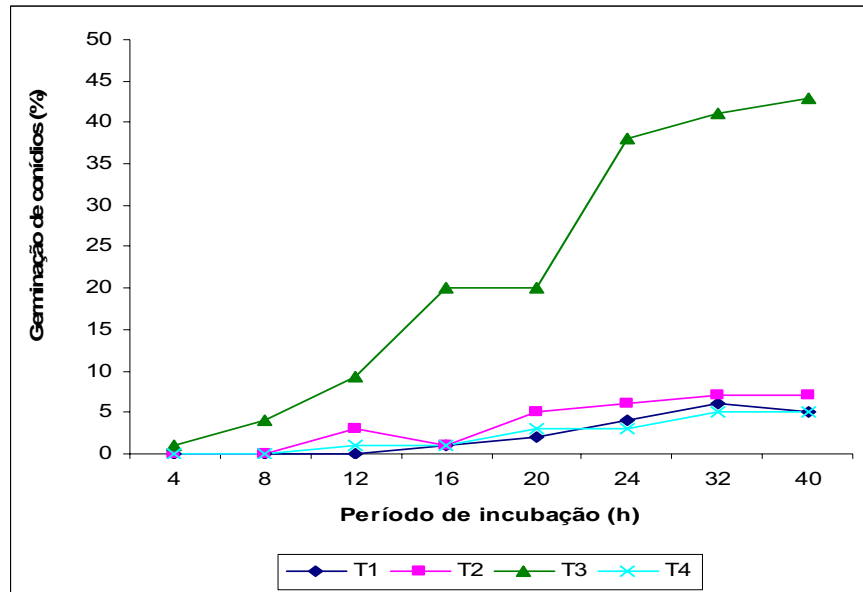


Figura 42. Efeito de diferentes tratamentos na germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa*, onde: 1) Testemunha; 2) Suspensão de conídios centrifugada com água esterilizada; 3) Suspensão de conídios lavada com Tween 20 e com adição suco de laranja; 4) adição de Tween 20 (0,02%) à suspensão conidial com agitação.

Em folhas

No ensaio de inoculação de folhas de laranjeira 'Pêra', a presença de conídios germinados, ainda que em pequena quantidade, foi inicialmente observada na primeira avaliação, realizada após 4 horas de incubação. Entretanto, os maiores níveis de germinação foram observados no tratamento 3, em cuja suspensão foi acrescido de suco de laranja 'Pêra' madura (Figura 43). Através desse tratamento foi observado que a taxa de germinação foi crescente, mantendo, porém, relativamente estável entre 32h a 40 horas, onde não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre si (Quadro 10).

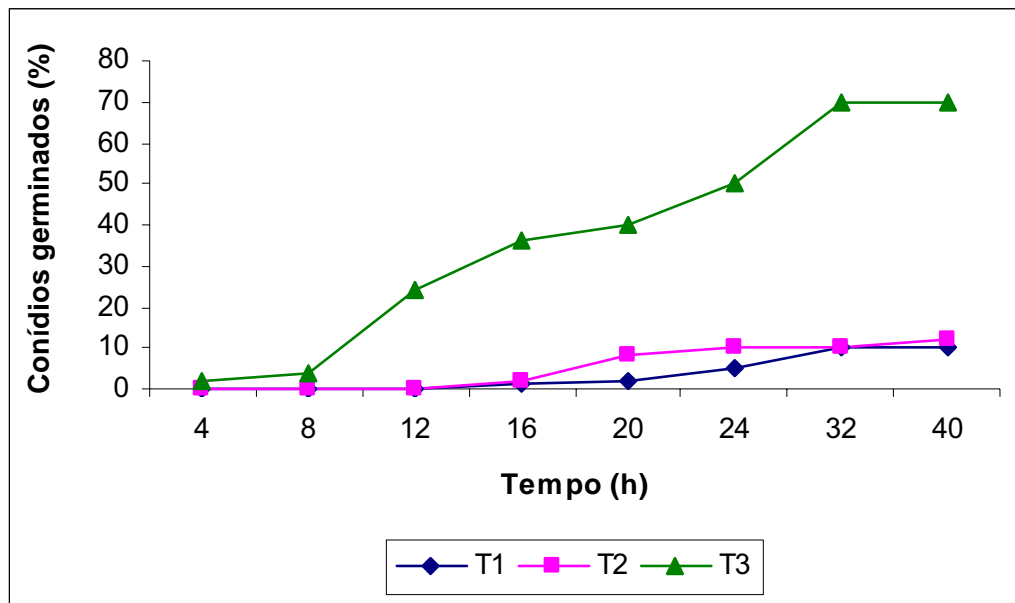


Figura 43. Efeito de diferentes tratamentos físicos na germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em folhas de laranjeira 'Pêra', onde: 1) Testemunha; 2) Suspensão de conídios centrifugada com água esterilizada; e 3) Suspensão de conídios lavada com Tween 20 com adição suco de laranja, mantidas em placas de Petri armazenadas em estufas para B.O.D. a 25°C e fotoperíodo alternado (12h luz/12h escuro).

Quadro 10. Equações de regressão do efeito de diferentes tratamentos físicos indutores de germinação na suspensão conidial sobre a germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em folhas de laranjeira 'Pêra' mantidas a 25°C e sob condições de fotoperíodo alternado (12 horas luz/12 horas escuro).

Tratamentos	Equações de regressão	R ²	P
T1 = Testemunha (suspensão conidial sem agitação e adição de substâncias)	$y = 4,8223\text{Ln}(x) - 2,8923$	0,61	0,06 ^{ns}
T2 = suspensão conidial centrifugada com adição de água estéril	$y = 6,44\text{Ln}(x) - 3,2867$	0,75	0,07 ^{ns}
T3 = suspensão conidial lavada com Tween 20 e adição de suco cítrico	$y = 35,346\text{Ln}(x) - 9,8538$	0,89	0,03*

Y = produção média de pseudotécios; x = fotoperíodo

*P<0,05 (significativo a 5%)

4.3. Ensaio de inoculação de plantas de laranjeira ‘Pêra’ e tangor ‘Murcott’ em casa de vegetação e exposição a condições de ambiente controlado e campo

Mediante a inoculação de frutos de laranjeira ‘Pêra’ com discos foliares colonizados por *P. citricarpa*, conforme metodologia adotada por Baldassari (2001), 45 dias após a inoculação foram observados os primeiros sintomas típicos da doença em alguns frutos de laranjeira ‘Pêra’. Tais sintomas caracterizavam-se pela presença de várias lesões pequenas, restritas às áreas onde foi justaposto o disco de folha. Tais sintomas caracterizaram-se àqueles do tipo falsa melanose (Figura 44).

As plantas com os respectivos frutos inoculados permaneceram expostos até sua fase de maturação em casa de vegetação refrigerada, com temperatura de 25°C, sendo posteriormente levadas a ambiente natural, com vistas a análises de produção de outros tipos de sintomas. Dada a coalescência de lesões, algumas lesões evoluíram para aquelas com semelhanças às do tipo mancha dura, sem, no entanto, caracterizá-las como tal.

Mediante avaliações semelhantes, porém com a exposição das plantas em câmara de crescimento calibrada para 25°C e 90% de umidade relativa do ar foi observada a presença de sintomas do tipo falsa melanose, em tempo semelhante ao observado sob condições de câmara climatizada e condições de campo. Entretanto, notou-se que algumas lesões inicialmente superficiais, do tipo falsa melanose, evoluíram para lesões do tipo “mancha preta” ou “mancha dura”, conforme caracterizadas por Herbert (1989). Percebeu-se que tais sintomas evoluíram quanto ao aspecto e tamanho, assumindo maiores dimensões, estando, porém, dentro dos limites citados por vários pesquisadores (Herbert, 1989; Goes & Kupper, 2002; Fundecitrus, 2005). Os dados correspondentes ao número de frutos sintomáticos estão apresentados no Quadro 11.

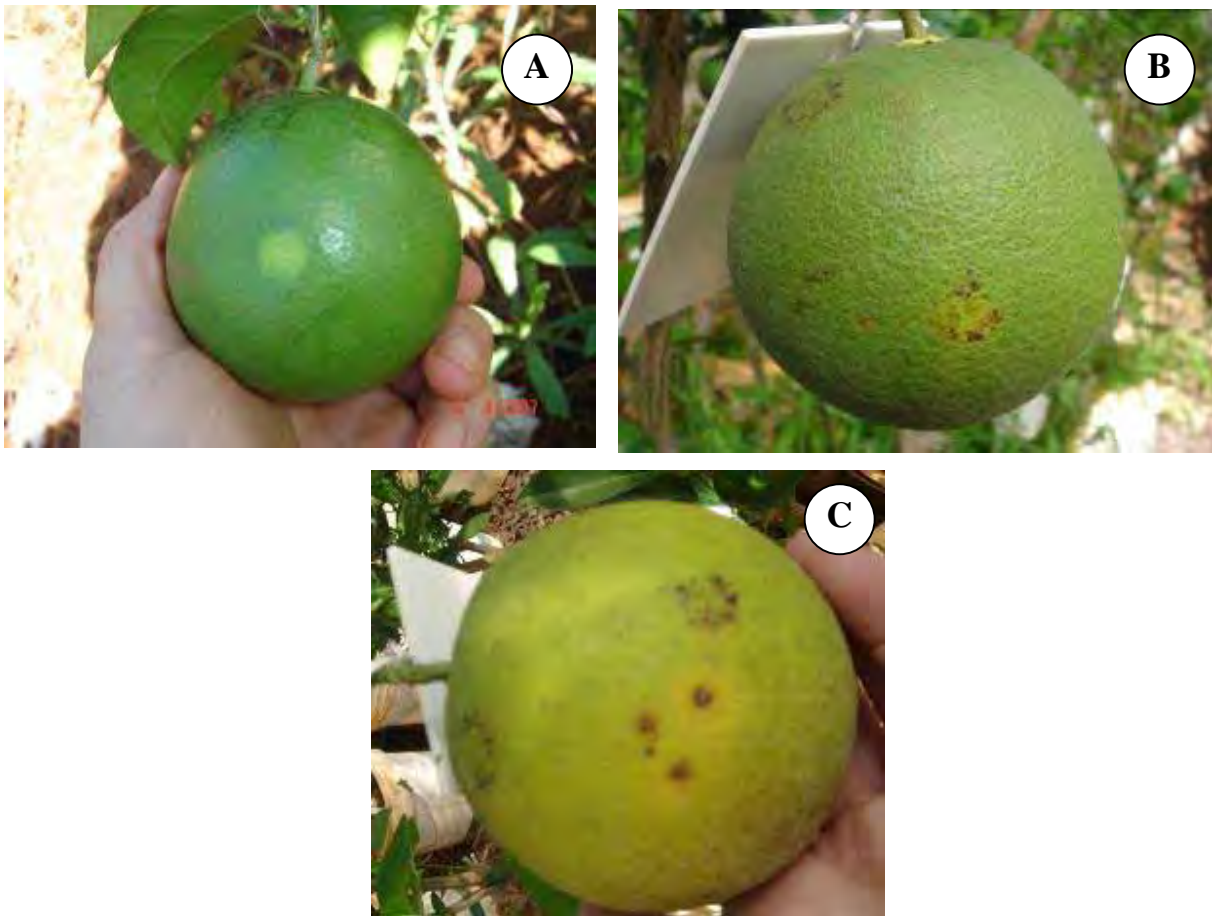


Figura 44. Fruto de laranja 'Pêra' apresentando marca da deposição do disco foliar, sem ou previamente colonizado por *Phyllosticta citricarpa*. (A) Testemunha; (B) Deposição do disco foliar colonizado, com sintoma 45 dias após inoculação e; (C) Sintoma presente no fruto 75 dias após a inoculação mediante a deposição do disco foliar colonizado.

Na inoculação dos frutos de laranja 'Pêra' com suspensão contendo ácido cítrico, foram observados sintomas de falsa melanose no fruto após 45 dias da inoculação e conseqüente incubação em ambiente controlado de 25°C e 90% de umidade relativa. Porém, estes sintomas não evoluíram quando da maturação dos frutos.

Em ambos os tratamentos (disco foliar cultivado em meio com suco de laranja e suspensão contendo ácido cítrico), tanto os frutos verdes quanto os já maduros apresentaram sintomas característicos de falsa melanose e mancha dura, sem, no entanto, evoluir para lesões extensivas, ao longo dos períodos de avaliações.

Os frutos de laranja 'Pêra' inoculados com discos de papel filtro imersos em suspensão fúngica e mantidos em câmaras climatizadas a 25°C e 90% de umidade relativa não apresentaram quaisquer tipos de sintomas durante todo período de avaliações realizadas, as quais se estenderam até a maturação do fruto.

Independentemente do tratamento de inoculação avaliado, a presença de maior número de frutos com sintomas foi verificado em condições de ambiente controlado a 25°C e 90% de umidade relativa (Quadro 11), não obstante sintomas da doença tenham sido observados mesmos nas plantas mantidas sob ambiente natural.

Quadro 11. Número de frutos com sintomas de *Guignardia citricarpa* obtidos mediante diferentes métodos de inoculação, após incubação em ambiente controlado com diferentes condições de temperatura e umidade relativa. Média de 16 frutos por tratamento.

Tratamentos*	30 dias após inoculação		45 dias após inoculação		60 dias após inoculação	
	25°C e 70% UR	25°C e 90% UR	25°C e 70% UR	25°C e 90% UR	25°C e 70% UR	25°C e 90% UR
T1 = Suspensão conidial (discos de papel filtro)	0	0	0	0	0	0
T2 = Discos foliares autoclavados	1	1	2	3	4	6
T3 = Suspensão conidial com ácido cítrico 0,3%	0	0	1	1	2	2
T4 = Discos foliares autoclavados em meio contendo suco cítrico	1	3	2	7	5	10

* No presente caso, não foram realizadas análises estatísticas dos dados, de tal forma que as interpretações restringiram-se exclusivamente a comparações entre os tratamentos avaliados.

Em tangor 'Murcott', não obstante tenha sido empregada metodologia semelhante à adotada para a laranja 'Pêra', não foram observados sintomas da doença. Teoricamente, ainda que em pequena quantidade, contava-se com a presença dos mesmos. Entretanto, no caso desse híbrido, tem-se verificado que em algumas regiões do estado de São Paulo e Rio Grande do Sul, às vezes encontram-se pomares com expressiva incidência da doença, enquanto em outros, de condições bio-ecológicas semelhantes, os níveis da mesma são comparativamente mais baixos. Admite-se que tais discrepâncias devam-se ao fato de tratar-se de clones, os quais diferem quanto ao seu comportamento em relação a *G. citricarpa*. Fatos semelhantes têm-se observado na relação tangor 'Murcott' x *Alternaria alternata* (A. de Goes, informações pessoais, Dezembro de 2006). No presente caso, as mudas de tangor 'Murcott' foram adquiridas de viveiro localizado em Rio Claro/SP, cujos antecedentes quanto ao comportamento das plantas matrizes ao patógeno não são conhecidos. Dessa forma, diante das respostas obtidas, tal possibilidade não pode ser subestimada.

4.4. Avaliação a campo do efeito da presença de galhos secos na expressão de sintomas de falsa melanose em frutos cítricos

Na fase inicial do trabalho, em 30/06/2005, foi realizada poda de todos galhos secos e galhos que apresentavam sintomas aparentes de rubelose (*Erytricum salmonicolor*), contidos em duas linhas, de 78 e 76 plantas. Em tais galhos removidos foi contado o número total de frutos existentes, o que totalizou 15.477 frutos, de ambas as linhas de plantas. Posteriormente, foi realizada a contagem de frutos com sintomas do tipo falsa melanose, cujo objetivo foi estabelecer uma relação entre presença de galhos secos e presença de sintomas do tipo mencionado. Foi observado que, dentre os 15.477 frutos avaliados, 5.821 frutos (equivalente a 37,6%) apresentavam sintomas do tipo falsa melanose, enquanto os demais, 9.656 frutos (62,4%), não o exibiam. Mediante análise estatística, aplicando-se o teste t, não foi constatado diferença significativa entre ambas as áreas, com indicação, portanto, que o nível de doença nas plantas avaliadas mostrava-se relativamente uniforme.

Tal avaliação prévia consistiu do preparo da área para a implantação de ensaio mais abrangente, realizado no ano seguinte, no qual, além do número de frutos com sintomas do tipo falsa melanose, também foi avaliado número de frutos caídos, resultante de infecções causadas por *G. citricarpa*.

Dessa forma, em 2006, foram realizadas 5 avaliações nas seguintes datas: 31/08, 13/09, 04/10, 23/10 e 22/11/2006. Conforme dados contidos no Quadro 12, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos níveis de incidência, entre as áreas podadas e não podadas. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa quanto à incidência, entre áreas podadas e não podadas, mediante emprego de escala desenvolvida por Spósito et al. (2004) observou-se que os níveis de severidade dos sintomas do tipo falsa melanose foram muito mais expressivos nos frutos pertencentes às plantas não podadas, demonstrando, assim, a relação entre a presença de galhos secos e esse tipo de sintoma. A alta incidência de frutos com sintomas nas plantas não podadas, ainda que o nível de severidade tenha sido baixo, certamente se deve à presença de ramos finos e secos, uma vez que a sua eliminação total na planta mostra-se praticamente impraticável.

Quadro 12. Número total de frutos colhidos e número de frutos apresentando sintomas de falsa melanose, com suas respectivas porcentagens de incidência, em área podada e não podada, em pomar de laranjeira 'Natal'. Tambaú/SP, agosto a dezembro, 2006.

Avaliações	Total de frutos colhidos por área	Área podada	Área não podada
1ª avaliação	2500	300 (12%)	1600 (64%)
2ª avaliação	2500	900 (36%)	2500 (100%)
3ª avaliação	2500	900 (36%)	2500 (100%)
4ª avaliação	2500	2200 (88%)	2500 (100%)
5ª avaliação	2500	1100 (44%)	2500 (100%)
MÉDIA	2500	1080 (43,2%) b	2320 (92,8%) a

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste T $\geq 0,05$.

Em termos absolutos, o número de frutos sintomáticos em plantas podadas foi inferior ao observado nas plantas não podadas (Quadro 13). Em termos de severidade, nas plantas não podadas houve o predomínio das notas 3 a 5, enquanto que nas plantas podadas houve predomínio de frutos assintomáticos (Quadro 14).

Quadro 13. Influência da poda nos níveis de severidade de sintomas do tipo falsa melanose causados por *Guignardia citricarpa* em frutos de laranjeiras 'Natal'. Número médio de 50 frutos por planta (50 plantas avaliadas/tratamento). Tambaú/SP, janeiro a dezembro, 2006.

Tratamentos	Escala de notas ^x	Número médio de frutos com sintomas do tipo falsa melanose/Avaliação				
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
Plantas podadas	0	44,0 aA	32,0 aB	32,0 aB	6,0 dD	28,0 aC
	1	2,0 dB	0,0 eC	0,0 dC	8,0 cdA	2,0 fgB
	2	0,0 dD	2,0 dfC	2,0 dC	20,0 bA	4,0 efB
	3	2,0 dD	6,0 cC	8,0 bcB	10,0 cA	6,0 deC
	4	0,0 dD	4,0 ceC	6,0 cB	6,0 dB	8,0 dA
	5	2,0 dA	0,0 eB	2,0 dA	0,0 eB	2,0 fgA
	6	0,0 dB	6,0 cA	0,0 dB	0,0 eB	0,0 gB
Plantas não podadas	0	18,0 cA	0,0 eB	0,0 dB	0,0 eB	0,0 gB
	1	0,0 dB	0,0 eB	0,0 dB	2,0 eA	0,0 gB
	2	2,0 dB	0,0 eC	0,0 dC	6,0 dA	0,0 gC
	3	26,0 bB	2,0 dfD	30,0 aA	30,0 aA	12,0 cC
	4	2,0 dD	6,0 cC	10,0 bB	10,0 cB	20,0 bA
	5	2,0 dC	16,0 bA	10,0 bB	2,0 eC	12,0 cB
	6	0,0 dC	26,0 aA	0,0 dC	0,0 eC	6,0 deB

CV(%) = 20,34

^xNotas conforme escala de notas adotada por Spósito et al (2004). *Médias seguidas da mesma maiúscula na linha e minúsculas na coluna não diferem significativamente entre si (Tukey, $P \geq 0,05$).

Quadro 14. Índice de doença (ID) em frutos de laranjeira 'Natal' apresentando sintomas do tipo falsa melanose, causada por *Guignardia citricarpa*, em plantas podadas e em plantas não podadas. Tambaú/SP, agosto a dezembro, 2006.

Avaliações	Plantas podadas	Plantas não podadas
1ª avaliação	0,36 ^x	2,00
2ª avaliação	1,48	5,32
3ª avaliação	1,24	3,60
4ª avaliação	2,04	3,08
5ª avaliação	1,40	4,24
Média	1,30	3,65

*No presente caso, não foram realizadas análises estatísticas dos dados, de tal forma que as interpretações restringiram-se exclusivamente a comparações entre os tratamentos avaliados. ^xDados obtidos a partir de notas estabelecidas conforme escala de notas desenvolvida por Spósito et al (2004).

Com relação ao número de frutos caídos sob a copa das plantas, foi observado que sob a copa das plantas não podadas havia pelo menos o dobro de frutos caídos, em relação à área podada (Quadro 15), havendo diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Assim, considerando-se que a produção média dessas plantas foi de 844 frutos, significa que, no caso das plantas podadas a média de frutos caídos foi de 2,10%, enquanto que nas áreas não podadas, tal média foi de 4,65%.

A queda de frutos observada tanto nas áreas podadas, como nas não podadas, provavelmente deve-se à presença de sintomas do tipo mancha preta ou mancha dura, uma vez que estes são um dos grandes responsáveis pela queda de frutos infectados por *G. citricarpa* (Herbert, 1989; Kotzé, 1981; Goes & Kupper, 2002; Fundecitrus, 2005). De acordo com Goes & Kupper (2002), frutos quando exibem exclusivamente sintomas do tipo falsa melanose somente caem quando as infecções são muito precoces. Tais sintomas afetam o crescimento dos frutos, aceleram a sua maturação, advindo, posteriormente a sua queda. Tal fato não foi o que se observou no presente caso, já que a queda ocorreu na fase de maturação, já próxima da colheita dos frutos.

No presente caso, embora ambas as áreas tenham sido regularmente pulverizadas, visando o controle de *G. citricarpa*, conforme preconizado por diversos autores (Goes, 2001; Goes & Kupper, 2002; Fundecitrus, 2005; Baldassari & Goes, 2006), os sintomas que ocorreram certamente se originaram de ascósporos disseminados pelo vento, atingindo aleatoriamente os frutos em planos variados da

planta. Outros fatores que contribuíram, certamente foram conseqüentes dos escapes naturais, que muitas vezes ocorrem, mesmo com o rigoroso esquema de pulverizações. Além disso, no caso das áreas não podadas, certamente em razão de um enfolhamento irregular, os frutos tornam-se mais expostos e sujeitos a uma insolação mais intensa e, que, com a elevação superficial da temperatura da casca há uma maior expressão dos sintomas, advindo uma maior predisposição à queda. Também não se deve descartar a possibilidade da presença de flores extemporâneas que, por conseqüência, redundaram na produção de frutos os quais, involuntariamente não receberam os tratamentos preventivos e curativos nos momentos mais apropriados.

Quadro 15. Influência da remoção de galhos secos mediante a poda, no número médio de frutos caídos sob a copa de plantas de laranjeira 'Natal'. Tambaú/SP, janeiro a dezembro, 2006.

Avaliações	Número de frutos caídos	
	Plantas podadas	Plantas não podadas
1 ^a	44,0	83,0
2 ^a	12,0	24,0
3 ^a	10,0	30,0
4 ^a	5,0	20,0
Média total	17,75b	39,25a

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Teste $t \geq 0,05$).

Em termos práticos, os resultados ora obtidos constituem-se em elementos importantes quanto ao manejo da doença uma vez que se evidencia a existência da relação entre a presença de galhos secos e sintomas do tipo falsa melanose. Tal fato constitui-se também em evidência de que, para a obtenção de resultados de controle mais satisfatórios faz-se necessário o uso de podas quando da existência de pomares mais velhos e debilitados, ou que, por razões várias, não apresentem boas condições de enfolhamento. A baixa incidência e severidade de sintomas do tipo falsa melanose em pomares mais novos também se constituem em elementos que alicerçam as hipóteses e históricos apresentados.

4.5. Avaliação a campo do efeito da presença de ácaro da falsa ferrugem na expressão de sintomas do tipo mancha trincada em frutos cítricos

Nos diferentes tratamentos realizados, com e sem controle químico com fungicidas e acaricidas, foi observado maior número de frutos com sintomas de notas 0 a 1, exceto para a testemunha 1, cujo maior número de frutos situou-se na nota 2 (Quadro 16).

No reordenamento e conseqüente análise das notas de severidade nos frutos em função dos sintomas do tipo mancha trincada e os resultantes do ácaro da ferrugem, observou-se que, no caso do tratamento 1 (área com aplicação de fungicida cúprico na florada e acaricida na fase “ping-pong”), o índice de severidade para o caso do ácaro da ferrugem foi de 1,11, enquanto que para o caso dos sintomas do tipo mancha trincada, essa o foi de 2,45 (Quadro 16).

Quadro 16. Efeito das combinações fungicidas e acaricidas, isoladamente ou em combinação, na severidade de sintomas oriundos de ataques de *Phyllocoptruta oleivora* (Índice de danos) e *Guignardia citricarpa* (Índice de doença), em frutos de laranja ‘Natal’. Tambaú/SP, 2006.

Tratamentos	Índice de danos	Índice de doença
T1 - X + aplicação de enxofre nos frutos na fase “ping-pong” (Testemunha)	1,11	2,45
T2 - X + ¹ tiofanato metílico + óleo mineral	1,89	1,54
T3 - X + ¹ pyraclostrobin + óleo mineral	1,56	1,43
T4 - X + ¹ pyraclostrobin + mancozeb + óleo mineral	0,36	1,02
T5 - X + ¹ carbendazim + mancozeb + óleo mineral	0,45	0,38
T6 - X + ¹ hidróxido de cobre + óleo mineral	1,72	1,13
Média	1,18b	1,32a

X – Corresponde a aplicação de oxicleto de cobre nas fases de ¼ de pétalas caídas e 28 dias após a primeira. ¹Tratamentos realizados conforme procedimentos usuais visando o controle de *Guignardia citricarpa*.

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Teste $t \geq 0,05$).

Conforme dados contidos no Quadro 16, observa-se que o emprego de enxofre, como no caso do tratamento T1, proporcionou bom controle de *P. oleivora*, cujo índice de dano foi de 1,11. Entretanto, pelo fato de não ter sido utilizado o uso de fungicidas visando o controle específico de *G. citricarpa*, verificou-se que o nível de doença foi muito elevado, alcançando 2,45. Considerando-se que os reflexos resultantes de *G. citricarpa* são muitos expressivos nas áreas não tratadas, e levando-se em conta os bons resultados obtidos mediante o emprego de acaricida, observa-se que os dados apontados mostram-se muito coerentes. Por outro lado, quando se comparam os resultados obtidos mediante ao emprego com enxofre, um acaricida preconizado para o controle de *P. oleivora*, e os advindo do uso de mancozeb, constata-se que este produto, não obstante ser essencialmente um fungicida, o mesmo apresenta boa eficiência no controle de *P. oleivora*, corroborando as suas indicações no controle desse ácaro, conforme preconizado por Andrei (1993). Entretanto, as diferenças observadas quanto aos níveis de controle obtido mediante ao uso de enxofre e mancozeb, devem-se ao fato que no primeiro caso foi realizada apenas uma aplicação do acaricida, enquanto que no caso do mancozeb foram realizadas duas aplicações. Também não se pode subestimar um possível efeito do óleo mineral aplicado juntamente com os fungicidas, embora na literatura não se encontre evidência de tal fato.

Quanto à análise em nível de independência de variáveis, os dados correspondentes aos valores de Qi-Quadrado e probabilidade encontram-se apresentados no Quadro 17. De acordo com os dados obtidos, comprova-se a dependência de uma variável em relação à outra, onde os sintomas do tipo mancha trincada apresentam forte relação com os sintomas de ácaro da falsa ferrugem ($P \leq 0,05$).

Quadro 17. Efeito das combinações fungicidas e acaricidas, isoladamente ou em combinação, na severidade de sintomas oriundos de ataques de *Phyllocoptruta oleivora* (Índice de danos) e *Guignardia citricarpa* (Índice de doença), em frutos de laranja 'Natal'. Tambaú/SP, 2006.

Tratamentos	χ^2	Probabilidade de χ^{2*}
T1 - X + aplicação de enxofre nos frutos na fase "ping-pong" (Testemunha)	4,27	0,01
T2 - X + ¹ tiofanato metílico + óleo mineral	4,92	0,02
T3 - X + ¹ pyraclostrobin + óleo mineral	4,99	0,01
T4 - X + ¹ pyraclostrobin + mancozeb + óleo mineral	4,57	0,004
T5 - X + ¹ carbendazim + mancozeb + óleo mineral	4,99	0,003
T6 - X + ¹ hidróxido de cobre + óleo mineral	3,48	0,008

*significativo P \leq 5%, logo variáveis são dependentes

Com os resultados ora obtidos, comprova-se, de forma indireta, o envolvimento do ácaro da ferrugem, *P. oleivora*, e os sintomas do tipo mancha trincada, causada por *G. citricarpa*, conforme suposição apresentada por Goes et al. (2000). Entretanto, estudos adicionais envolvendo a interação *Citrus* - *G. citricarpa* - *P. oleivora* fazem-se necessários, com vistas se aprofundem na busca de informações acerca desse citado patossistema.

V CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a maior produção de pseudotécios em folhas sintomáticas coletadas do campo, mantidas em caixas Gerbox® ou bandejas plásticas foi verificada a 25°C, sob fotoperíodo de luz contínua;
- folhas esterilizadas durante 90 minutos e mantidas sob fotoperíodo de luz contínua produzem maior número de pseudotécios, quando comparado aos demais tratamentos de esterilização;
- ascósporos são produzidos em maior número em discos foliares cultivados em meio de cultura aos 63 dias de incubação;
- a imersão de folhas cítricas em água a 40°C durante 5 minutos promove maior produção de pseudotécios;
- há um comportamento diferencial quanto à taxa de germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* quando submetidos a diferentes temperaturas e fotoperíodos nos ensaios de germinação. Uma maior germinação é verificada em meio de cultura ágar-dextrose, enquanto que, em folhas fisiologicamente maduras, há uma tendência de maior germinação dos conídios em relação às folhas de outros estádios fisiológicos.
- sintomas de mancha preta são verificados com maior expressão, quando da inoculação de frutos de laranjeira 'Pêra' com discos foliares colonizados por *P. citricarpa*;
- sintomas de falsa melanose a campo estão relacionados à presença de galhos e ramos secos em plantas, cuja remoção mediante poda promove um maior controle da doença;
- há relação entre os sintomas causados pelo ácaro da falsa ferrugem e os sintomas de mancha trincada.

VI REFERÊNCIAS

- ABECITRUS. Disponível em: <http://www.abecitrus.com/exporano.html#expfcoj2>. Acesso em 30/11/2006.
- AGRIANUAL 2000. **Mercados & Perspectivas**. Anuário da Agricultura. São Paulo: FNP 2000, p. 286.
- AGUILAR-VILDOSO, C. I. Indução de pseudotécios de *Guignardia citricarpa*, em fragmentos foliares de diferentes espécies de plantas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.61, 1996.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACWELL, M. *Introductory Mycology*. 4 ed. John Wiley & Sons Inc, New York, p.56-194. 2004.
- ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 4 ed. São Paulo, Organização Andrei. Editora Ltda. 1993. 448p.
- AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.15, p.468-475, 1940.
- BALDASSARI, R.B. **Influência de frutos sintomáticos de uma safra na incidência de *Guignardia citricarpa* na safra subsequente e período de suscetibilidade de frutos de laranjeiras Natal e Valência**. 2001. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal)) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- BALDASSARI, R.B.; GOES, A. Observações para o controle da Mancha Preta dos Citros (MPC). **Correio Agrícola**, São Paulo, n.01, p.22-25, 2006.
- BALDASSARI, R.B.; GOES, A.; SANTOS J.M. dos; TIMOSSI, A.J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.27, p. 88-92, 2001.
- BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.P.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, M.; WEERDT, M.; BROUWERSHAVEN, G.C.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI, Jr., W.; GLIENKE-BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic strains of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants,

- Guignardia mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n.5, p.464-477, 2002.
- BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.
- BESPALHOK-FILHO, J.C. Laranja transgênica: Transformação da laranja visando resistência ao cancro cítrico usando genes de peptídeos antibacterianos. **Biotecnologia**. Ed. IV, v.23, p.62, 2002.
- BONANTS, P.J.M.; CARROLL, G.C.; de WEERDT, M.; van BROUWERSHAVEN, I.R.; BAAYEN, R.P. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 503-513, 2003.
- BOTEON, M. **Cadeia agroindustrial de citros**. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/ESALQ/USP). <http://cepea.esalq.usp.br> 14p. (15 dez.2006).
- CALAVAN, E.C. Black spot of citrus. **The California Citrograph**. Los Angeles, v.46, n.11, p.21-24, 1960.
- CIRULLI, M. & ALEXANDER, L.J. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytopathology**, St. Paul, v.56, n.11, p.1301-1304, 1966.
- DE NADAI, A. D. Efeito da temperatura e tempo de incubação na germinação e esporulação de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados a plantas cítricas. Jaboticabal, 2003. 40p. Trabalho de graduação (Graduação) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista.
- FAGAN, C. & GOES, A. Efeito da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutas de laranjas ‘Natal’ e ‘Valência’. **Summa Phytopathologica**, 26:122. 2000. (Resumo)
- FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças do citros. In: KIMATI, H., AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.261-296, 1997.

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

FNP CONSULTORIA COMÉRCIO. **Agrianual 2006**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, p.295-314: laranja, 2006.

FUNDECITRUS. **Mancha preta dos citros**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acessado no dia 03 de Janeiro de 2005.

FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre pinta preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, 1998. 10p. (Boletim Técnico).

GOES, A. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causados por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, p.9-13, 2002.

GOES, A.; KUPPER, K.C.. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias na cultura dos citros. In: Laércio Zambolim. (Org.). Manejo Integrado - Fruteiras tropicais - Doenças e Pragas. 1 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002, v. I, p. 353-419.

GOES, A. Mancha preta dos citros: Situação atual e perspectivas futuras. *Ciência & Prática*, Bebedouro, p. 5 - 7, 2001.

GOES, A. de; ANDRADE, A.G.; MORETTO, K.C.K. Efeito de diferentes tipos de óleo na mistura de benomil + mancozeb no controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, p.233-236, 2000.

GOES, A.; BALDASSARI, R.B.; FEICHTENBERGER, E.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; SPÓSITO, M.B. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**. Orlando, Florida, p.1001-1002, 2000.

GONZÁLEZ-JAIMES, E.; NOZAKI, M. de H. ; GOES, A. ; MORETO, C. Germinación de conídios de *Phyllosticta citricarpa* en hojas de naranja valencia en diferentes estados de maduración. . In: Congresso de ASCOLFI, 2004, Palmira. Memorias del XXV Congreso de ASCOLFI. Palmira, Colômbia : CIAT, 2004. p. 5-5.

- HERBERT, J.A. **Citrus black spot**. Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, Nelspruit. Citrus H.30, 1989.
- KIELY, T.B. **Control and epiphytology of black spot of citrus on the central coast of New South Wales**. New South Wales: Department of Agriculture Science, 1948. p.88. (Bulletin).
- KELLERMAN, C.R.; KOTZÉ, J.M. The black spot disease of citrus and its control in South Africa. **Proceedings International Society Citriculture**, 3:992-996, 1977.
- KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.) **The Citrus Industry**. Riverside, University of California, 1978, p.1-66.
- KOTZÉ, J.M. Black spot. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of Citrus Diseases**. St. Paul, APS Press, 1988, p.10-12.
- KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South África. **Plant Disease**, v.65, n.12, p.945-950, 1981.
- LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E.W.; ISHIDA, M.L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, Passo Fundo, v. 9, p.119-157, 2001.
- LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Mycosporine-alanine, a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Mycoscience**, Japão, v.16, p.76-86, 1992.
- LIMA, E.F. **Variabilidade de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* A.S. Costa e avaliação de resistência de linhagens de algodoeiro a ramulose**. 1981. 47p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. *Annals of Botany* 82:535-540, 1998.
- McONIE, K. C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. **Phytopathology**, St.Paul, v.57, p.743-746, 1967.

- McONIE, K.C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.64-67, 1964.
- MENDES, D.; REIS, R.F. dos; OCA, A.G.M. ; PEREIRA, G.T.; GOES, A. . Aspectos nutricionais e físicos no crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* (= *Guignardia citricarpa*), agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, n. 4, p. 349-357, 2005.
- MORAN LEMIR, A.H.; STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H.; CANTON, N.V. In vitro production of ascospores and pathogenicity of *Guignardia citricarpa*, causal agent of citrus black spot. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.374-376. 2000.
- NICHOLSON, R. L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In: Cole , G. T. & Hoch, H.C. (Ed.). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, p.3-23, 1991.
- NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L.G.; ASQUITH, T.N. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: Implications for the survival and virulence of phytopathogenic fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, p. 1315-1318, 1986.
- NICHOLSON, R. L.; MORAES, W.B.C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, p. 255-261, 1980.
- OLIVEIRA, C. A. L. de ; MAURO, A O ; KRONKA, S N. Comparação de métodos para estimativas da população do ácaro *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead, 1879) na cultura dos citros. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Curitiba, v. 11, n. 11, p. 101-104, 1982.
- PUNITHALINGAM, E.; WOODHAMS, J.E. The conidial appendage in *Phyllosticta* spp. **New Hedwigia**, Berlin, v.36, p.151-175, 1982.
- RAMADOSS, C.S.; UHLIG, J.; CARLSON, D.M.; BUTLER, L.G. & NICHOLSON, R.L. Composition of the mucilaginous spore matrix of *Colletotrichum graminicola*, a pathogen of corn, sorghum and other grasses. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 33, p.728-732, 1985.
- REYNOLDS, M.R.; STOUMBOS, Z.G. Monitoring the process mean and variance using individual observations and variable sampling intervals. **Journal of Quality Technology**, Milwaukee, v.33, n.2, p.181-205, abr/jun. 2001.

- SCHINOR, E.H.; FILHO, F.A.A.M.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; SOBRINHO, J.T. Colonização de folhas de laranjeira 'Pêra' e variedades afins por *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.5, set-out, 2002, p.479-483.
- SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphus**. J. Cramer., Germany, 1984, 701p.
- SNYDER, B. A.; LEITE, B.; HIPSKIND, J.; BUTLER, L. G.; NICHOLSON, R. L. Accumulation of sorghum phytoalexins induced by *Colletotrichum graminicola* at the infection site. **Physiological Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, p. 463-470, 1991.
- SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BELASQUE JUNIOR, J.; BASSANEZI, R. B.; AQUINO, R. de. Elaboração e Validação de Escala Diagramática para Avaliação da Severidade da Mancha Preta em Frutos Cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 1, p. 81-85, 2004.
- SPÓSITO, M. B.; BAZANEZZI, R.B. Problemas sanitários na pós-colheita para a exportação de frutas cítricas e métodos de controle. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS: PATOLOGIA PÓS-COLHEITA DE FRUTOS E HORTALIÇAS, 2, 2002, Lavras. **Anais**: Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. p.79-83.
- SUTTON, B.C.; WATERSTON, J.M. **Guignardia citricarpa**, Kew: C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria n°85, CAB International, Wallingford, UK. 1966.
- TAYLOR, J. W.; SPATAFORA, J.; BERBEE, M. 2006. **Ascomycota**. Sac Fungi. Acessado em 09/10/2006: <http://tolweb.org/Ascomycota/20521/2006.10.09>.
- TIMOSSI, A. J.; GOES, A.; KUPPER, K. C.; BALDASSARI, R.; REIS, R. F. dos. Influência da temperatura e luminosidade no desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.5, set-out, p.489-494. 2003.
- TRAPERO-CASAS, A.; KAISER, W.J. Development of *Didymella rabie*, the teleomorph of *Ascochyta rabie*, on chickpea straw. **Phytopathology** 82:1261-1266, 1992.
- VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola* from maize. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p.530-534. 1991.