

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

**Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba
e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros**

Sylvia Raquel Gomes Moraes

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia**

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Sylvia Raquel Gomes Moraes
Engenheira Agrônoma

Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2009**

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

Moraes, Sylvia Raquel Gomes

Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros / Sylvia Raquel Gomes Moraes - - Piracicaba, 2009.

114 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Antracnose 2. Fungos fitopatogênicos 3. Goiaba 4. Laranja 5. Limão 6. Microscopia eletrônica 7. Podridão (Doença de planta) I. Título

634.421

CDD

M827i

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

*Ao meu marido Bruno e
aos meus pais José Osório e Luíza,
por terem compartilhado comigo os momentos alegres e difíceis.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) e ao Departamento de Fitopatologia, Entomologia e Zoologia, pela oportunidade de realização do doutorado e pelo apoio e treinamento proporcionado pelos seus prof. e pesquisadores, em especial ao professor Dr. Elliot Kitajima e à professora Dr. Lilian Amorim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Jr., pela orientação, incentivo e principalmente pela confiança.

Ao prof. Dr. Francisco A. O. Tanaka, pela amizade e pela valiosa ajuda na condução dos experimentos.

À Dra. Natália Perez e ao Dr. “Pete” Timmer pelo carinho, receptividade, confiança e ensinamentos transmitidos durante minha passagem pela Flórida, EUA.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura, pelo apoio financeiro, em especial ao Dr. Marcel Spósito.

Ao prof. Dr. Gerson B. Mourão, pela colaboração nas análises estatísticas.

As amigas Ana Raquel e Maria Eugênia pela ajuda em todas as etapas desse trabalho e pela agradável convivência.

A todos os colegas do curso de pós-graduação da fitopatologia, em especial ao Gleiber, Maria Cândida e Rock.

Aos funcionários do Setor de Fitopatologia e da biblioteca: Edvaldo, Jeferson, Renato e Sílvia.

Ao Bruno pelo carinho, tolerância e amor.

Por fim, agradeço a Deus, por ter permitido que eu atingisse essa etapa da minha vida com saúde, paz e rodeada de colegas e amigos.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	10
Referências.....	11
2 HISTOPATOLOGIA DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EM FRUTOS DE GOIABEIRA (<i>Psidium guajava</i> L.).....	13
Resumo.....	13
Abstract.....	14
2.1 Introdução.....	15
2.2 Desenvolvimento.....	16
2.2.1 Revisão Bibliográfica.....	16
2.2.1.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	16
2.2.1.2 Infecção.....	17
2.2.1.3 Apressório.....	18
2.2.1.4 Colonização.....	19
2.2.2 Material e métodos.....	21
2.2.2.1 Obtenção do isolado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e preparo da suspensão de conídios.....	22
2.2.2.2 Inoculação e coleta das amostras.....	22
2.2.2.3 Preparo das amostras para análise ao microscópio eletrônico de varredura.....	23
2.2.2.4 Preparo das amostras para análise ao microscópio eletrônico de transmissão.....	24
2.2.3 Resultados.....	24
2.2.3.1 Adesão, germinação de conídio e apressório.....	24
2.2.3.2 Colonização.....	30
2.2.4 Discussão.....	32
2.3 Conclusões.....	35
Referências.....	35

3 PRÉ-PENETRAÇÃO E PENETRAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EM FRUTOS DE GOIABEIRA (<i>Psidium guajava</i> L.): EFEITO DA TEMPERATURA, PERÍODO DE MOLHAMENTO E IDADE DE FRUTOS.....	41
Resumo.....	41
Abstract.....	42
3.1 Introdução.....	43
3.2 Desenvolvimento.....	44
3.2.1 Revisão Bibliográfica.....	44
3.2.1.1 Cultura da goiabeira.....	44
3.2.1.2 Antracnose da goiaba.....	45
3.2.1.3 Quiescência.....	46
3.2.1.4 Condições ambientais.....	49
3.2.2 Material e métodos.....	50
3.2.2.1 Implantação dos experimentos.....	51
3.2.2.2 Obtenção do isolado e preparo da suspensão de conídios.....	51
3.2.2.3 Temperatura e período de molhamento: Pré-penetração de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides in vitro</i>	51
3.2.2.4 Temperatura e período de molhamento: Pré-penetração de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides in vivo</i>	52
3.2.2.5 Frutos de goiabeira com diferentes idades: Pré-penetração e penetração.....	53
3.2.2.6 Frutos de goiabeira com diferentes idades: Alteração morfológica e química..	55
3.2.2.7 Análise estatística.....	56
3.2.3 Resultados.....	57
3.2.3.1 Temperatura e período de molhamento: Pré-penetração de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides in vitro</i>	57
3.2.3.2 Temperatura e período de molhamento: Pré-penetração de conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides in vivo</i>	60
3.2.3.3 Frutos de goiabeira com diferentes idades: Pré-penetração e penetração.....	64
3.2.3.4 Frutos de goiabeira com diferentes idades: Alteração morfológica e química..	66
3.2.4 Discussão.....	69
3.3 Conclusões.....	74

Referências.....	74
4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA DURAÇÃO DO PERÍODO DE MOLHAMENTO NA PRÉ-PENETRAÇÃO DE <i>Colletotrichum acutatum</i> EM FOLHAS DE CITROS.....	82
Resumo.....	82
Abstract.....	83
4.1 Introdução.....	84
4.2 Desenvolvimento.....	86
4.2.1 Revisão Bibliográfica.....	86
4.2.1.1 Citricultura.....	86
4.2.1.2 Podridão Floral dos Citros.....	86
4.2.1.3 Antracnose do limoeiro galego.....	89
4.2.2 Material e métodos.....	89
4.2.2.1 Obtenção dos isolados e preparo da suspensão fúngica.....	89
4.2.2.2 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na pré-penetração de <i>Colletotrichum acutatum in vitro</i>	90
4.2.2.3 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na pré-penetração de <i>Colletotrichum acutatum in vivo</i>	91
4.2.2.4 Efeito de substâncias presentes na pétala na pré-penetração de <i>Colletotrichum acutatum in vivo</i>	92
4.2.3 Resultados.....	93
4.2.4 Discussão.....	107
4.3 Conclusões.....	110
Referências.....	111

RESUMO

Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros

O objetivo do trabalho foi determinar o efeito da temperatura e período de molhamento no processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum* em goiaba e folhas de citros, respectivamente, além de evidenciar o processo de colonização de *C. gloeosporioides*. Para determinar o processo de infecção em diferentes combinações de temperatura e períodos de molhamento, suspensões de conídios de *C. gloeosporioides* foram depositadas em placas de poliestireno e incubadas sob temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C, com período de molhamento de 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Para *C. acutatum*, as placas foram incubadas sob temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C, com períodos de molhamento de 6, 12, 24, 36 e 48 horas. *In vivo*, suspensões de conídios de *C. gloeosporioides* foram depositadas na superfície de goiabas que foram incubadas sob temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C e períodos de molhamento de 6, 12 e 24 horas. Folhas de citros foram inoculadas com suspensões de dois isolados de *C. acutatum* e incubadas sob temperatura de 15, 20, 25 e 30 °C e períodos de molhamento de 12, 24 e 48 horas. Para os estudos do processo de colonização, goiabas com 110 dias após a queda das pétalas foram inoculadas e incubadas a 25 °C e períodos de molhamento de 48, 72, 96 e 120 horas. Posteriormente, frutos com 10, 35, 60 e 85 dias também foram inoculados e incubados a 25 °C por 48 horas. Para visualizar estruturas do tecido vegetal e fenóis, secções de frutos com as diferentes idades foram coradas com azul de toluidina e ACN. As temperaturas ótimas *in vitro* para germinação de *C. gloeosporioides*, apressórios formados e melanizados foram, respectivamente, 22,7, 20,6 e 23 °C. Para o isolado KLA-MGG-1 de *C. acutatum* foi 23,9 °C para germinação e 23,5 °C para formação de apressórios, enquanto para o isolado FSH-CLB-2 foi 21,6 °C para ambas as variáveis. Em goiaba, as temperaturas ótimas para germinação de *C. gloeosporioides* e formação de apressórios foram 22,4 e 23,3 °C, respectivamente. Em folhas de laranjeira, as temperaturas ótimas para os isolados KLA-MGG-1 e FSH-CLB-2 foram, respectivamente, 24,1 e 24 °C para germinação e 21,2 e 23 °C para formação de apressórios. Para folhas de limoeiro, foram 18,1 °C para germinação e 16,2 °C para formação de apressórios do isolado KLA-MGG-1. Para o isolado FSH-CLB-2, as temperaturas ótimas foram 24,4 e 23,7 °C, respectivamente. A estratégia de colonização de *C. gloeosporioides* foi intracelular hemibiotrófica. Em amostras com 48 h após a inoculação, foi verificado o *peg* de penetração. Com 72 horas, observou-se a formação da vesícula de infecção. As hifas foram observadas em amostras com 96 h após inoculação. As mesmas estruturas fúngicas alcançaram as células parenquimáticas com 120 horas após inoculação. O *peg* de penetração foi observado apenas em frutos com 85 e 110 dias. Estruturas do tecido vegetal e fenóis foram alterados com a idade dos frutos.

Palavras-chave: *Psidium guajava*; Microscopia eletrônica; Pré-penetração; Penetração; Ultraestrutura; Antracnose; Podridão floral dos citros; Antracnose do limão galego; Quiescente

ABSTRACT

Infection and colonization of *Colletotrichum gloeosporioides* in guava fruits and infection of *Colletotrichum acutatum* on citrus leaves

The objective of this study was to determine the effect of temperature and the wetness periods in the infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* in guava and citrus leaves, respectively, besides evidencing the colonization process of *C. gloeosporioides*. To determine the infection process at different temperature and wetness periods combinations, conidial suspensions of *C. gloeosporioides* were deposited on polystyrene dishes and incubated at 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 °C with wetness periods of 6, 12, 24, 36 and 48 h. For *C. acutatum*, the dishes were incubated at 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C, with wetness periods of 6, 12, 24, 36 and 48 h. *In vivo* conidial suspensions of *C. gloeosporioides* were placed on the surface of guavas which were incubated at 10, 15, 20, 25 and 30 °C with wetness periods of 6, 12 and 24 h. The citrus leaves were inoculated with suspensions of two isolates of *C. acutatum* and incubated at 15, 20, 25 and 30 °C with wetness durations of 12, 24 and 48 h. For the analysis on the colonization process, physiological mature guava fruits were inoculated and incubated at 25 °C with wetness periods of 48, 72, 96 and 120 h. Afterward, fruits with 10, 35, 60 and 85 days were also inoculated and incubated at 25 °C for 48 hours. To visualize the structures of vegetal tissues and phenols, sections of fruits at different ages were colored in toluidine blue and ACN. Optimal temperature for conidial germination, appressoria formation and appressoria melanization for *C. gloeosporioides* were, respectively, 22.7, 20.6 and 23.0 °C. For *C. acutatum* isolate KLA-MGG-1, they were 23.9 °C for germination and 23.5 °C for appressoria formation and for isolate FSH-CLB-2 it was 21.6 °C for both variable. In guava, the temperatures for germination of *C. gloeosporioides* and appressoria formation were 22.4 and 23.3 °C, respectively. In leaves of orange trees, the optimal temperatures for the isolates KLA-MGG-1 and FSH-CLB-2 were, respectively, 24.1 and 24 °C for germination and 21.2 and 23 °C for appressoria formation. In leaves of lemon trees, they were 18.1 °C for germination and 16.2 °C for appressorial production of isolate KLA-MGG-1. For isolate FSH-CLB-2, the optimal temperatures were 24.4 and 23.7 °C, respectively. The colonization strategy of *C. gloeosporioides* was intracellular hemibiotrophic. The penetration peg was verified in samples 48 h after inoculation. After 72 h, it was observed formation of infection vesicle. The hyphae were observed in samples 96 h after inoculation. The same fungal structures reached the parenchymal cells 120 hours after inoculation. The penetration peg was observed only in fruits with 85 and 110 days. Structures of guava tissues and phenols were changed with the fruit aging.

Keywords: *Psidium guajava*; Electron microscopy; Pre-penetration; Penetration; Ultrastructure; Anthracnose; Postbloom fruit drop; Key lime anthracnose; Quiescence

1 INTRODUÇÃO

Colletotrichum é um dos mais importantes gêneros de fitopatôgenos. Apresenta ampla distribuição geográfica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BAILEY; JEGER, 1992). Os prejuízos causados por *Colletotrichum*, resultam na redução direta da qualidade e/ou quantidade dos produtos, e também no aumento do custo de produção. Além disso, incidem diretamente no período pós-colheita em que as infecções quiescentes não são detectadas durante o cultivo e nem são controladas no campo (JEFFRIES et al., 1990; SKIPP et al., 1995).

As espécies de *Colletotrichum* atacam diferentes partes das plantas como raízes, hastes, brotos, folhas, flores e frutos (BAILEY et al., 1992).

Em goiaba, a qualidade do fruto na pós-colheita é afetada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz e Sacc, agente causal da antracnose, também conhecida como mancha chocolate. Os sintomas da doença caracterizam-se por lesões arredondadas, necróticas e encharcadas de coloração marrom clara na superfície dos frutos. Com a evolução da doença, essas ficam deprimidas e crescem, com formato irregular e, posteriormente coalescem podendo atingir todo o fruto. Sob condições de alta umidade é possível observar sinais do patógeno de coloração alaranjada, que corresponde à matriz mucilaginosa onde estão os conídios (PEREIRA; MARTINEZ JÚNIOR, 1986; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

Em citros, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds causa duas doenças distintas em diferentes espécies de citros, a podridão floral dos citros (PFC) e a antracnose do limoeiro galego (KLA) (TIMMER; BROWN, 2000). Os sintomas da podridão floral dos citros caracterizam-se por lesões necróticas nas pétalas, queda de frutos e formação de cálices e pedúnculos persistentes (FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER, et al., 1994). A antracnose do limoeiro galego causa doença nas pétalas como descrito para PFC, no entanto, afeta também folhas jovens, brotos e frutos. Os sintomas são lesões necróticas e queima do tecido jovem (PERES et al., 2008; TIMMER; BROWN, 2000).

Os processos de infecção e colonização das espécies de *Colletotrichum* envolvem essencialmente os mesmos eventos e podem ser sumarizados pela deposição do conídio na superfície da planta, adesão do conídio, germinação do

conídio, alongação do tubo germinativo, formação do apressório, desenvolvimento do *peg* de penetração, penetração nas células epidérmicas, crescimento e colonização do tecido vegetal e finalmente a necrose e desenvolvimento de lesão (JEFFRIES et al., 1990; PERFECT et al., 1999; PRUSKY et al., 2000). No entanto, o estabelecimento desses processos depende do equilíbrio dinâmico entre o patógeno, hospedeiro e meio ambiente (JARVIS, 1994).

Dessa forma, considerando a importância das doenças causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira e *C. acutatum* em citros e a falta de informações sobre essas fases do ciclo para esses patossistemas, os objetivos desse trabalho foram: (i) investigar os eventos ocorridos durante a pré-penetração, penetração e colonização de *C. gloeosporioides* em frutos de goiabeira; (ii) identificar as condições ambientais (combinação de diferentes temperaturas e períodos de molhamento contínuo) favoráveis a pré-penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum in vitro* e *in vivo*; (iii) verificar efeito da idade dos frutos de goiabeira no estabelecimento de *C. gloeosporioides*; (iv) evidenciar as alterações anatômicas e químicas que ocorrem com o amadurecimento do fruto de goiabeira e suas possíveis relações com o parasitismo de *C. gloeosporioides*.

Referências

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. **Colletotrichum**: Biology, pathology and control. England: CAB Internacional Wallingford, 1992. 388p.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum**: Biology, pathology and control. England: CAB Internacional Wallingford, 1992. chap.5, p.1-26.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Ceres. 2005. v. 2, cap. 28, p. 239-269.

JARVIS, W.R. Latent infections in the pre- and postharvest environment. **HortScience**, St. Joseph, v. 29, p. 749-751, 1994.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M.J.; PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, London, v. 39, p. 343-366, 1990.

PEREIRA, F.M.; MARTINEZ JÚNIOR, M. **Goiabas para industrialização**. Jaboticabal: Editora Legis Summa, 1986. 142p.

PERES, N.A.; MACKENZIE, S.J.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 98, p. 345-352, 2008.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum* - A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, p. 186-198, 1999.

PICCININ, E; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças da goiabeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M; .BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Ceres, 2005. v. 2, cap. 44, p. 401-409.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. ***Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Minnesota: APS Press, 2000. 393 p.

SKIPP, R.A.; BEEVER, R.E.; SHARROCK, K.R.; RIKKERINK, E.H.A.; TEMPLENTON, M.D. *Colletotrichum*. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U.S.; SINGH, R.P. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Oxford: Pergamon/Elsevier, 1995. v.2, p. 119-142.

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: Prusky, D.; Freeman, S.; Dickman, M.B. (Ed.). ***Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction**. Saint Paul: APS Press, 2000. p. 300-316.

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

2 HISTOPATOLOGIA DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM FRUTOS DE GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.)

Resumo

Colletotrichum gloeosporioides é o agente causal da antracnose em goiaba. Os processos de infecção e colonização de *C. gloeosporioides* foram estudados usando microscópio eletrônico de varredura e transmissão. Frutos em plena maturação fisiológica foram inoculados com suspensão de 10^5 conídios de *C. gloeosporioides*/mL. Posteriormente, os frutos foram incubados a 25 °C sob período de molhamento de 6, 12 e 24 horas para o estudo do processo de infecção, e de 48, 72, 96 e 120 horas para o estudo do processo de colonização. Conídios germinados e não germinados, tubos germinativos e apressórios aderiram à superfície do hospedeiro. Germinação de conídios e formação de apressórios ocorreram 6 horas após a inoculação. A penetração ocorreu diretamente, por meio da formação do *peg* de penetração emitido da base do apressório. O apressório não produziu o cone apressorial ao redor do poro de penetração. O *peg* de penetração emergiu do poro e penetrou na cutícula após 48 horas da inoculação. Após 72 horas da inoculação, observou-se a formação da vesícula de infecção. Em amostras com 96 horas após a inoculação, além das vesículas observou-se as hifas primárias multilobadas e multisseptadas localizadas no interior das células epidérmicas. As mesmas estruturas fúngicas foram encontradas nas células epidérmicas e parenquimáticas do hospedeiro, em amostras com 120 horas após a inoculação. Nesse período, o tecido vegetal estava totalmente degenerado indicado pela desorganização celular e presença de material elétron-denso no lúmen da célula.

Palavras-chave: Pré-penetração; Penetração; Colonização; Ultraestrutura

HISTOPATHOLOGY OF *Colletotrichum gloeosporioides* ON GUAVA FRUITS (*Psidium guajava* L.)

Abstract

Colletotrichum gloeosporioides is causal agent of anthracnose on guava fruit. Infection and colonization processes of *Colletotrichum gloeosporioides* have been studied using scanning and transmission electron microscopy. Fruits at the physiological mature stage were inoculated with a 10^5 conidia/mL spore suspension. Afterward, fruits were incubated to 25 °C at wetness periods of 6, 12 and 24 h to study the infection process; and at 48, 72, 96 and 120 h to study the colonization process. Conidia germination and appressoria formation occurred 6 h after inoculation. Appressoria were formed on the ends of germ tubes or were sessile. Penetration occurred directly via penetration pegs originating from appressoria. The appressoria did not produce the appressorial cone surrounding the penetration pore. The penetration peg emerged from the pore and penetrated the host cuticle 48 h after inoculation. Formation of infection vesicles was observed at 72 h. After 96 h, besides intracellular vesicles it was observed primary multilobed and multiseptated hyphae. The same fungal structures were found in epidermal and parenchymal cells of the host 120 h after the inoculation. At this time, the vegetal tissue was completely degenerated indicated by the cellular disorganization and presence of electron dense material in the cell lumen.

Keywords: Pre-penetration; Penetration; Colonization; Ultrastructure

2.1 Introdução

Antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz e Sacc., é uma das principais doenças da goiabeira em todos os países produtores, causando perdas consideráveis em pós-colheita (LIM; MANICOM, 2003). É caracterizada pelo desenvolvimento de lesões necróticas, deprimidas, encharcadas, com formato irregular e de coloração marrom na superfície dos frutos. Sob condições de alta umidade, uma massa alaranjada de conídios se desenvolve sobre o centro das lesões (BAILEY; JEGER, 1992; PEREIRA; MARTINEZ JÚNIOR, 1986; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

Colletotrichum spp. penetra na planta hospedeira por aberturas naturais, como os estômatos, por ferimentos e/ou por penetração direta na cutícula, por meio da formação de apressório (BAILEY et al., 1992). Após a invasão da planta hospedeira, o patógeno pode apresentar duas diferentes estratégias de colonização. Colonização intracelular hemibiotrófica ou colonização subcuticular intramural ou ainda, alternativamente, combina ambas as estratégias de colonização (BAILEY et al., 1992). *Colletotrichum trifolii* e *C. lindemuthianum* exibem a colonização intracelular hemibiotrófica. Esses patógenos penetram na célula epidérmica de alfafa e feijão, respectivamente, e posteriormente formam a vesícula de infecção esférica. A partir da vesícula, formam-se as hifas primárias e subsequentemente ocorre à colonização de outras células do hospedeiro (MOULD; BOLAND; ROBB, 1991; O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). Nesse modelo de nutrição, inicialmente o fungo cresce biotroficamente, sem a presença de sintomas, e posteriormente, na fase necrotrófica, o fungo causa degradação das células do hospedeiro, surgindo os sintomas (LATUNDE-DADA et al., 1996; O'CONNELL et al., 2000).

Colletotrichum acutatum e *C. fragariae* em morango (CURRY et al., 2002) e *C. capsici* em feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*) (PRING et al., 1995) apresentam colonização subcuticular intramural. Após a penetração da cutícula, o patógeno cresce abaixo da cutícula e dentro da parede periclinal e anticlinal das células epidérmicas, causando dissolução da parede celular. No entanto, não está claro se subsequentemente a célula permanece viva (O'CONNELL et al., 2000). Outras espécies

exibem ambas as estratégias de colonização no mesmo tecido vegetal. Exemplos de patógeno com essa estratégia incluem *C. gloeosporioides* colonizando abacate (COATES et al., 1993) e *C. acutatum* colonizando amêndoa (DIÉGUEZ-URIBEONDO et al., 2005).

Diante da falta de informação sobre o processo de infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira, os objetivos desse trabalho foram caracterizar os eventos de pré-penetração e penetração, além de identificar a estratégia de colonização da espécie. Para isso, as análises foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura e transmissão.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão bibliográfica

2.2.1.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

O gênero *Colletotrichum* é um dos mais importantes patógeno de plantas. São encontrados em ampla faixa do globo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Esse gênero causa perdas significativas em inúmeras culturas, como cereais, capins, hortaliças, ornamentais e culturas perenes, incluindo árvores frutíferas (BAILEY; JEGER, 1992; PRUSKY; FREEMAN; DICKMAN, 2000).

Em fruteiras, *Colletotrichum gloeosporioides* é uma das principais espécies do gênero, causando doença em inúmeros frutos, tais como abacate (BINYAMINI; SCHIFFMANN-NADEL, 1972), carambola (SEPIAH; PLOETZ; COOKE, 2003), goiaba (ADISA, 1985), graviola (MENEZES; HANLIN; 1996), mamão (DICKMAN; ALVAREZ, 1983), manga (FITZELL; PEAK, 1984), morango (HOWARD; ALBREGTS, 1983), maracujá (KAGIWATA, 1986), tangerina (BROWN, 1975). Esse patógeno infecta o fruto ainda no campo, porém o sintoma aparece apenas com o amadurecimento (JEFFRIES et al., 1990).

Colletotrichum gloeosporioides causa sintoma típico, comumente conhecido como antracnose, caracterizado pela formação de lesões necróticas deprimidas, de coloração marrom, os quais são subcirculares ou angular com a presença de matriz

mucilaginosa de coloração alaranjada onde encontram-se os conídios (BAILEY; JEGER, 1992). Os conídios são retos e cilíndricos com ápice obtusos e base truncada, medindo 12-17 μm x 3,5-6 μm . Os apressórios formados por essa espécie são clavados, ovados, obovados ou lobados, de coloração castanha e medindo 6-20 μm x 4-12 μm (SUTTON, 1992).

2.2.1.2 Infecção

O processo de infecção inicia-se com a deposição e germinação do patógeno e finaliza com o estabelecimento de relações parasitárias estáveis com o hospedeiro, ou seja, engloba os mecanismos de pré-penetração, penetração e estabelecimento de relações parasitárias (AMORIM, 1995; GAUMANN, 1950).

O evento de pré-penetração determina o sucesso da infecção. Inclui a aderência do conídio ao tecido vegetal, germinação do conídio, crescimento do tubo germinativo, aderência do tubo germinativo e, em alguns casos, a formação de estrutura especializada de infecção denominada apressório (EMMETT; PARBERY, 1975; HAMER et al., 1988).

A adesão do conídio é o evento inicial da patogênese, sendo essencial para o desenvolvimento do tubo germinativo e indução do apressório (tigmodiferenciação) (MERCURE; KUNOH; NICHOLSON, 1994; NICHOLSON; EPSTEIN, 1991). No entanto, a substância adesiva pode ocorrer em interações específicas patógeno-hospedeira, em um determinado estágio do conídio e do desenvolvimento do tubo germinativo ou ser considerada um fenômeno geral para o estabelecimento do fungo (NICHOLSON; EPSTEIN, 1991). Em estudos realizados com *Colletotrichum lindemuthianum*, os autores observaram a não especificidade da adesão, pois os mecanismos de adesão são similares em hipocótilo de feijão e em superfície de placa de poliestireno (YOUNG; KAUSS, 1984).

Em adição ao material adesivo, as estruturas fúngicas de algumas espécies são envolvidas por uma secreção fluida que adere e prepara a superfície do hospedeiro para a penetração (HOWARD, 1997; NICHOLSON; EPSTEIN, 1991).

Os mecanismos pelo qual as espécies de *Colletotrichum* penetram na superfície das plantas podem ser através de aberturas naturais, como os estômatos, por

ferimentos ou através de penetração direta na cutícula e epiderme (AGRIOS, 2005; BAILEY et al., 1992; JEFFRIES et al., 1990). Grande parte das espécies de *Colletotrichum* penetra diretamente, sendo a formação do apressório pré-requisito para a invasão da planta hospedeira. Por outro lado, há espécies em que a formação do apressório é opcional ou desnecessária (EMMETT; PARBERY, 1975). *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* penetra diretamente na cutícula de plantas da família Malvaceae (*Malva pusilla*, *Malva parviflora*, *Malva neglecta* e *Abutilon theophrasti*) por meio da emissão do peg de penetração (MORIN; DERBY; KOKKO, 1996). Por outro lado, *C. gloeosporioides* não penetra na cutícula das folhas de amora (*Morus* spp.) por meio do apressório. O patógeno desenvolve ramificações laterais do tubo germinativo que penetram nas aberturas estomáticas, onde formam as vesículas de infecção (KUMAR et al., 2001). A penetração de *C. gloeosporioides* em folhas de feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*) ocorre diretamente na cutícula por meio do apressório e através dos estômatos (BARRETO et al., 2007).

A penetração da cutícula, por meio do apressório, pode ser exercida por três mecanismos, os quais são baseados na força mecânica, na secreção de enzimas com capacidade de degradação da cutícula ou na combinação de ambos (BAILEY et al., 1992).

O estabelecimento da relação parasitária inicia-se com a retirada de nutrientes da planta pelo agente patogênico, marcando a transição entre infecção e colonização (AMORIM, 1995).

2.2.1.3 Apressório

Os apressórios formados pelo gênero *Colletotrichum* são frequentemente sésseis, ou seja, surgem diretamente do conídio, mas podem formar-se na extremidade de tubos germinativos ou de ramificações de hifas. Esse pode ser formado na superfície de plantas hospedeiras ou em superfície rígida tal como em lâminas de vidro ou membrana de nitrocelulose (BAILEY et al., 1992). O apressório torna-se inchado e vacuolado e separa-se do tubo germinativo pelo septo. O apressório jovem é hialino ou ligeiramente pigmentado, mas com a maturação, as paredes tornam-se espessas e escuras com o acúmulo de melanina (BARLEY et al., 1992; JEFFRIES et al., 1990).

Essa camada da parede, composta de melanina, envolve todo o apressório, exceto a região em contato com o substrato. A área com ausência de melanina é denominada de poro de penetração (HOWARD, 1994).

O apressório permite que o fungo penetre na cutícula do hospedeiro e na parede celular epidérmica por meio do *peg* de penetração que emerge da sua base (JEFFRIES et al., 1990; WHARTON; URIBEONDO, 2004). Durante a penetração na superfície do hospedeiro, o apressório de algumas espécies, como por exemplo *C. lagenarum* (XUEI; JÄRLEFORS; KUC, 1988) e *C. trifolii* (MOULD; BOLAND; ROBB, 1991), possui o poro de penetração rodeado por estrutura em formato de funil, denominado cone apressorial. Esse cone é a extensão da parede do *peg* de penetração e, pode auxiliar na pressão hidrostática influída no local de penetração (BAILEY et al., 1992). Em outras espécies, como por exemplo, *C. sublineolum* (WHARTON; JULIAN; O'CONNELL, 2001) e *C. graminicola* (POLITIS; WHEELER, 1973) o cone não foi observado, sugerindo que a variação dessa estrutura está associada com as diferenças na penetração em plantas hospedeiras.

2.2.1.4 Colonização

Os eventos de pré-penetração e penetração são similares para todas as espécies de *Colletotrichum*, no entanto após a penetração, duas diferentes estratégias de colonização podem ser encontradas, segundo Bailey et al. (1992): (i) intracelular hemibiótrfica e (ii) subcuticular intramural necrotrófica (Figura 1). Na primeira estratégia, o patógeno exibe duas fases. Durante a primeira fase, o patógeno cresce biotroficamente, sem a presença de sintomas, com o crescimento da hifa dentro do lúmen celular, sem penetração no protoplasma, formando a vesícula de infecção. A membrana plasmática da célula hospedeira torna-se invaginada sem quaisquer mudanças imediatas na ultraestrutura ou perda de sua propriedade vital de permeabilidade seletiva, e o citoplasma continua exibindo seu fluxo normal. Essa fase pode durar de 24 horas a 3 dias. Após a colonização de uma ou duas células, a hifa primária intracelular, formada a partir da vesícula, a qual é biotrófica, dá origem a hifa secundária necrotrófica, iniciando a segunda fase, chamada necrotrófica (LATUNDE-DADA et al., 1996; O'CONNELL et al., 2000). *Colletotrichum lindemuthianum*

colonizando feijão (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985), *C. trifolii* colonizando alfafa (MOULD, BOLAND; ROBB, 1991) e *C. gloeosporioides* colonizando feijão-fradinho (BARRETO et al., 2007) são exemplos de espécies que apresentam essa estratégia de colonização.

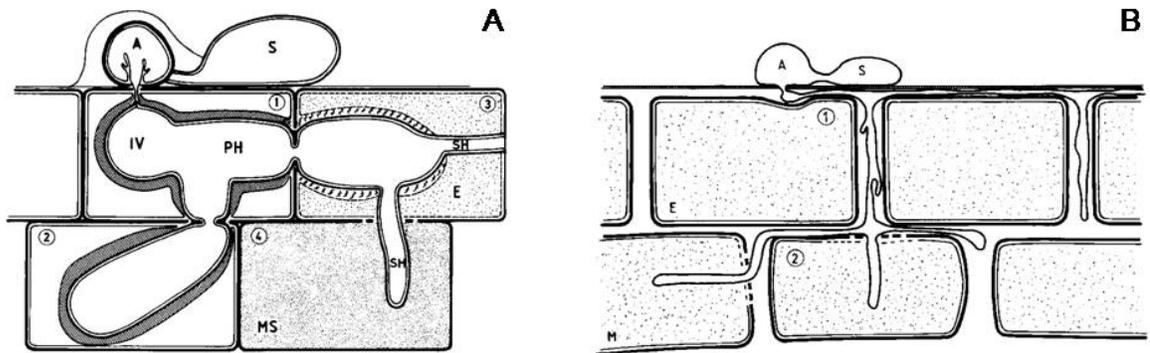


Figura 1 - Estratégias de colonização exibida por diferentes espécies de *Colletotrichum*. **A.** *C. lindemuthianum*, intracelular hemibiótrfica. O conídio (S) germina e forma na extremidade do tubo germinativo o apressório melanizado (A), o qual emite o *peg* de penetração. (1) Após a penetração na célula epidérmica, a hifa incha, forma a vesícula (IV) e posteriormente a hifa primária (PH). Ambas são envolvidas por matriz mucilagínosa. (2) Progressivamente, a hifa primária coloniza novas células epidérmicas (E) e do mesófilo (MS). (3) Aproximadamente 48 horas após a penetração, ocorre a formação da hifa secundária (SH). **B.** *C. capsici*, subcuticular intramural. O conídio (S) germina, forma o tubo germinativo e apressório melanizado (A). (1) A cutícula do hospedeiro é rompida pelo *peg* de penetração e a hifa desenvolve-se subcuticularmente. (2) Em estágio mais avançado, a hifa penetra nas células epidérmicas (E) e do mesófilo (M) (PERFECT et al., 1999)

A estratégia de colonização subcuticular intramural é caracterizada pelo crescimento do patógeno abaixo da cutícula e dentro da parede periclinal e anticlinal das células epidérmicas. Não há fase biotrófica nessa interação. Esse tipo de estratégia não está associado com a produção de hifa primária e secundária distintas morfologicamente (O'CONNELL et al., 2000). Exemplos de patógeno com essa estratégia incluem *C. gloeosporioides* em mamão (CHAU; ALVAREZ, 1983), *C. acutatum* e *C. fragariae* em morango (CURRY et al., 2002) e *C. capsici* em feijão-fradinho (PRING et al., 1995).

Outras espécies de *Colletotrichum* combinam ambas as estratégias de infecção, produzindo hifa intracelular e subcuticular no mesmo tecido. Como exemplo, *C.*

gloeosporioides colonizando abacate (COATES et al., 1993) e *C. acutatum* colonizando amêndoa (DIÉGUEZ-URIBEONDO et al., 2005).

Em estudos realizados com *Colletotrichum acutatum*, foi observado que a estratégia de colonização adotada pelo patógeno depende do hospedeiro. Assim, estolões e folhas de morango inoculadas com *C. acutatum* exibem colonização subcuticular intramural necrotrófica. Enquanto que, em blueberry e amêndoa, o fungo adota a colonização subcuticular intramural necrotrófica e intracelular hemibiótrfica (CURRY et al., 2002; DIÉGUEZ-URIBEONDO et al., 2005; WHARTON; SCHILDER, 2008). Esse patógeno também pode alterar a estratégia de colonização de acordo com o tecido vegetal ou cultivar. Por exemplo, em amêndoa, foi observado diferença na colonização de pétala e folha (DIÉGUEZ-URIBEONDO et al., 2005). Em blueberry, *C. acutatum* exhibe colonização intracelular hemibiotrófica quando inoculado em genótipo suscetível e colonização subcuticular intramural em genótipo resistente (WHARTON; SCHILDER, 2008).

Outra característica que permite a diferenciação entre espécie de *Colletotrichum* é a morfologia das hifas primárias intracelulares. *Colletotrichum destructivum* e *C. truncantum* produzem hifas intracelulares confinadas à célula epidérmica infectada inicialmente. Nesses casos, as hifas intracelulares são dilatadas, multisseptadas e multilobadas. Entretanto, a hifa intracelular de *C. linicola*, patógeno de linho, é intensamente lobada, menos ramificada e mais longa, quando comparada com *C. destructivum* ou *C. truncantum* (LATUNDE-DADA et al., 1996; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2007).

2.2.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia do Setor de Fitopatologia e no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba/SP.

2.2.2.1 Implantação dos experimentos

Para a realização dos experimentos, foram utilizados frutos de goiabeira com 110 dias após queda das pétalas, da variedade 'Kumagai', provenientes do Sítio Maracujá II, no município de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil.

Os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos, lavados em água corrente, secos e acondicionados em bandejas plásticas transparente previamente desinfestadas com álcool 70%. Em seguida, foram realizados os procedimentos de inoculação na superfície dos frutos.

2.2.2.2 Obtenção do isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* e preparo da suspensão de conídios

Um isolado de *C. gloeosporioides*, obtido de fruto de goiabeira doente, coletado de plantio comercial, foi cultivado, inicialmente em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e posteriormente identificado por PCR, por meio de primer específico (CgInt) segundo metodologia descrita por Mills; Sreenivasaprasad e Brown (1992). Em seguida, foi transferido para meio de aveia e incubado sob luz contínua e temperatura ambiente.

Após o crescimento micelial, discos de 0,5 cm de diâmetro do meio de cultura com o patógeno foram retirados e colocados sobre frutos de goiabeira sadios. Posteriormente, frutos foram colocados em bandejas plásticas juntamente com chumaço de algodão úmido para manter a umidade e deixados em temperatura ambiente para obtenção dos conídios. Após aproximadamente oito dias, os conídios foram coletados, por meio de lavagem das lesões, e preparada a suspensão de 10^5 conídios/mL de água destilada, com o auxílio da câmara de Neubauer.

2.2.2.3 Inoculação e coleta das amostras

Alíquotas de 40 μ L da suspensão de conídios foram depositadas sobre a superfície de frutos, em local previamente demarcado, com o auxílio de adesivo (círculos de 0,5 cm de diâmetro). Em seguida, os frutos foram acomodados em bandejas plásticas, contendo 3 folhas de papel de filtro saturadas com água e incubados a 25 °C e períodos contínuos de molhamento de 6, 12 e 24 horas para o estudo do processo de infecção, e de 48, 72, 96 e 120 horas para o estudo do processo

de colonização, utilizando-se de técnicas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), respectivamente.

Para analisar ao microscópio, após os períodos estabelecidos, foram retirados, com o auxílio de bisturi, amostras do tecido vegetal inoculado. Essas amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo solução fixadora de Karnovsky modificada (2,5% glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M – pH 7,2 e CaCl_2 0,001M) e armazenadas em geladeira por período mínimo de 48 horas, sendo, em seguida, processadas segundo técnicas usuais no NAP/MEPA, ESALQ-USP.

Parte das amostras que permaneceram incubadas a 25 °C por 24 horas foram colocadas em recipiente de vidro e submetidas ao ultra-som modelo Branson 2210R-DTH por 15 minutos, após fixação em solução fixadora de Karnovsky modificada. Subseqüentemente, as amostras foram processadas para visualização em microscópio eletrônico de varredura. Esse procedimento permitiu verificar se houve adesão do conídio e/ou do apressório na superfície das amostras.

2.2.2.4 Preparo das amostras para análise ao microscópio eletrônico de varredura

As amostras foram retiradas da solução fixadora de Karnovsky modificada, lavadas em solução tampão de cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2) por três vezes, durante 10 minutos e transferidas para solução de tetróxido de ósmio 1% em água por duas horas. Subseqüentemente, foram lavadas em água destilada e desidratadas em série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%), durante 10 minutos em cada concentração. Ao final, mais duas imersões em acetona 100% (10 minutos cada) foram realizadas para garantir a total desidratação dos tecidos. Em seguida, iniciou a secagem ao ponto crítico, por meio de imersão das amostras em gás carbônico líquido, em aparelho Balzers modelo CPD 030 (Balzers, Lichtenstein) e posterior fixação em suportes de alumínio (“stubs”), com a ajuda de fita de carbono dupla face. Após esse passo, procedeu-se à metalização com vapor de ouro em equipamento Balzers modelo MED 010 (Balzers Union, Lichtenstein), a 50 mA, por 180 segundos. A visualização das amostras foi realizada ao microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss modelo DSM 940A (Carl Zeiss, Alemanha) e registradas em arquivo eletrônico.

2.2.2.5 Preparo das amostras para análise ao microscópio eletrônico de transmissão

As amostras foram processadas como descrito para microscopia eletrônica de varredura, até a fixação em ósmio 1% por duas horas. Posteriormente, as amostras foram cortadas em pedaços de aproximadamente 0,1 x 0,3 cm, e contrastadas “em bloc” com acetato de uranila 0,5% por uma noite, desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 10 minutos em cada concentração. Posteriormente, a infiltração das amostras em resina epóxica de baixa viscosidade (Spurr) foi iniciada com a pré-infiltração de resina e acetona na proporção 1:1 por aproximadamente quatro horas. Em seguida, as amostras foram mantidas em resina pura durante uma noite, em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras permaneceram na estufa (70 °C) por 72 horas. Os bloquinhos resultantes foram desbastados em Trimmer Leica (Leica, Áustria) e seccionados em ultramicrótomo Leica Ultracut UCT (Leica, Áustria).

Inicialmente, foram realizados cortes semi-finos (300 ηm), com navalha de vidro, com o objetivo de visualizar as estruturas fúngicas de infecção, ao microscópio de luz, para orientação dos cortes ultrafinos. Posteriormente, com o auxílio de navalha de diamante (Diatome 45°), foram obtidas as secções ultrafinas (60-70 ηm). Essas secções foram depositadas sobre telinhas de cobre (100 mesh) previamente recobertas com película de “formvar” e contrastadas com acetato de uranila (3%) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), durante 15 minutos cada um. Em seguida foram lavadas com água destilada e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 (Carl Zeiss, Alemanha) e fotodocumentadas em arquivo eletrônico e filme fotográfico.

2.2.3 Resultados

2.2.3.1 Adesão, germinação de conídios e apressório

Conídios germinados e não germinados, tubos germinativos e apressórios aderiram à superfície dos frutos inoculados, após 6 horas da inoculação (Figura 2A-F). Na figura 2D observou-se restos de material adesivo extracelular sobre o fruto, no local

onde o conídio foi removido. Após o uso do ultra-som, apenas os apressórios permaneceram aderidos à superfície do hospedeiro (Figura 2E).

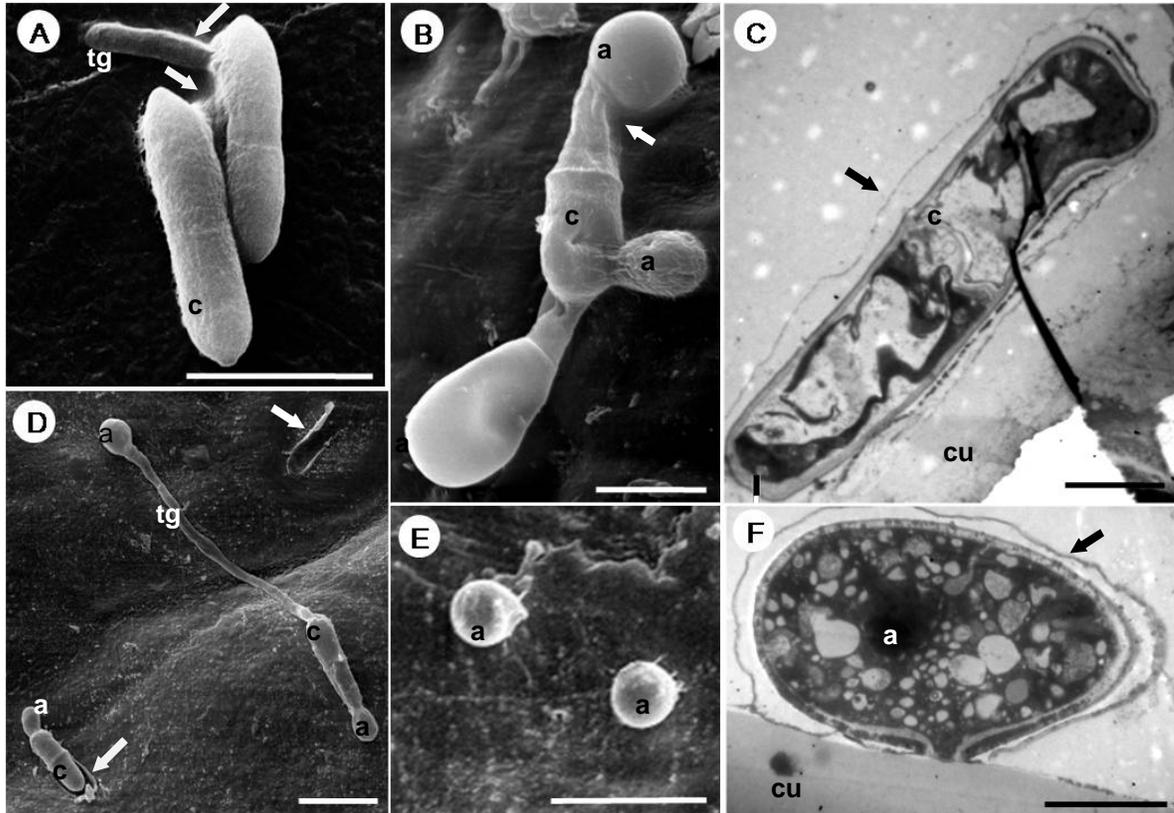


Figura 2 - Imagens ao microscópio eletrônico de varredura e transmissão mostrando a adesão de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*. **A.** Material adesivo extracelular (seta) próximo aos conídios e tubo germinativo, seis horas após a inoculação (Barra = 10 μ m); **B.** Material adesivo (seta) próximo ao conídio e apressórios na superfície do hospedeiro, 12 horas após a inoculação (Barra = 5 μ m); **C.** Conídio envolvido por material adesivo (seta) após 48 horas da inoculação (Barra = 2 μ m); **D.** Conídios, tubo germinativo, apressórios e restos do material adesivo (seta) sobre a superfície do hospedeiro, após 24 horas da inoculação (Barra = 10 μ m); **E.** Apressórios aderidos à superfície do fruto após tratamento em ultra-som por 15 minutos (Barra = 10 μ m); **F.** Conídio envolvido por material adesivo (seta) após 48 horas da inoculação. a = apressório; c = conídio; cu = cutícula; tg = tubo germinativo

O conídio de *C. gloeosporioides* é asseptado, porém tornou-se septado durante a germinação (Figura 3A-B). A germinação do conídio foi observada seis horas após a inoculação, por meio da formação do tubo germinativo ou apressório (Figura 3D). Usualmente, o conídio forma somente um tubo germinativo, porém mais de um tubo pode ser formado, podendo esse ser ramificado ou não (Figuras 3C, E, I e J). O tubo germinativo pode ser emitido tanto na extremidade do conídio quanto lateralmente,

predominantemente do lado oposto ao hilo (Figura 3F-G). O tamanho do tubo germinativo mostrou-se variável, podendo até mesmo ser ausente nos casos de germinação por meio de apressórios sésseis (Figura 3D).

Houve formação de septo entre o conídio e o tubo germinativo (Figura 3E) e entre o tubo germinativo e o apressório (Figuras 3H e 4A-B). Com a maturação do apressório, o material do conídio e do tubo germinativo migrou para essa estrutura (Figura 3G-H).

A penetração ocorreu diretamente, por meio da formação do *peg* de penetração emitido da base do apressório. Não ocorreu penetração por estômatos. O crescimento do tubo germinativo e a formação dos apressórios sobre a superfície dos frutos não foram direcionados pelos estômatos (Figura 3J).

Os apressórios foram sésseis ou formados na extremidade dos tubos germinativos (Figura 3D). O apressório desenvolveu-se em diferentes regiões do conídio e, possuiu diferentes formatos podendo ser esférico, irregular, lobado ou clavado (Figura 4B-F). O início da formação do apressório foi observada seis horas após a inoculação.

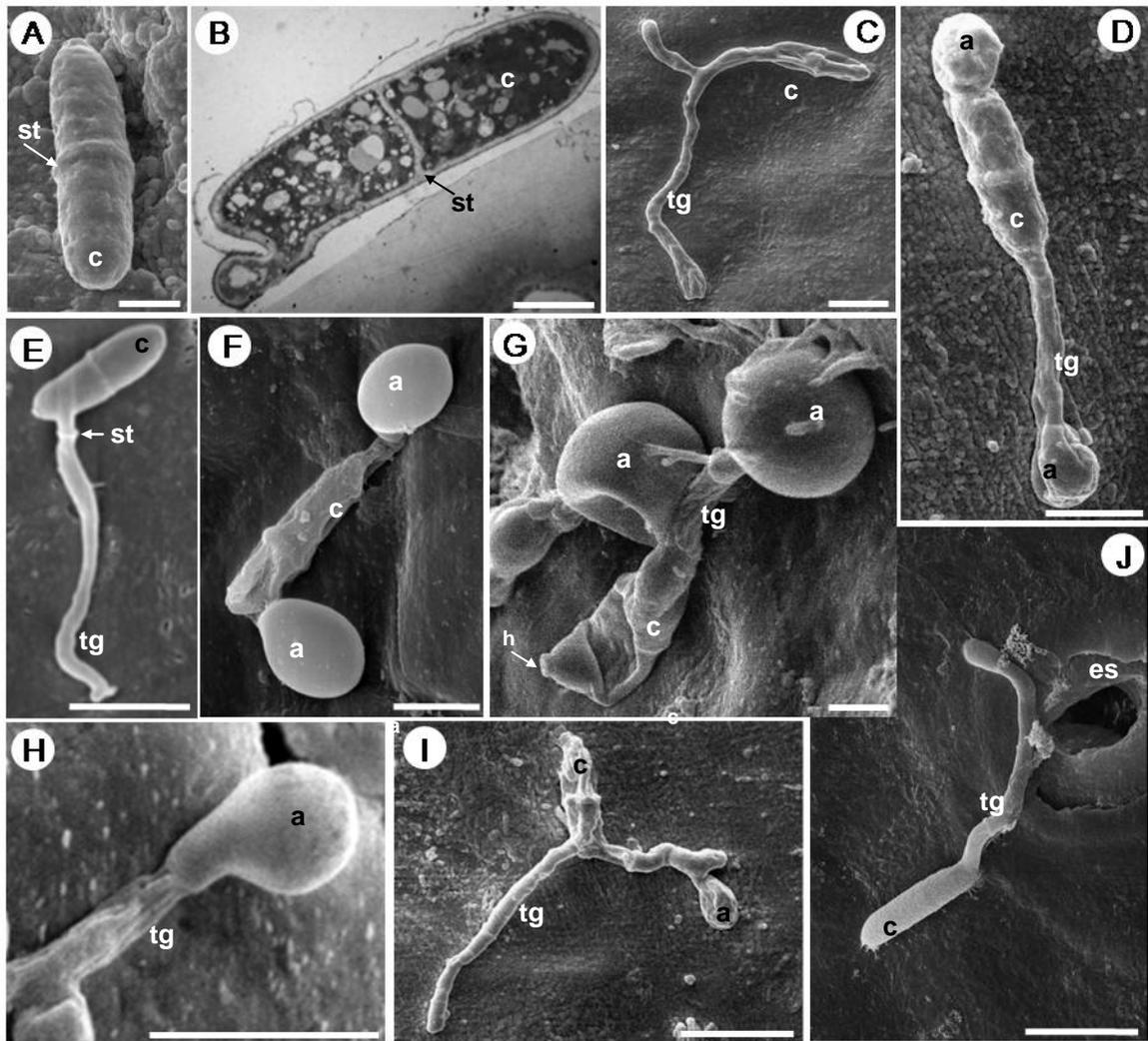


Figura 3 - Imagens ao microscópio eletrônico de varredura e transmissão mostrando a germinação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de goiabeira. **A e B.** Septo formado no conídio, após seis e 48 horas da inoculação, respectivamente (Barra = 2 μ m); **C.** Conídio e tubo germinativo ramificado, seis horas após a inoculação (Barra = 5 μ m); **D.** Apressório sésil e apressório emitido na extremidade do tubo germinativo, 12 horas após a inoculação (Barra = 10 μ m); **E.** Septo formado entre o conídio e o tubo germinativo, 12 horas após a inoculação (Barra = 10 μ m); **F.** Apressório emitido na extremidade e na lateral do conídio, 12 horas após a inoculação (Barra = 5 μ m); **G.** Conídio colapsado e hilo, após 24 horas da inoculação (Barra = 5 μ m); **H.** Tudo germinativo colapsado, 24 horas após a inoculação (Barra = 5 μ m); **I.** Conídio, apressório tubo germinativo ramificado, 24 horas após a inoculação (Barra = 10 μ m); **J.** Crescimento do tubo germinativo não direcionado ao estômato, 12 horas após a inoculação (Barra = 10 μ m). a = apressório; c = conídio; es = estômato; h = hilo; st = septo; tg = tubo germinativo

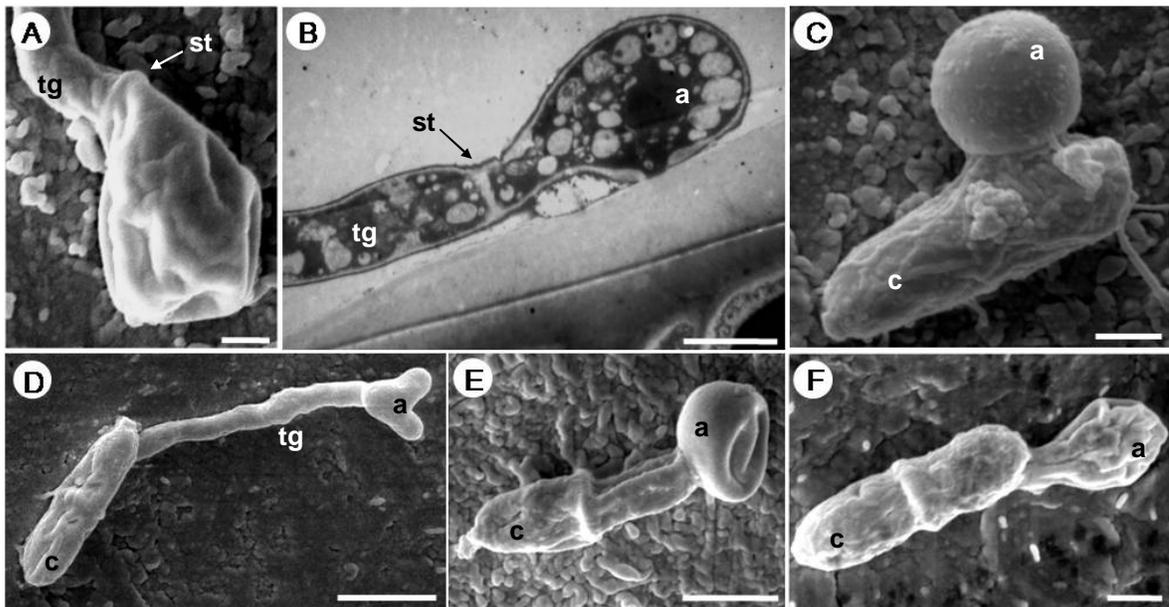


Figura 4 - Imagens ao microscópio eletrônico de varredura e transmissão mostrando o apressório de *C. gloeosporioides*. **A e B.** Septo formado entre o tubo germinativo e o apressório, seis e 48 horas após a inoculação, respectivamente (Barra = 1 e 2 μm , respectivamente); **C.** Conídio e apressório séssil com formato esférico, 24 horas após a inoculação (Barra = 2 μm); **D.** Conídios, tubo germinativo e apressórios, com formatos lobado, 24 horas após a inoculação (Barra = 5 μm); **E.** Conídio e apressório com formato irregular, 24 horas após a inoculação (Barra = 5 μm); **F.** Conídio e apressório com formato clavado, 24 horas após a inoculação (Barra = 2 μm). a = apressório; c = conídio; st = septo; tg = tubo germinativo

Estudos ultra-estruturais revelaram que os apressórios apresentam ribossomos, mitocôndrias e vacúolos (Figura 5A-D). No interior de alguns vacúolos foi observado conteúdo elétron-denso. O apressório foi envolvido por matriz extracelular, responsável pela adesão à superfície vegetal (Figura 5B). Em muitos casos, a área de contato do apressório com a superfície vegetal foi relativamente pequena. Parede celular do apressório foi composta por duas camadas distintas, mas posteriormente, uma terceira camada foi depositada na base do apressório entre a membrana plasmática e a camada da parede celular interna (Figura 5B-C), formando o poro de penetração (Figura 5A). A terceira camada foi contínua com a parede celular do *peg* de penetração, o qual emerge através do poro e penetra diretamente na cutícula e na parede celular da planta hospedeira (Figura 5C-D). Não houve formação do cone apressorial. O *peg* de penetração foi formado, mas a estrutura da cutícula permaneceu intacta na região próxima ao poro, sugerindo que não houve degradação da cutícula por enzimas extracelulares do patógeno.

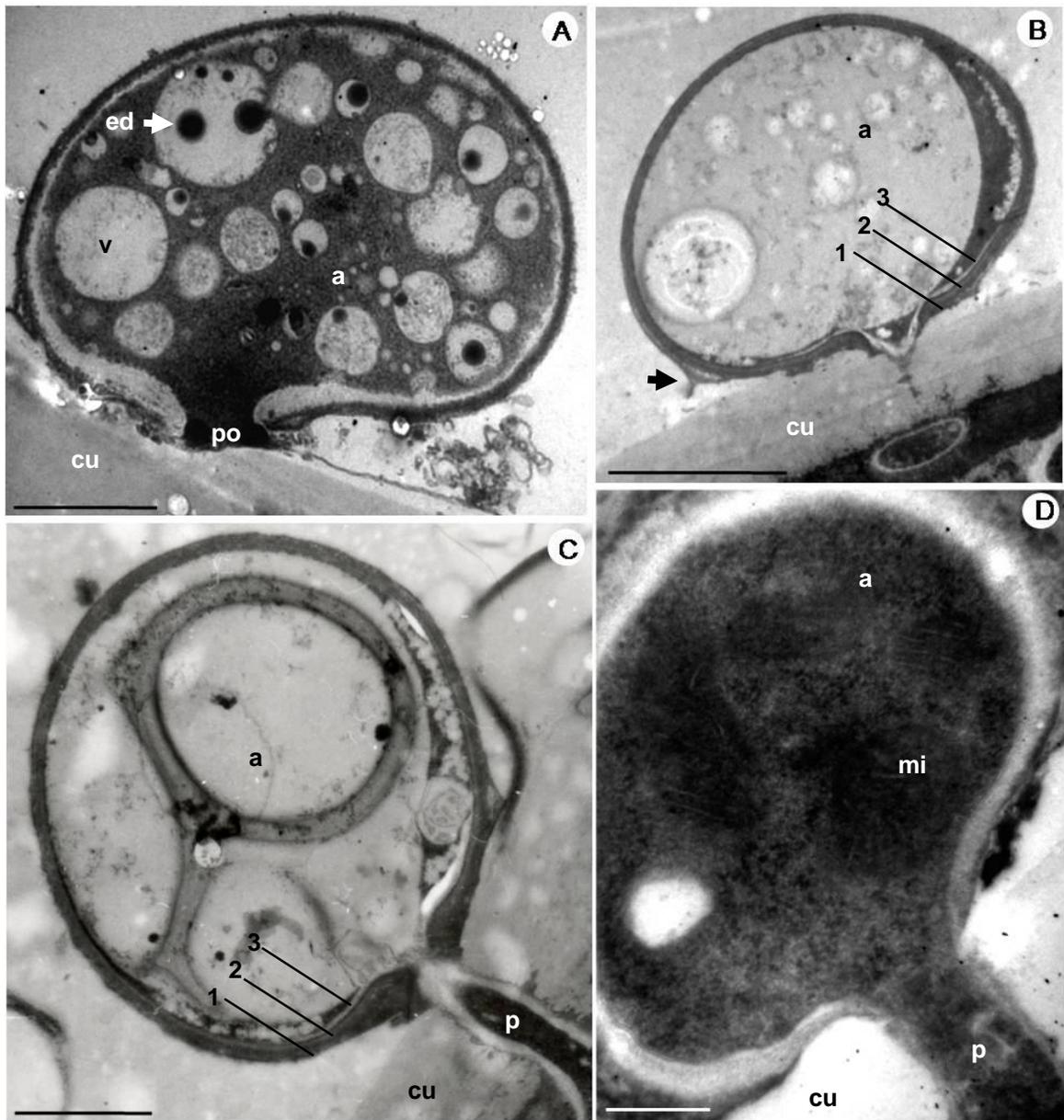


Figura 5 - Imagens ao microscópio eletrônico de transmissão do apressório de *C. gloeosporioides*. **A.** Apressório sobre a cutícula do hospedeiro. Vacúolos e conteúdo elétron-densos no interior do apressório. Parede celular do apressório dissolvida e formação do poro de penetração (Barra = 1 μm); **B.** Apressório e matriz extracelular (seta). Presença da camada externa e interna da parede celular e da terceira camada observada entre a membrana celular e a camada interna da parede celular (Barra = 2 μm); **C.** Apressório em contato com a cutícula e o *peg* de penetração emitido da base do mesmo. Presença de três camadas na parede celular (Barra = 2 μm); **D.** Mitocôndrias no interior do apressório (Barra=1 μm). a = apressório; cu = cutícula; ed = conteúdo elétron-denso; p = *peg*; po = poro; tg = tubo germinativo; v = vacúolo; 1 = camada externa da parede celular do apressório; 2 = camada interna da parede celular; 3 = camada formada entre a membrana celular e a camada interna da parede, que dará origem ao poro de penetração

2.2.3.2 Colonização

O *peg* de penetração foi emitido da base do apressório e penetrou diretamente através da cutícula e parede celular epidérmica, após 48 horas da inoculação (Figura 6A).

A estratégia de colonização do *C. gloeosporioides* em goiaba foi intracelular hemibiotrófica. Com 72 horas após a inoculação, verificou-se a dilatação do *peg* de penetração formando a vesícula de infecção esférica no interior da célula epidérmica (Figura 6B). O citoplasma estava ligeiramente oxidado devido a sua característica elétron-densa. O mesmo manteve sua conformação organizacional, sem revelar plasmólise.

Após 96 horas da inoculação, ainda nas células epidérmicas foram encontradas vesículas e hifas de infecção (Figura 6C-E). As hifas tornaram-se multilobadas e multisseptadas, e permaneceram confinadas às células epidérmicas. A degeneração celular do fruto foi notada através de material elétron-denso no citoplasma (Figura 6C-E). Na figura 6E, o citosol estava preenchido pela estrutura do fungo, não observando o conteúdo celular do fruto.

Vesículas e hifas primárias foram encontradas nas células epidérmicas (Figura 6F) e hifas secundárias nas células parenquimáticas (Figura 6G-H) do hospedeiro, após 120 horas da inoculação. O tecido vegetal estava totalmente degenerado indicado pela intensa sinuosidade da parede celular, revelando a desorganização dos tecidos, além da presença de material eletro-denso no lúmen da célula.

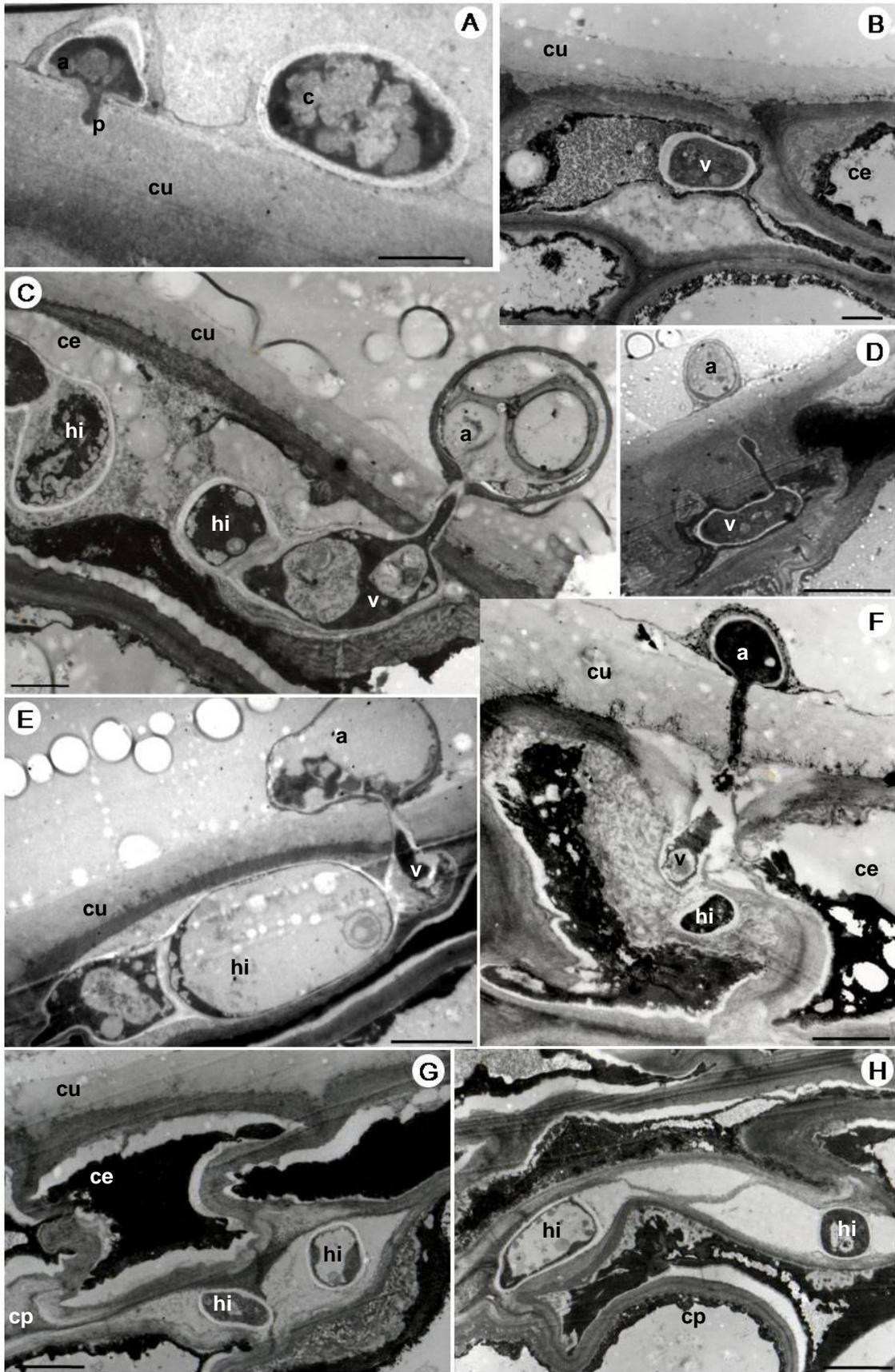


Figura 6 - Imagens ao microscópio eletrônico de transmissão mostrando a colonização de *C. gloeosporioides* em frutos de goiabeira após diferentes horas da inoculação. **A.** Conídio, apressório e o *peg* de penetração localizado na cutícula do hospedeiro após 48 horas da inoculação (Barra = 2 μm); **B.** Vesícula de infecção no lúmen da célula epidérmica de fruto de goiabeira, 72 horas após inoculação (Barra=1,7 μm); **C, D e E.** Apressório, *peg* de penetração, vesícula e hifa de infecção, 96 horas após a inoculação (Barra = 1,7, 5 e 2 μm , respectivamente); **F.** Apressório, *peg* penetração, vesícula e hifa de infecção, 120 horas após a inoculação (Barra = 1,7 μm); **G e H.** Hifa de infecção no interior das células parenquimáticas, 120 horas após a inoculação (Barra = 1,7 μm). a = apressório; c = conídio; ce = célula epidérmica; cp = célula parenquimática; cu = cutícula; hi = hifa; p = *peg*; v = vesícula

2.2.4 Discussão

Esse trabalho consistiu no primeiro estudo do processo de infecção e colonização de frutos de goiabeira por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Com o uso do microscópio eletrônico de varredura e transmissão foi observado a adesão de conídios germinados e não germinados, de tubos germinativos e de apressórios na superfície do tecido vegetal. Adesão dos apressórios foi particularmente mais forte que as demais estruturas devido a firme base da penetração, o qual foi demonstrada pela observação de fragmentos dos apressórios sob a cutícula após submissão das amostras ao aparelho de ultra-som, o que foi consistente com os resultados apresentados por Pain et al. (1996). O significado desse resultado foi diretamente relacionado como o sucesso da infecção, já que a adesão do apressório assegura que o patógeno permaneceu em contato com o hospedeiro por tempo necessário para a emissão do *peg* de penetração e subsequente penetração (BAILEY et al., 1992).

O início da germinação de conídios dentro do gênero *Colletotrichum* foi altamente variável, ocorrendo entre 3 e 48 horas após a inoculação (BAILEY; JEGER, 1992; LOPEZ, 2001). No presente estudo a germinação de conídios e a formação de apressórios ocorreu seis horas após a inoculação, corroborando com resultados obtidos com *C. dematium* em feijão-fradinho e *C. fragariae* em cherimoia (SMITH; KORSTEN; AVELING, 1999; VILLANUEVA-ARCE et al., 2006). Em plantas de café inoculadas com *C. gloeosporioides* e *C. dematium*, os autores observaram o início da germinação 5 e 12 horas após a inoculação, respectivamente (LINS; ABREU; ALVES, 2007). *Colletotrichum acutatum* em morango germinou após quatro horas da inoculação

(ARROYO et al., 2005) e *C. destructivum* em tabaco após 12 horas (SHEN; GOODWIN; HSIANG, 2001). Na mitose, durante a germinação, um septo foi produzido como observado no presente estudo e em outros patossistemas como *C. gloeosporioides* - feijão-fradinho (BARRETO et al., 2007), *C. truncatum* - ervilha (O'CONNELL et al., 1993) e *Colletotrichum trifolii* - alfafa (MOULD; BOLAND; ROBB, 1991a).

O apressório de *C. gloeosporioides* foi séssil ou formado na extremidade do tubo germinativo e apresentou diferentes formatos podendo ser esférico, lobado, irregular ou clavado. Esses diferentes formatos são característicos do gênero, como relatado por SUTTON (1992). O *peg* de penetração foi emitido da base do apressório após 48 horas da inoculação. *Colletotrichum graminicola* penetrou em folhas de diferentes espécies de grama (*Agrostis palustris*, *Lolium perenne*, *Poa annua* e *Poa pratensis*), 24 horas após a inoculação (KHAN; HSIANG, 2003). Em feijão fradinho, *C. destructivum* penetrou 36 horas após a inoculação na cutícula de folha e hipocótilo (LATUNDE-DADA et al., 1996) e em fruto de mamão, *C. gloeosporioides* penetrou 72 horas após (CHAU; ALVAREZ, 1983). O sucesso da penetração foi seguido da formação de estruturas especializadas na colonização, como a formação de vesícula esférica no interior da célula epidérmica visualizado no presente estudo.

Durante o evento de penetração observou-se disruptura da cutícula, porém não foi observada degradação ao redor do poro de infecção, suportando a hipótese de penetração baseada em força mecânica, assim como nos relatos de *C. acutatum* em morango (ARROYO et al., 2005). No entanto, outros fatores como a ativação de enzimas durante o processo de penetração não podem ser excluídos (KÖLLER, 1991; O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985).

No interior do apressório de algumas espécies de *Colletotrichum* spp., como por exemplo *C. trifolii* (MOULD; BOLAND; ROBB, 1991a) e *C. lagenarium* (KUEI; JÄRLLFORS; KUC, 1987) o poro de infecção foi envolvido por uma estrutura em formato de funil, denominado cone apressorial. Essa estrutura é uma extensão da parede do *peg* de penetração e, pode agir na pressão hidrostática no local de penetração. Entretanto, no nosso trabalho, o cone apressorial não foi observado, bem como em *C. sublineolum* (WHARTON; JULIAN; O'CONNELL, 2001), *C. truncatum* (O'CONNELL et al., 1993), *C. acutatum* (ARROYO et al., 2005) e *C. graminicola* (POLITIS; WHEELER,

1973). A ausência do cone em algumas espécie e presença em outras sugere que as espécies de *Colletotrichum* podem estar associada com os diferentes mecanismos de penetração.

Os processos de infecção e colonização de *C. gloeosporioides* em goiaba assemelharam-se com os de outras espécies de *Colletotrichum*. *Colletotrichum trifolli* e *C. lindemuthianum* penetraram diretamente na cutícula por meio da emissão do *peg* de penetração da base do apressório e produziram vesículas intracelulares nas células epidérmicas de folhas de alfafa e feijão, respectivamente (MOULD; BOLAND; ROBB, 1991a; MOULD; BOLAND; ROBB, 1991b; O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). *C. gloeosporioides* penetrou diretamente na cutícula de folhas de feijão-fradinho e através dos estômatos. Na penetração direta, houve formação do *peg* de penetração e posterior invasão da célula epidérmica. Em seguida, o *peg* dilatou-se formando vesícula de infecção esférica e após 48 horas da inculação desenvolveram-se os bulbos laterais e posteriormente hifa primária (BARRETO et al., 2007), concordando com o presente trabalho, porém a vesícula de infecção foi observada somente após 72 horas da inoculação. Por outro lado, *C. gloeosporioides* não penetrou diretamente na cutícula de folhas de amora, mas penetrou pela cavidade estomática onde formou a vesícula de infecção (KUMAR, et al., 2001).

No presente trabalho, a degeneração celular após 72 horas da inoculação foi ligeira, pois o citoplasma manteve sua conformação organizacional, sem revelar plasmólise. Com isso, sugere-se que nesse período a membrana plasmática foi invaginada pela vesícula de infecção, caracterizando a fase biotrófica. A fase necrotrófica iniciou após 96 horas da inoculação com a morte celular.

A estratégia de colonização intracelular hemibiotrófica utilizada pelo *C. gloeosporioides* em goiaba diferiu da estratégia de colonização de *C. acutatum* e *C. fragariae* em morango (CURRY et al., 2002), *C. capsici* em feijão-fradinho (PRING et al., 1995) e *C. gloeosporioides* em mamão (CHAU; ALVAREZ, 1983) pois esses patógenos não invadiram o interior da célula para formar uma relação biotrófica com o protoplasto, a hifa de infecção ingressou abaixo da cutícula e dentro da parede periclinal e anticlinal das células epidérmicas das plantas hospedeiras. As presentes observações também diferiram dos estudos de Diéguez-Uribeondo et al. (2005) que

relataram *C. acutatum* utilizando duas diferentes estratégias de colonização, a intracelular hemibiótrfica e a subcuticular intramural necrotrófica em amêndoa.

Dessa forma, o presente trabalho indicou que o processo de infecção e a colonização são mecanismos independentes e específicos, que variam de acordo com a interação patógeno-hospedeiro, concordando com Emmett e Parbery (1975).

2.3 Conclusões

A germinação de conídios e a formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* na superfície de frutos de goiabeira ocorreram seis horas após a inoculação, a 25 °C. A penetração no patógeno ocorreu 48 horas após a inoculação por meio da formação do *peg* de penetração. A estratégia de colonização dessa espécie foi intracelular hemibiotrófica, pois com 72 horas da inoculação observou-se a formação de vesícula de infecção nas células epidérmicas. Com 96 horas da inoculação verificou-se a formação de hifas e morte celular, caracterizando a fase necrotrófica. Com 120 horas da inoculação essas estruturas fúngicas haviam colonizado as células parenquimáticas.

Referências

AGRIOS, G.N. Parasitism and disease development. In: **Plant Pathology**. 5th ed. Burlington: Elsevier, 2005. chap. 2, p. 77-104.

AMORIM, L. Infecção. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 295-308.

ARROYO, F.T.; MORENO J.; GARCIA-HERDUGO, G.; DE LOS SANTOS, B.; BARRAU, C.; PORRAS, M.; BLANCO, C.; ROMERO, F. Ultrastructure of the early stages of *Colletotrichum acutatum* infection of strawberry tissues. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, Ottawa, v. 83, p. 491-500, 2005.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. England: CAB Internacional Wallingford, 1992. 388p.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. England: CAB Internacional Wallingford, 1992. chap. 5, p. 1-26.

BARRETO, A.L.H.; VASCONCELOS, I.M.; GRANGEIRO, T.B.; MELO, V.M.M.; MATOS, T.E.; ELOY, Y.R.G.; FERNANDES, C.F.; TORRES, D.C.; FREIRE-FILHO, F.R.; FREIRE, F.C.O; OLIVEIRA, J.T.A. Infection process and host defense responses in compatible and incompatible interactions between cowpea (*Vigna unguiculata*) and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Internacional Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 168, p. 193-203, 2007.

BINYAMINI, J.P.; SCHIFFMANN-NADEL, M. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 62, p. 592-594, 1972.

BROWN, G.E. Factors affecting post-harvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, Lancaster, v. 65, p. 404-409, 1975.

CHAU, K.F.; ALVAREZ, A.M. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 73, p. 1113-1116, 1983.

COATES, L.M.; MUIRHEAD, I.F.; IRWIN, J.A.; GOWANLOCK, D.H. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 1363-1370, 1993.

CURRY, K.J.; ABRIL, M.; AVANT, J.B.; SMITH B.J. Strawberry anthracnose: Histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum fragariae*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p. 1055-1063, 2002.

DICKMAN, M.B.; ALVAREZ, A.M. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, St Paul, v. 67, p. 748-750, 1983.

DIEGUEZ-URIBEONDO, J.; FORSTER, H.; SOTO-ESTRADA, A.; ADASKAVEG, J.E. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. **Phytopathology**, Lancaster, v. 95, p. 751-758, 2005.

EMMETT, R.W.; PARBERY, D.G. Appressoria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 147-167, 1975.

FITZELL, R.D.; PEAK, C.M. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 104, p. 53-59, 1984.

GAUMANN, E. **Principles of Plant Infection**. London: Crosby Lockwood, 1950. 543p.

HAMER, J.E.; HOWARD, R.J.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science**, Washington, v. 239, p. 288-290, 1988.

HOWARD, C.M.; ALBREGTS, E.E. Anthracnose of strawberry fruit caused by *Glomerella cingulata* in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, p. 824-825, 1983.

HOWARD, R.J. Breaching the outer barrier-cuticle and cell wall penetration. In: CARROLL, G.C.; TUDZYNSKI, P. **The Mycota. V Plant relationships**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. p. 43-60.

HOWARD, R.J. Cell biology of pathogenesis. In: ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Ed.). **Rice blast disease**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 3-22.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M.J.; PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, London, v. 39, p. 343-366, 1990.

KAGIWATA, T. An anthracnose of passion fruit caused by *Glomerella cingulata*. **Journal of Agricultural Science**, Japan, v. 31, p. 90-100, 1986.

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

KÖLLER, W. The plant cuticle: a barrier to be overcome by fungal plant pathogens. In: COLE, G.T.; HOCH, H. C. **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p. 219-246.

KUEI, X.L.; JÄRLFORS, U; KUC, J. Ultrastructural changes associated with induced systemic resistance of cucumber to disease: host response and development of *Colletotrichum lagenarium* in systemically protected leaves. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 66, p. 1028-1038, 1987.

KUMAR, V.; GUPTA, V.P.; BABU, A.M.; MISHRA R.K.; THIAGARAJAN, V. AND DATTA, R.K. Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. **Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 149, p. 629-633, 2001.

LATUNDE-DADA, A.O.; O'CONNELL, R.J.; NASH, C.; PRING, R.J; LUCAS, J.A.; BAILEY, J.A. Infection process and identity of the hemibiotrophic anthracnose fungus (*Colletotrichum destructivum*) from cowpea (*Vigna unguiculata*). **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 1133-1141, 1996.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. **Plant Pathology**, London, v. 56, p. 437-447, 2007.

LIM, T.K; MANICOM, B.Q. Disease of Guava. In: PLOETZ, R.C. **Diseases of tropical fruit crops**. Homestead: CABI Publishing, 2003. chap. 12, p. 275-289.

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

LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **R.A.P.P. - Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p. 291-339, 2001.

MERCURE, E.M.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R.L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves - A requirement for disease development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, p. 407-420, 1994.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98, p.137-144, 1992.

MORIN, L.; DERBY, J.L.; KOKKO, E.G. Infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* on Malvaceae weeds. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 165-172, 1996.

MOULD, M.J.R.; BOLAND, G.J.; ROBB, J. Ultrastructure of the *Colletotrichum trifolii* *Medicago sativa* pathosystem. 1. Pre-penetration events. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 38, p. 179-194, 1991a.

MOULD, M.J.R.; BOLAND, G.J.; ROBB, J. Ultrastructure of the *Colletotrichum trifolii* *Medicago sativa* pathosystem. 1. Pos-penetration events. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 38, p. 195-210, 1991b.

NICHOLSON, R.L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface: Prerequisite for pathogenesis. In: COLE, T.; HOCH, H.C. **The fungal spore and disease initiation in plants and animals** (Ed.). New York: Plenum Press, 1991. chap. 1, p. 3-23.

O'CONNELL, R.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J.; GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). **Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. Minnesota: APS Press, 2000. chap. 5, p. 57-77.

O'CONNELL, R.J.; BAILEY, J.A.; RICHMOND, D.V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, Berlin, v. 27, p. 75-98, 1985.

O'CONNELL, R.J.; URONU, A.B.; WAKSMAN, G.; NASH, C.; KEON, J.P.R.; BAILEY, J.A. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. **Plant Pathology**, London, v. 42, p. 774-783, 1993.

PAIN, N.A.; GREEN, J.R. JONES, G.L.; O'CONNELL, R.J. Composition and organization of extracellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Protoplasma**, Leipzig, v. 190, p. 119-130, 1996.

PEREIRA, F.M.; MARTINEZ JÚNIOR, M. **Goiabas para industrialização**. Jaboticabal: Editora Legis Summa, 1986. 142p.

PERFECT, S.E., HUGHES, H.B., O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum* - A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, p. 186-198, 1999.

PICCININ, E; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças da goiabeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M; .BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Ceres, 2005. v. 2, cap. 44, p. 401-409.

POLITIS, D.J.; WHEELER, H. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Physiological Plant Pathology**, Berlin, v. 3, p. 465-471, 1973.

PRING, R.J.; NASH, C.; ZAKARIA, M.; BAILEY, J.A.. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 137-152, 1995.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. ***Colletotrichum***: host specificity, pathology and host-pathogen interaction. Minnesota: APS Press, 2000. 393 p.

PRUSKY, D.; KOBILER, I.; ARDI, R.; BENO-MOALEM, D.; YAKOBY, N.; KEEN, N.T. Resistance mechanism of subtropical fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). ***Colletotrichum***: host specificity, pathology and host-pathogen interaction. Minnesota: APS Press, 2000. chap. 14, p. 232-244.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-213, 1963.

SEPIAH, PLOETZ, R.C.; COOKE, A.W. Disease of Carambola. In: PLOETZ, R.C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Homestead: CABI Publishing, 2003. chap. 6, p.145-162.

SHEN, S.H.; GOODWIN, P.; HSIANG, T. Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum*, causing anthracnose of tobacco. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1340-1347, 2001.

SMITH, J.E.; KORSTEN, L.; AVELING, T.A.S. Infection process of *Colletotrichum dematium* on cowpea stems. **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, p. 230-234, 1999.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BARLEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. England: CAB Internacional Wallingford, 1992. chap.1, p.1-26.

VILLANUEVA-ARCE, R.; CARDENAS-SORIANO, E.; HERNANDEZ-ANGUIANO, A.M.; MORA-AGUILERA, A.; TELIZ-ORTIZ, D. Pathogenesis of anthracnose (*Colletotrichum fragariae*) in cherimoya fruits. **Agrociencia**, Chapingo, v. 40, p. 773-782, 2006.

WATADA, A.E.; HERNER, R.C.; KADER, A.A.; ROMANI, R.J.; STABY, G.L. Terminology for the description of development stages of horticultural crops. **HortScience**, St. Joseph, v. 19, p. 20-21, 1984.

WHARTON, P.S.; JULIAN, A.M.; O'CONNELL, R.J. Ultrastructure of the Infection of Sorghum bicolor by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p. 149-158, 2001.

WHARTON, P.S.; SCHILDER, A.C. Novel infection strategies of *Colletotrichum acutatum* on ripe blueberry fruit. **Plant Pathology**, London, v. 57, p. 122-134, 2008.

XUEI, X.L.; JARLFORS, U.; KUC, J. Ultrastructural changes associated with induced systemic resistance of cucumber to disease - Host response and development of *Colletotrichum lagenarum* in systemically protected leaves. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, Ottawa, v. 66, p. 1028-1038, 1988.

YOUNG, D.H.; KAUSS, H. Adhesion of *Colletotrichum lindemuthianum* spores to *Phaseolus vulgaris* hypocotyls and to polystyrene. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 47, p. 616-619, 1984.

3 PRÉ-PENETRAÇÃO E PENETRAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM FRUTOS DE GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.): EFEITO DA TEMPERATURA, PERÍODO DE MOLHAMENTO E IDADE DE FRUTOS

Resumo

A antracnose da goiabeira está presente em todas as regiões produtoras, causando danos frequentes. O objetivo do trabalho foi determinar o efeito da temperatura, período de molhamento e idade dos frutos de goiabeira na infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides*. A influência das condições ambientais na germinação de conídios, formação de apressórios e formação de apressórios melanizados foram estudadas *in vitro* e *in vivo*. Para os ensaios *in vitro*, alíquotas das suspensões de conídios foram depositadas em placas de poliestireno e incubadas sob temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C, com períodos de molhamento de 6, 12, 24, 36 e 48 horas e posteriormente analisadas em microscópio de luz. Nos ensaios *in vivo*, alíquotas das suspensões de conídios foram depositadas na superfície de frutos, que foram incubados sob temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C e períodos de molhamento de 6, 12 e 24 horas. Em seguida, amostras dos frutos inoculados foram processadas para visualização em microscópio eletrônico de varredura. Frutos com 10, 35, 60, 85 e 110 dias após queda das pétalas foram inoculados da mesma forma e incubados a 25 °C por 48 horas. Em seguida, as amostras foram processadas para visualização em microscópio de luz e microscópio eletrônico de varredura e transmissão. Para microscopia de luz, as amostras foram coradas com azul de toluidina e ACN ("Astrablue-Chrysoidin-New"). Os corantes foram usados para visualizar as estruturas do tecido e fenóis. As temperaturas ótimas *in vitro* para germinação de conídios, formação de apressórios e melanização de apressórios foram, respectivamente, 22,7, 20,6 e 23 °C (78% de conídios germinados, 76% de apressórios formados e 98% de apressórios melanizados). Para os ensaios *in vivo*, as temperaturas ótimas para germinação de conídios e formação de apressórios foram de 22,4 e 23,3 °C (86% de conídios germinados e 74% de apressórios formados), respectivamente. Houve aumento das variáveis estudadas com a elevação do período de molhamento. Não houve diferença significativa na germinação de conídios e formação de apressórios em frutos com diferentes idades. Em frutos com 10, 35 e 60 dias, não houve a formação do *peg* de penetração, porém o apressório permaneceu aderido à superfície dos frutos. O *peg* de penetração foi observado em frutos com 85 e 110 dias. Esse permaneceu na cutícula, não avançando para as células epidérmicas. Espessura da cutícula e da parede celular, tamanho e arquitetura das células epidérmicas e parenquimáticas, além do conteúdo de compostos fenólicos foram alterados com a maturação dos frutos.

Palavras-chave: *Psidium guajava*; Quiescente; Antracnose; Infecção; Anatomia vegetal; Microscopia eletrônica; Microscopia de luz

PREPENETRATION AND PENETRATION OF *Colletotrichum gloeosporioides* ON GUAVA FRUITS (*Psidium guajava* L.): EFFECTS OF TEMPERATURE, WETNESS PERIOD AND FRUIT AGE

Abstract

Anthrachnose of guava fruit is found in all producing regions, causing frequent damages. The objective of this study was to determine the influence of temperature, wetness period and fruits age on prepenetration and penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* in guava. The influence of environmental conditions on conidial germination, appressoria formation and melanized appressoria were studied *in vivo* and *in vitro*. Conidial suspensions were deposited on polystyrene dishes and incubated at 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 °C with wetness periods of 6, 12, 24, 36 and 48 h and afterward analyzed on light microscope. In the *in vivo* experiments, conidial suspensions were placed on fruits surface, which were incubated at 10, 15, 20, 25 and 30 °C with wetness period of 6, 12 and 24 h. Samples of inoculated fruit were processed for visualization on electron scanning microscope. Fruits with 10, 35, 60, 85 and 110 days old were inoculated likewise and incubated at 25 °C for 48 h. Next, samples were processed for the visualization on light microscope and scanning and transmission electron microscope. For light microscopy, the samples were stained with toluidine blue ACN ("Astrablue-Chrysoidin-New"). The stained were use to visualize the tissues structures and phenolics. Optimal temperatures *in vitro* for conidial germination, appressoria formation and melanization were, respectively, 22.7, 20.6 and 23 °C (78% of conidial germination, 76% of appressoria formation and 98% of appressoria melanization). *In vivo*, the optimal temperatures for conidial germination and appressoria formation were 22.4 and 23.3 °C (86% of conidial germination, 74% of appressoria formation), respectively. All variables were higher with the increase in the wetness period. There was no difference in the conidial germination and appressoria formation on fruits of different ages. On fruits with 10, 35 and 60 days, there was no formation of the penetration peg, however, the appressorium remained adhered to the fruit surface. The penetration peg was observed on fruits with 85 and 110 days, however it remained on the cuticle, and did not reach the epidermic cells. Thickness of the cuticle and cell walls, size and architecture of epidermic and parenchymal cells, besides the content of phenolic compounds were altered as the fruit approached maturation.

Keywords: quiescent infection; anthracnose; vegetal anatomy; electronic microscopy; light microscopy

3.1 Introdução

Antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc., é uma das principais doenças da goiaba em todos os países produtores, causando perdas consideráveis em pós-colheita e limitando a exportação (LIM; MANICOM, 2003).

Esse patógeno infecta o fruto ainda no campo, no entanto o sintoma aparece apenas com o amadurecimento (JEFFRIES et al., 1990). Com isso, as perdas pela infecção quiescente são proporcionalmente maiores que as perdas no campo, pois o custo de colheita, transporte e armazenamento são adicionados aos frutos que vão para o mercado, aparentemente sadios (SWINBURNE, 1983).

Com o amadurecimento do fruto, mudanças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas ocorrem e levam a transição da fase de quiescência para a agressiva, promovendo o desenvolvimento da doença (PRUSKY; LICHTER, 2007). Entretanto, a ativação da infecção quiescente depende ainda das condições ambientais favoráveis ao patógeno. Dessa forma, o estabelecimento da relação parasitária depende do equilíbrio dinâmico entre o patógeno, hospedeiro e o meio ambiente (JARVIS, 1994).

Os mecanismos utilizados para explicar a resistência de frutos imaturos ao ataque de patógenos incluem a ausência ou presença, em quantidades inadequadas, dos fatores de patogenicidade do fungo, tal como as enzimas pectolíticas; anatomia do fruto, como presença de cutícula espessa; compostos tóxicos ao patógeno nas células do fruto, os quais diferem em composição, número e atividade nos diferentes estádios de maturação do fruto; e mudança na disponibilidade nutricional ao patógeno (BARKAI-GOLAN, 2001; BROWN; WILSON, 1968; GABLER et al., 2003; JEFFRIES et al., 1990; LI et al., 2008; PRUSKY, 1996; SWINBURNE, 1983).

A dependência da temperatura e do período de molhamento na interação *Colletotrichum gloeosporioides*-goiaba foram registradas na Índia (PANDEY; ARORA; DUBEY, 1997) e Brasil (SOARES, 2008). A temperatura favorável ao desenvolvimento da doença está entre 25 °C a 30 °C e longos períodos de molhamento, sendo desfavorável entre 35 °C a 40 °C e entre 15 °C a 20 °C. Nas diferentes fases de pré-penetração, há requisitos ambientais distintos como observado para *Colletotrichum*

acutatum em folhas de morango (LEANDRO et al., 2003). Sob molhamento contínuo, as temperaturas ótimas para a germinação de conídios foram de 23 °C a 27 °C, enquanto que para o desenvolvimento de apressórios foram de 17,6 °C a 26,5 °C e para a formação de conídios secundários, a partir de apressórios foram de 21,3 °C a 32,7 °C.

Devido a necessidade de conhecer as condições ambientais favoráveis ao patossistema goiaba-*C. gloeosporioides*, juntamente com a ausência de informações sobre infecção quiescente relacionada com a idade de frutos, os objetivos desse trabalho foram: (i) identificar as condições favoráveis à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* por meio de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*; (ii) investigar os eventos ocorridos durante as fases de pré-penetração e penetração em frutos com diferentes idades; (iii) verificar o estágio de desenvolvimento que o patógeno torna-se quiescente em frutos com diferentes idades; e (iv) evidenciar as alterações morfológicas e químicas que ocorrem com o amadurecimento.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão bibliográfica

3.2.1.1 Cultura da goiabeira

No Brasil, em 2005, 16.308 hectares foram cultivados com goiaba (*Psidium guajava* L.), gerando produção aproximada de 346 mil toneladas de frutos. Sendo esse o maior produtor, seguido pela Índia e México. Outras importantes regiões produtoras incluem Cuba, República Dominicana, Egito, Hawaii, Jamaica, Quênia, Malásia, Filipinas, Porto Rico, Taiwan, Tailândia e Venezuela (FNP, 2008; LIM; MANICOM, 2003).

Os Estados de Pernambuco e São Paulo são os maiores produtores, responsáveis por 70% da produção de goiabas do país. O Estado de São Paulo produziu, em 2005, aproximadamente 118 mil toneladas em cinco mil hectares, sendo 45 mil toneladas para mesa e 73 mil para a indústria (FNP, 2008; IEA, 2008). O volume de goiaba comercializado na Companhia de Entrepósito e Armazéns Gerais de São

Paulo – CEAGESP, registrado em 2006, foi de 11.546 toneladas de goiaba, sendo 1.529 toneladas de goiaba branca e 10.017 toneladas de goiaba vermelha (FNP, 2008).

A produção paulista é típica de pequenos produtores e se concentra em três regiões, compostas pelos municípios de Taquaritinga, Monte Alto, Vista Alegre e Urupês (grupo I); Valinhos, Itu e Campinas (grupo II); e Mirandópolis (grupo III) e seus circunvizinhos (FRANCISCO; BAPTISTELLA; AMARO, 2005).

A cultura no grupo II ocupa área de 806,7 hectares com 210 mil plantas, participando com 8% da produção estadual, destinada majoritariamente ao consumo *in natura*. Nessa região, a variedade mais utilizada é a ‘Kumagai’ cuja polpa é branca (FRANCISCO; BAPTISTELLA; AMARO, 2005). Essa variedade é a base das exportações brasileiras por apresentar maior capacidade de conservação após a colheita, além do aroma e sabor delicado e peso médio (280 a 480 gramas) (GORGATTI NETTO et al., 1996; GONZAGA NETO; SOARES, 1995; MANICA, 2000).

Em 2007, o Brasil exportou 95.327 kg de goiaba, estando entre os maiores compradores a França, o Canadá, o Reino Unido e os Países Baixos. Esse volume foi inferior aos anos anteriores, os quais chegaram a 211.686 e 253.490 kg em 2006 e 2005, respectivamente (IBRAF, 2008). A inexpressividade da exportação brasileira é devido ao desconhecimento do produto pelos consumidores dos mercados mais rentáveis economicamente e ao alto grau de perecibilidade do fruto na fase de pós-colheita. Esse último fato exige que o produto seja bem acondicionado e escoado para o mercado internacional por via aérea, o que onera demasiadamente os custos de comercialização (CHOUDHURY; COSTA; ARAÚJO, 2001).

3.2.1.2 Antracnose da goiaba

A antracnose, também conhecida como mancha chocolate, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (teleomorfo: *Glomerella cingulata*) é a principal doença pós-colheita em todos os países produtores de goiaba (LIM; MANICOM, 2003).

Essa espécie foi considerada o único agente causal da antracnose até 1993, quando Das; Mukta e Bora (1993) observaram *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds (teleomorfo: *Glomerella acutata*) associado as lesões de antracnose na goiaba. Em

estudos mais recentes, por meio de técnicas moleculares, a antracnose causada por *C. acutatum* foi confirmada por Peres et al. (2002).

Colletotrichum gloeosporioides sobrevive em frutos mumificados presentes nos campos de produção ou em tecido infectado, como galhos e ramos. Os conídios são dispersos pelo vento e respingos de chuva e irrigação (SINGH, 2000). Com isso, a incidência da antracnose depende da época do ano. Em pomares localizados na região de Campinas, a incidência média da doença foi de 5%, com picos de 10% nos frutos colhidos no final do verão (AMARAL et al., 2006). A incidência da doença é favorecida pelo ensacamento do fruto, pois o saco de papel não impede a entrada de água que escorre junto ao pedúnculo do fruto (MARTINS et al., 2007).

Os sintomas da antracnose, inicialmente caracterizam-se por lesões arredondadas, necróticas e encharcadas de coloração marrom clara na superfície dos frutos. Com a evolução da doença, essas ficam deprimidas e crescem, com formato irregular e, posteriormente coalescem podendo atingir todo o fruto. Sob condições de alta umidade é possível observar sinais do patógeno de coloração alaranjada, que correspondem à matriz mucilaginosa onde estão os conídios (PEREIRA; MARTINEZ JÚNIOR, 1986; PICCININ; PASCHOLATI; DI PIERO, 2005).

As condições ambientais favoráveis à infecção são temperaturas de 25 °C a 30 °C e longos períodos de molhamento. Para a infecção, a temperatura mínima é entre 10 °C e 15 °C e a máxima é 35 °C (PANDEY et al., 1997; SOARES, 2008). Apesar de frutos com fermento serem mais suscetíveis à infecção, Piccinin e Pascholati (1997) mencionam que ocorre penetração direta, com a formação de apressórios. O controle dessa doença no campo tem sido conseguido com podas de ramos afetados, que além de reduzir o inóculo, promove maior aeração na copa, desfavorecendo a infecção.

3.2.1.3 Quiescência

O termo infecção quiescente é definido como relação parasitária quiescente, dormente ou latente, a qual após longo período de tempo em circunstâncias específicas, se torna ativa (VERHOEFF, 1974).

As espécies de *Colletotrichum* são os patógenos mais importantes que causam esse tipo de infecção em fruteiras (JEFFRIES et al., 1990; PRUSKY; LICHTER, 2007),

seguido por *Botrytis* spp. (GOETZ et al., 1999; TERRY et al., 2004;), *Guignardia* spp. (BALDASSARI, 2001; ESCANFERLA et al., 2009), *Monilinia* spp. (OGAWA et al., 1995) *Alternaria* spp. (LI et al., 2008), entre outros. A infecção inicia em qualquer estágio de desenvolvimento do fruto na planta, porém os sintomas aparecem com o seu amadurecimento (JEFFRIES et al., 1990).

O conídio de *Colletotrichum* adere e germina na superfície da planta hospedeira, emite o tubo germinativo e em sua extremidade forma o apressório. O apressório germina, forma o *peg* de penetração, que penetra diretamente na superfície da planta hospedeira e cresce abaixo da cutícula e epiderme e em seguida, penetra nas células epidérmicas. Subsequentemente, a hifa desenvolve-se intra e/ou intercelularmente resultando posteriormente nas lesões (JEFFRIES et al., 1990; PERFECT et al., 1999). O estágio de desenvolvimento o qual o fungo torna-se quiescente pode ser no início da germinação do conídio, no alongamento do tubo germinativo, na formação do apressório, na penetração ou no processo de colonização (JARVIS, 1994; PRUSKY, 1996; PRUSKY; PLUMBLEY, 1992).

Em abacate, ao microscópio de luz foi verificado que *C. gloeosporioides* permaneceu quiescente na superfície de frutos imaturos, como apressório melanizado. Após o amadurecimento, o apressório emitiu o *peg* de penetração que penetrou na cutícula e células epidérmicas (BINYAMINI; SCHIFFMANN-NADEL, 1972). O mesmo resultado foi relatado no patossistema banana-*C. musae*. Muirhead e Deverall (1981) observaram que o apressório melanizado, sem a emissão do *peg*, é o estágio de desenvolvimento que o fungo tornar-se quiescente até o início do amadurecimento. Por outro lado, em trabalhos posteriores com frutos de bananeira foi verificado que o *peg* de penetração de *C. musae* desenvolveu-se entre a cutícula e a célula epidérmica, onde permaneceu quiescente devido à resistência do fruto verde (SWINBURNE; BROWN, 1983). Da mesma forma, ao microscópio eletrônico de transmissão foi observado a formação do *peg* em frutos imaturos de abacate, sendo a hifa subcuticular a estrutura responsável pela infecção quiescente (PRUSKY; PLUMBLEY; KOBILER, 1991).

A transição da fase de quiescência para a agressiva é decorrente das mudanças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que ocorrem com o amadurecimento do fruto (BARKAI-GOLAN, 2001; BROWN; WILSON, 1968; JEFFRIES et al., 1990; PRUSKY,

1996; SWINBURNE, 1983). Os autores relacionaram mecanismos que podem atuar na susceptibilidade do fruto aos fitopatógenos: i.) ativação de fatores de patogenicidade do fungo; ii.) redução da concentração de compostos tóxicos ao patógeno; iii.) mudança na disponibilidade de nutrientes ao patógeno.

Em doença pós-colheita, a desorganização do tecido do hospedeiro por enzimas originárias do patógeno é um dos sintomas mais comum (JEFFRIES et al., 1990). A infecção quiescente é atribuída à falha do patógeno em produzir quantidade inadequada dos fatores de patogenicidade, tal como as enzimas pectolíticas (PRUSKY, 1996). Wallace e Williams (1962) verificaram que a poligalacturonase, produzida por *Glomerella cingulata*, *Phylospora obtusa* e *Phylospora* sp. foi o fator determinante na suscetibilidade de frutos maduros de macieira. Essa enzima extracelular foi encontrada em maior quantidade em frutos maduros comparado a frutos verdes. Estudos com *Colletotrichum gloeosporioides* relataram que o *peg* de penetração, emitido na base do apressório, secreta cutinase, enzima extracelular que hidroliza cutina, um polímero estrutural presente na cutícula da planta (PODILA; DICKMAN; KOLATTUKUDY, 1988). A inibição da cutinase pode resultar no atraso da penetração no hospedeiro (PODILA et al., 1995).

Outro fator que é alterado com o processo de amadurecimento são os compostos tóxicos encontrados em alta concentração em frutos imaturos, como polifenóis e tanino, que inibem o crescimento do patógeno (BARKAI-GOLAN, 2001). A presença de compostos fenólicos em fruto imaturo de macieira inibiu a germinação de *Botrytis cinerea* e o crescimento micelial de três fungos patogênicos. Os compostos fenólicos foram encontrados em maior nível na superfície de fruto verde e declinou progressivamente com o amadurecimento (NDUBIZU, 1976). Em trabalhos mais recente, dois compostos antifúngicos pré-formados, identificados como fenóis, foram encontrados apenas em frutos verdes de morangueiro. Esses compostos inibiram o desenvolvimento de *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento (TERRY et al., 2004). Abacate imaturo foi resistente ao *Colletotrichum gloeosporioides* devido à presença de alta concentração de compostos antifúngicos pré-formados (PRUSKY, 1996; PRUSKY; KEEN, 1993). O *peg* de penetração penetrou na cutícula, porém permaneceu quiescente por sete dias, quando a concentração de diene (1-acetoxi-2-

hidroxi-4-oxo-heneicosano-12,15-diene) reduziu de 3800 para 100-110 µg/g peso fresco (PRUSKY et al., 1982; PRUSKY; PLUMBLEY; KOBILER, 1991). Outro composto purificado e identificado foi o monoene (1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadecano-16-ene), sendo esse menos fungitóxico do que o diene (PRUSKY et al., 2008).

Em relação à disponibilidade nutricional, alguns autores descreveram que frutos imaturos não possuem nutrientes em níveis adequados para o patógeno. Com o amadurecimento ocorre a conversão de carboidratos insolúveis em açúcares solúveis, necessários ao desenvolvimento do fungo (BARKAI-GOLAN, 2001; SITTERLY; SHAY, 1960). Alteração na concentração de frutose, glicose e sorbitol contribuíram para a suscetibilidade de nectarina e ameixa, em plena maturação fisiológica ao *Botrytis cinerea*. Em nectarina, o aumento da concentração de açúcar foi correlacionado com pronunciado aumento do tamanho da célula vegetal (FOURIE; HOLZ, 1998). Relação direta entre o conteúdo de açúcar e incidência de mofo cinzento foi verificada em bagas de uva inoculadas com *Botrytis cinerea*. Porém, os autores descreveram a provável ação de fatores paralelos no aumento da suscetibilidade das bagas, como a redução de compostos fenólicos (MUNDY; BERESFORD, 2007), concordando com Prusky (1996). Por outro lado, em experimentos realizados com discos de frutos de abacateiro suplementados com glicose, sacarose ou ácido poligalacturônico não foi observado alteração no desenvolvimento de *C. gloeosporioides*. Com isso, o resultado sugeriu que a resistência dos frutos imaturos não foi relacionada com a disponibilidade de nutrientes (PRUSKY; ASCARELLI; JACOBY, 1984).

3.2.1.4 Condições ambientais

O processo de infecção é altamente influenciado pelas condições climáticas, principalmente temperatura e período de molhamento (HUBER; GILLESPIE, 1992). Os requerimentos ambientais são distintos de acordo com a fase de desenvolvimento da estrutura de infecção (BARKAI-GOLAN, 2001). O desenvolvimento das estruturas de infecção de *Guignardia psiidi* na superfície de frutos de goiabeira foram estudados em diferentes condições de temperatura e período de molhamento. Os autores observaram aumento gradual na porcentagem de germinação dos conídios e formação de apressórios, sob umidade contínua, a partir de 10 °C, atingindo máximo a 26,7 e 25,5

°C, respectivamente e decaindo até 40 °C (ESCANFERLA et al., 2009). A faixa de temperatura favorável à germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da antracnose em morangos foi de 23 °C a 27,7 °C mas para o desenvolvimento de apressórios foi de 17,6 °C a 26,5 °C e para a produção de novos conídios a partir dos apressórios foi de 21 °C a 32,7 °C (LEANDRO et al., 2003). Para *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de manga, a temperatura ótima para a formação de apressório foi 25 °C, enquanto que para o apressório tornar-se melanizado foi 30 °C e para a formação do peg de penetração foi 25 °C (ESTRADA; DODD; JEFFRIES, 2000).

Requerimentos ambientais para a germinação de *Venturia nashicola* foram estudados *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 2003; LI et al., 2005). A germinação do conídio ocorreu em grande amplitude de temperatura entre 5 e 30 °C, com ótima de 21°C e com umidade relativa superior a 97%. Em experimentos com período descontínuo de molhamento, os autores observaram redução progressiva da germinação dos conídios com o aumento das horas de seca, especialmente a 28 °C. No patossistema pêra - *Venturia pirinae*, o período de molhamento requerido para a infecção foi de 29, 15, 10, 9 e 9 horas, respectivamente em 4, 10, 15, 20 e 25 °C (VILLALTA et al., 2000).

A interação entre temperatura e período de molhamento foi usada em modelos epidemiológicos para otimizar o controle de doenças no campo. Assim, o estudo dessas variáveis climáticas favoráveis ao patógeno permitiu a implantação de sistema empírico de avisos, como observado nos patossistemas morango-*Colletotrichum acutatum* (WILSON et al., 1990) e manga - *C. gloeosporioides* (DODD et al., 1991).

3.2.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia e nos Laboratórios do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP.

3.2.2.1 Implantação dos experimentos

Para a realização dos experimentos, foram utilizados frutos de goiabeira da variedade 'Kumagai', provenientes do Sítio Maracujá II, no município de Campinas, Estado de São Paulo. Inicialmente, os frutos foram desinfestados com hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos, lavados em água corrente, secos e acondicionados em bandejas plásticas transparente previamente desinfestadas com álcool 70%. Em seguida, foram realizados os procedimentos de inoculação na superfície dos frutos.

3.2.2.2 Obtenção do isolado e preparo da suspensão de conídios

O isolado de *C. gloeosporioides* utilizado foi obtido de fruto de goiabeira doente, coletado de plantio comercial e foi cultivado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Posteriormente foi identificado por PCR, por meio de primer específico (CgInt) segundo metodologia descrita por Mills; Sreenivasaprasad e Brown (1992). Subsequentemente, o isolado foi transferido para meio de aveia e incubado sob luz contínua e temperatura ambiente. Após sete dias, discos de 0,5 cm de diâmetro do meio de cultura com o patógeno foram retirados e colocados sobre frutos maduros de goiabeira sadios. Em seguida, os frutos foram colocados em bandejas plásticas, incubados em câmara úmida e mantidos em temperatura ambiente para desenvolvimento das lesões. Após aproximadamente oito dias, os conídios foram coletados, por meio de lavagem das lesões com água destilada esterilizada. Preparou-se a suspensão com 10^5 conídios por mL de água destilada esterilizada, com o auxílio do hemacitômetro.

3.2.2.3 Temperatura e período de molhamento: Pré-penetração de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*

Três alíquotas de 40 μ L da suspensão de conídios foram depositadas sobre placas de poliestireno com 90 mm de diâmetro. Para obtenção de ambiente saturado de umidade, as placas foram mantidas abertas em caixas gerbox com 3 folhas de papel filtro umedecidas com 15 mL de água destilada. As caixas foram acondicionadas em câmaras de crescimento (Ação científica, modelo AC 71) com temperaturas ajustadas para 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C e períodos contínuos de molhamento de 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Para a interrupção do processo de germinação foram adicionados 15 μ L

de lactoglicerol à suspensão fúngica após os tempos estabelecidos. A quantificação das porcentagens de conídios germinados, formação de apressórios e apressórios melanizados foram obtidas em microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Alemanha) com aumento de 400x. As imagens foram registradas com câmera fotográfica acoplada ao microscópio.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, utilizando esquema fatorial, com sete temperaturas e cinco períodos de molhamento. Foram utilizados seis repetições, sendo cada repetição constituída por uma gota da suspensão de conídios. Em cada gota foram quantificados 100 conídios aleatoriamente. O conídio foi considerado germinado quando o tubo germinativo excedeu a metade do diâmetro do mesmo. O experimento foi realizado duas vezes.

3.2.2.4 Temperatura e período de molhamento: Pré-penetração de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides in vivo*

Alíquotas de 40 µL da suspensão de conídios foram depositadas sobre a superfície de frutos de goiabeira da variedade 'Kumagai', com 110 dias após a queda das pétalas, ou seja, em plena maturidade fisiológica. A maturidade fisiológica é o estágio de desenvolvimento que o fruto continuará sua ontogenia, mesmo que destacada da planta (WATADA et al., 1984). A suspensão foi colocada em círculos de 0,5 cm de diâmetro, previamente demarcados, com o auxílio de adesivos, para facilitar a localização das estruturas durante os estudos de microscopia eletrônica. Os frutos foram acomodados em bandejas plásticas previamente desinfestadas com álcool 70%, contendo 3 folhas de papel de filtro saturadas com água e incubados nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C e períodos contínuos de molhamento de 6, 12 e 24 horas. Após o período estabelecido, foram retiradas, com o auxílio de bisturi, amostras do tecido vegetal inoculado. Essas amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo solução fixadora de Karnovsky modificada (2,5% glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M – pH 7,2 e CaCl₂ 0,001M) e armazenadas em geladeira por período mínimo de 48 horas, sendo em seguida processadas segundo técnicas usuais do NAP/MEPA, ESALQ-USP. As amostras foram lavadas em solução tampão de cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2) por três vezes,

durante 10 minutos e transferidas para solução de tetróxido de ósmio 1% em água por duas horas. Subseqüentemente, foram lavadas em água destilada e desidratadas em série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 10 minutos em cada concentração. Ao final, mais duas imersões em acetona 100% (10 minutos cada) foram realizadas para garantir a total desidratação dos tecidos. Em seguida, iniciou-se a secagem ao ponto crítico, por meio de imersão das amostras em gás carbônico líquido, em aparelho Balzers modelo CPD 030 (Balzers, Lichtenstein) e posterior fixação em suportes de alumínio (“stubs”), utilizando-se fita de carbono dupla face. Após esse passo, procedeu-se a metalização com vapor de ouro em equipamento Balzers modelo MED 010 (Balzers Union, Lichtenstein), a 50 mA, por 180 segundos. A visualização das amostras foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss modelo DSM 940A (Carl Zeiss, Alemanha) e as imagens foram registradas em arquivo eletrônico.

Foram observados detalhes da deposição e adesão dos conídios e quantificada as porcentagens de conídios germinados e formação de apressórios. Amostrou-se aleatoriamente 100 conídios em cada repetição. O experimento foi realizado duas vezes, com cinco repetições para cada tratamento.

3.2.2.5 Frutos de goiabeira com diferentes idades: Pré-penetração e penetração

Frutos de goiabeira da variedade ‘Kumagai’ com 10, 35, 60, 85 e 110 dias após queda das pétalas (diâmetros aproximados de 1, 2, 3, 5 e 7 cm, respectivamente) (Figura 1) foram colhidos e inoculados como descrito no item anterior. Em seguida, os frutos foram acondicionados em câmara de crescimento (Ação científica, modelo AC 71) por 48 horas a 25 °C. Após esse período, foram retiradas, com o auxílio de bisturi, amostras do tecido inoculado, mantendo-as em solução fixadora de Karnovsky modificada por 48 horas, em geladeira. Em seguida, as amostras foram processadas para visualização em microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, segundo técnicas rotineiras do NAP/MEPA.



Figura 1 - Cinco diferentes idades de frutos de goiabeira variedade 'Kumagai'. Da esquerda para a direita, frutos com 10 dias, 35 dias, 60 dias, 85 dias e 110 dias após queda das pétalas

Foram quantificadas a porcentagem de conídios germinados e a formação de apressórios em frutos com diferentes idades. Para cada repetição, foram observados, aleatoriamente 100 conídios.

Para examinar os aspectos ultraestruturais do processo de infecção nas diferentes idades de frutos, ao microscópio eletrônico de transmissão, as amostras foram processadas como descrito para microscopia eletrônica de varredura, até a fixação em ósmio 1% por duas horas. Posteriormente, as amostras foram cortadas em pedaços menores (aproximadamente 0,1 por 0,3 cm) e contrastadas “em bloc” com acetato de uranila 0,5% por uma noite, desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 10 minutos em cada concentração. Subsequentemente, a pré-infiltração das amostras em resina epóxica de baixa viscosidade (Spurr) foi realizada em mistura de resina e acetona na proporção 1:1 por aproximadamente quatro horas. Em seguida, iniciou-se a infiltração em resina pura durante uma noite, em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras permaneceram na estufa (70 °C) por 72 horas. Os bloquinhos resultantes foram desbastados em Trimmer Leica (Leica, Áustria) e seccionados em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT (Leica, Áustria).

Inicialmente, foram realizados cortes semi-finos (300 nm), com navalha de vidro, para visualizar ao microscópio de luz as estruturas fúngicas e orientar os cortes ultrafinos (60-70 nm). Posteriormente, com navalha de diamante (Diatome 45°) foram obtidas as secções ultrafinas. Essas secções foram depositadas sobre telinhas de cobre (100 mesh) previamente recobertas com película de “formvar” e contrastadas com acetato de uranila (3%) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) durante 15

minutos cada. Em seguida foram lavadas com água destilada e secas em papel de filtro. As observações foram feitas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 (Carl Zeiss, Alemanha) e as fotos documentadas em arquivo eletrônico ou filme fotográfico.

3.2.2.6 Frutos de goiabeira com diferentes idades: Alteração morfológica e química

Para visualizar as alterações morfológicas e químicas do tecido vegetal ao microscópio de luz, após a fixação em solução Karnovsky modificada, como descrito anteriormente, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 10 minutos em cada concentração. Ao final, mais duas imersões em etanol 100% (10 min cada) foram realizadas para garantir a total desidratação dos tecidos. Posteriormente, a infiltração em resina acrílica foi iniciada com a pré-infiltração de resina e etanol PA na proporção de 1:1 por aproximadamente cinco horas. Em seguida, foi realizada a infiltração em resina pura, mantendo-se por uma noite em temperatura ambiente. Os blocos polimerizados foram seccionados em micrótomo rotativo manual Spencer Lens Co. (Estados Unidos), com cinco μm de espessura, sendo as secções dispostas imediatamente em lâminas histológicas de vidro e posteriormente coradas.

Foram utilizados dois corantes. Azul de toluidina e ACN (“Astrablue-Chrysoïdin-New”) foram usados para visualizar as estruturas do tecido vegetal e fenóis. Lâminas foram imersas em azul de toluidina a 0,05% (FEDER; BRIEN, 1968) por cinco minutos e posteriormente lavadas em água corrente e secas naturalmente. Estruturas do tecido vegetal foram coradas de azul e os fenóis de verde. Porém, para confirmar as substâncias fenólicas, as lâminas foram imersas em ACN (“Astrablue Chrysoïdin New”) modificado (NEUMÜLLER, 2005) e processadas como descrito acima. Subsequentemente, as secções coradas foram cobertas por lamínula de vidro, seladas com Permount[®] e analisadas ao microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Alemanha).

Para examinar o espessamento da cutícula de frutos de goibeira em diferentes idades, ao microscópio eletrônico de transmissão, as amostras foram preparadas como descrito no item anterior.

3.2.2.7 Análise estatística

Os dados de germinação de conídios, formação de apressórios e apressórios melanizados em função da temperatura e molhamento foram analisados por meio de regressões não-lineares. Nos experimentos *in vitro*, o modelo beta-monomolecular, proposto por Hau e Kranz (1990), descrito pela equação

$$Y=[B1*((T-B2)^{B3})*((B4-T)^{B5})]*[B6*(1-B7*\exp(-B8*M))]$$

em que, Y corresponde a taxa de germinação de conídios, formação de apressórios ou apressórios melanizados, T corresponde à temperatura (°C), M corresponde ao período de molhamento (horas), B2 e B4 representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima, B5 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica, B8 está relacionado à velocidade de aumento da variável dependente em função do molhamento e B1, B3, B6 e B7 são parâmetros da equação, sem significado biológico. O modelo foi ajustado aos dados, utilizando-se o programa Statística 6.0 (Tulsa, Statsoft).

A análise dos dados coletados *in vivo* foi feita de maneira diferente, pois o número de temperaturas testadas, assim como os períodos de molhamento foram menores do que no experimento *in vitro*. Dessa forma, não foi possível ajustar uma superfície de resposta utilizando o modelo beta-monomolecular, que possui oito parâmetros. Assim, os dados coletados *in vivo* foram analisados por meio de regressões não-lineares, utilizando-se o procedimento LOGISTIC do programa SAS para o seguinte modelo

$$Y=\exp(\beta)/1+\exp(\beta)*100$$

em que, Y corresponde à taxa de germinação de conídios ou formação de apressórios e o β é o preditor linear que corresponde à combinação dos parâmetros T (temperatura), M (molhamento) e P (parâmetros da equação) que, em todos os casos, foram representados da seguinte forma: $(P1*M + P2*M^2 + P3*T + P4*T^2)$.

Para o experimento realizado com frutos de goiabeira em diferentes idades, a análise estatística foi realizada no programa SAS utilizando o procedimento "GLM" (LITTELL et al., 2006).

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Temperatura e período de molhamento: Pré-penetração de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*

A germinação de conídios, formação de apressórios e apressórios melanizados ocorreram sob grande amplitude de temperaturas, variando de 10 a 35 °C, como pode ser verificado pelo ajuste do modelo beta-monomolecular (Figura 2). A superfície de resposta para estimar a germinação de conídios (Figura 2A) foi descrita pela função,

$$Y=[0,653*((T-4,760)^{0,76})*((40-T)^{0,74})]*[1,636*(1-0,795 \exp(-0,064*M))]$$

A formação de apressórios (Figura 2B) pela função,

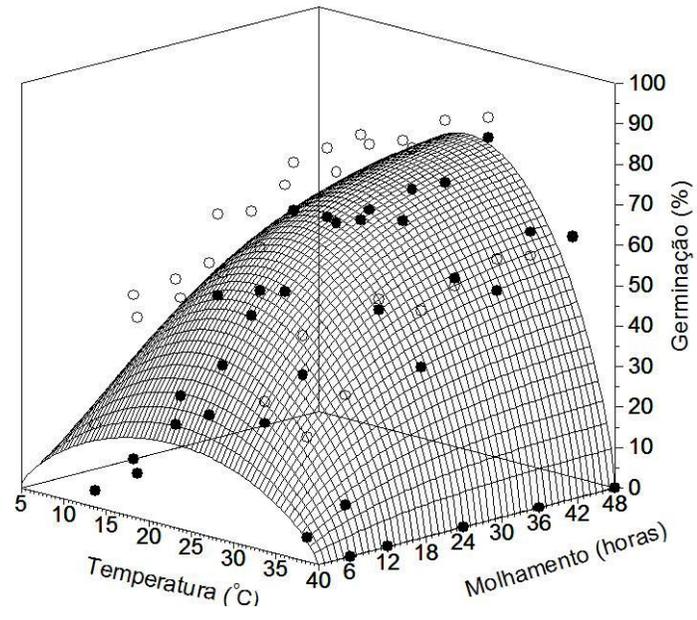
$$Y=[0,0002*((T-4,032)^{1,81})*((40,869-T)^{2,23})]*[(2,805*(1-0,996*\exp(-0,079*M)))]$$

E a formação de apressórios melanizados (Figura 2C) pela função,

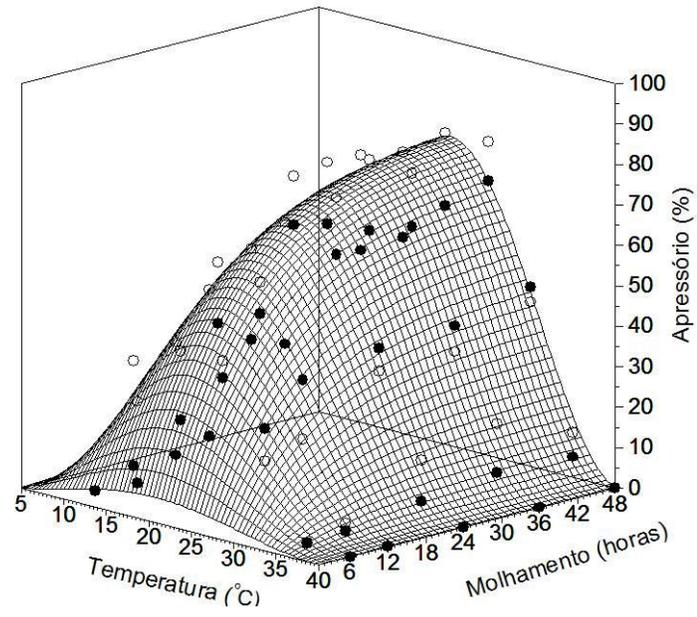
$$Y=[0,002*((T-6,122)^{1,42})*((40-T)^{1,43})]*[(14,204*(1-1,499*\exp(-0,081*M)))]$$

Para as três funções descritas acima, Y corresponde a variável analisada, T a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas.

A



B



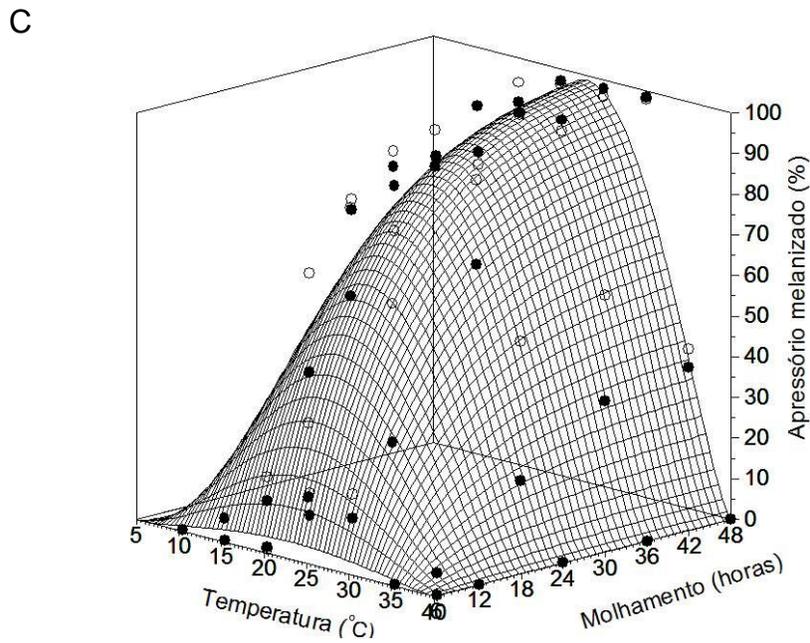


Figura 2 - Superfície de resposta da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* (A), formação de apressórios (B) e apressórios melanizados (C), em função da temperatura e da duração do período de molhamento *in vitro*. Círculos brancos representam dados do primeiro experimento e pretos representam dados do segundo experimento

As variáveis estudadas atingiram o máximo entre 20 e 25 °C, sendo 22,7 °C para germinação de conídios, 20,6 °C para a formação de apressórios e 23,0 °C para formação de apressórios melanizados, com 48 horas de molhamento, que corresponderam a 78% de conídios germinados, 76% de apressórios formados e 98% de apressórios melanizados. A 10 e 35 °C, o período de molhamento necessário para germinação de conídios foi de 12 e seis horas, respectivamente (Figura 3A). Para a formação de apressórios o período de molhamento foi de 12 horas e para a formação de apressórios melanizados foi 24 horas, em ambas as temperaturas (Figuras 3C e K). A 40 °C não houve germinação dos conídios (Figura 3L). Os apressórios foram sésseis ou formados na extremidade dos tubos germinativos (Figura 3). A 20 e 25 °C, foi observado tubo germinativo ramificado com a formação de dois ou mais apressórios por conídio (Figuras 3G-I). A 30 °C, os apressórios foram sésseis ou emitidos na extremidade de tubo germinativo curto (Figura 3E). A 35 °C houve a formação de tubo germinativo longo (Figura 3K).

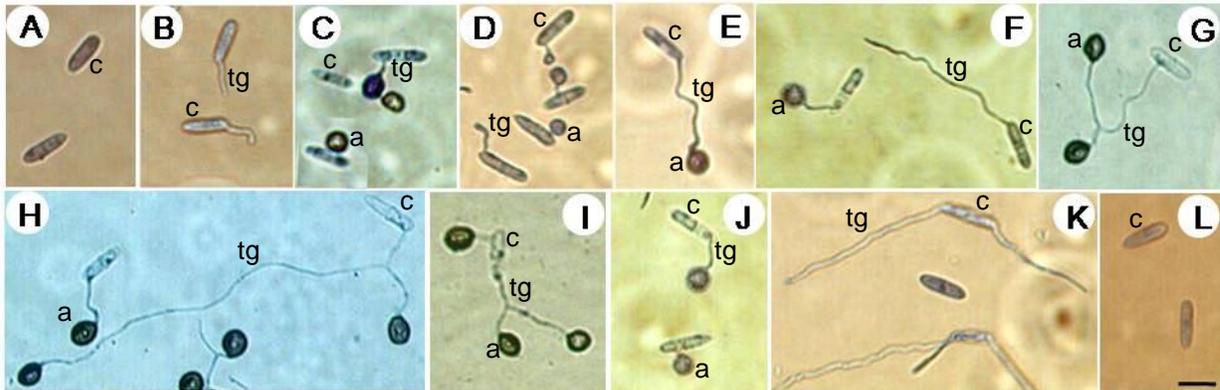


Figura 3 - Aspecto dos conídios e demais estruturas fúngicas de *C. gloeosporioides* submetidos a diferentes temperaturas e períodos de molhamento observados ao microscópio de luz. **A.** Conídios não germinados sob temperatura de 10 °C com 6 horas de molhamento; **B e C.** Elongação do tubo germinativo e formação de apressórios sob temperatura de 10 °C com 12 e 24 horas de molhamento, respectivamente; **D e E.** Conídios, tubos germinativos e apressórios sob temperatura de 15 °C com 6 e 48 horas de molhamento, respectivamente; **F e G.** Conídios, tubos germinativos e apressórios sob temperatura de 20 °C, com 6 e 24 horas de molhamento, respectivamente; **H e I.** Conídios, tubos germinativos e apressórios sob temperatura de 25 °C, com 12 e 24 horas de molhamento; **J.** Conídios, tubo germinativo e apressórios sob temperatura de 30 °C, com 12 horas de molhamento; **K.** Conídios e tubos germinativos sob temperatura de 35 °C, com 12 horas de molhamento. **L.** Conídios não germinados sob temperatura de 40 °C, com 48 horas de molhamento. (Barra = 10µm). a = apressório; c = conídio; tg = tubo germinativo

A germinação de conídios, formação de apressórios e apressórios melanizados aumentaram progressivamente com o aumento das horas de molhamento. Seis horas de molhamento a 25 °C resultou em 36% de conídios germinados, 26% de apressórios formados e 9% de apressórios melanizados. Com 12 horas de molhamento os valores aumentaram para 50, 42 e 65%, respectivamente.

3.2.3.2 Temperatura e período de molhamento: Pré-penetração de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* *in vivo*

Na superfície de frutos de goiabeira, foi utilizado o modelo $Y = \frac{\exp(\beta)}{1 + \exp(\beta)} * 100$ para ajustar a relação entre temperatura, período de molhamento e eventos de pré-penetração. A superfície de resposta da germinação de conídios (Figura 4A) foi descrita pela função,

$$Y = \frac{\exp(-14,162 + (0,098 * M) + (1,211 * T) - (0,027 * T^2))}{[1 + \exp(-14,162 + (0,098 * M) + (1,211 * T) - (0,027 * T^2))]} * 100$$

A formação de apressórios (Figura 4B) obedeceu a função,

$$Y = \frac{\exp(-7,185 + (0,086 * M) + (0,531 * T) - (0,011 * T^2))}{[1 + \exp(-7,185 + (0,086 * M) + (0,531 * T) - (0,011 * T^2))]} * 100$$

sendo, Y a variável analisada, T a temperatura (°C) e M o período de molhamento (horas).

De acordo com o modelo, a faixa de temperatura que apresentou maior percentagem de conídios germinados e formação de apressórios foi de 20 a 25 °C, com 24 horas de molhamento, sendo 22,4 °C para germinação de conídios e 23,3 °C para formação de apressórios, que corresponderam a 86% e 74%, respectivamente. Nas temperaturas de 10 e 30 °C, as variáveis estudadas atingiram valores médios inferiores a 20%, com 12 horas de molhamento.

Germinação de conídios e formação de apressórios aumentaram gradativamente com o aumento das horas de molhamento em todas as temperaturas testadas. Por exemplo, a 25 °C a germinação dos conídios e formação de apressórios passaram, respectivamente, de 46% e 35% com seis horas de molhamento para 60% e 50% com 12 horas de molhamento. Com seis horas de molhamento a 10 °C não foi observado germinação de conídios.

Em todas as combinações de temperatura e período de molhamento, foram observados conídios de *C. gloeosporioides* germinados e não germinados, tubo germinativo longo e curto, apressório sésil ou formado na extremidade do tubo germinativo (Figura 5). A ramificação do tubo germinativo foi observado nas temperaturas de 20 e 25 °C, após 12 horas de molhamento.

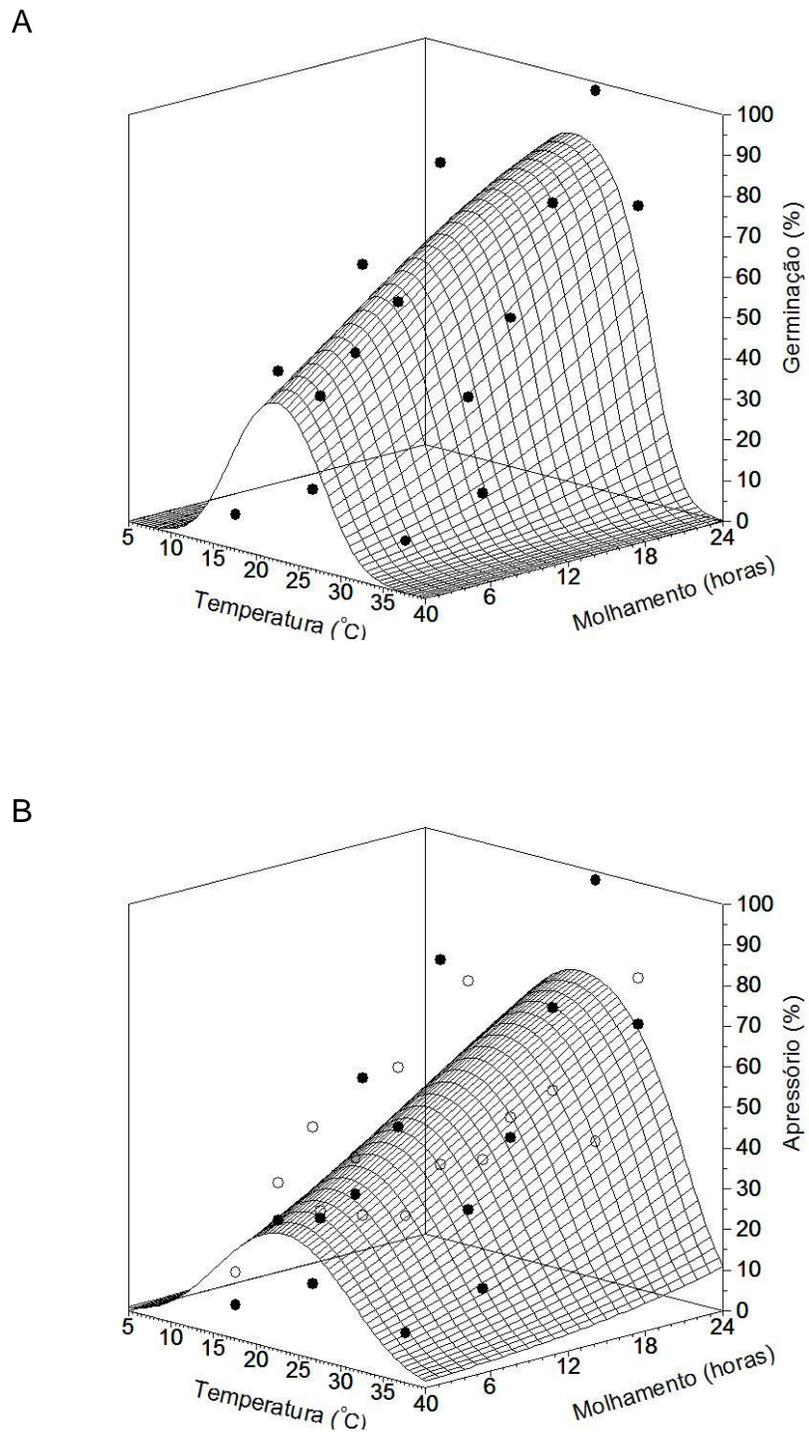


Figura 4 - Superfície de resposta para germinação de conídios de *C. gibeosporioides* (A) e formação de apressórios (B), em função da temperatura e da duração do período de molhamento *in vivo*. Círculos brancos representam dados do primeiro experimento e pretos representam dados do segundo experimento

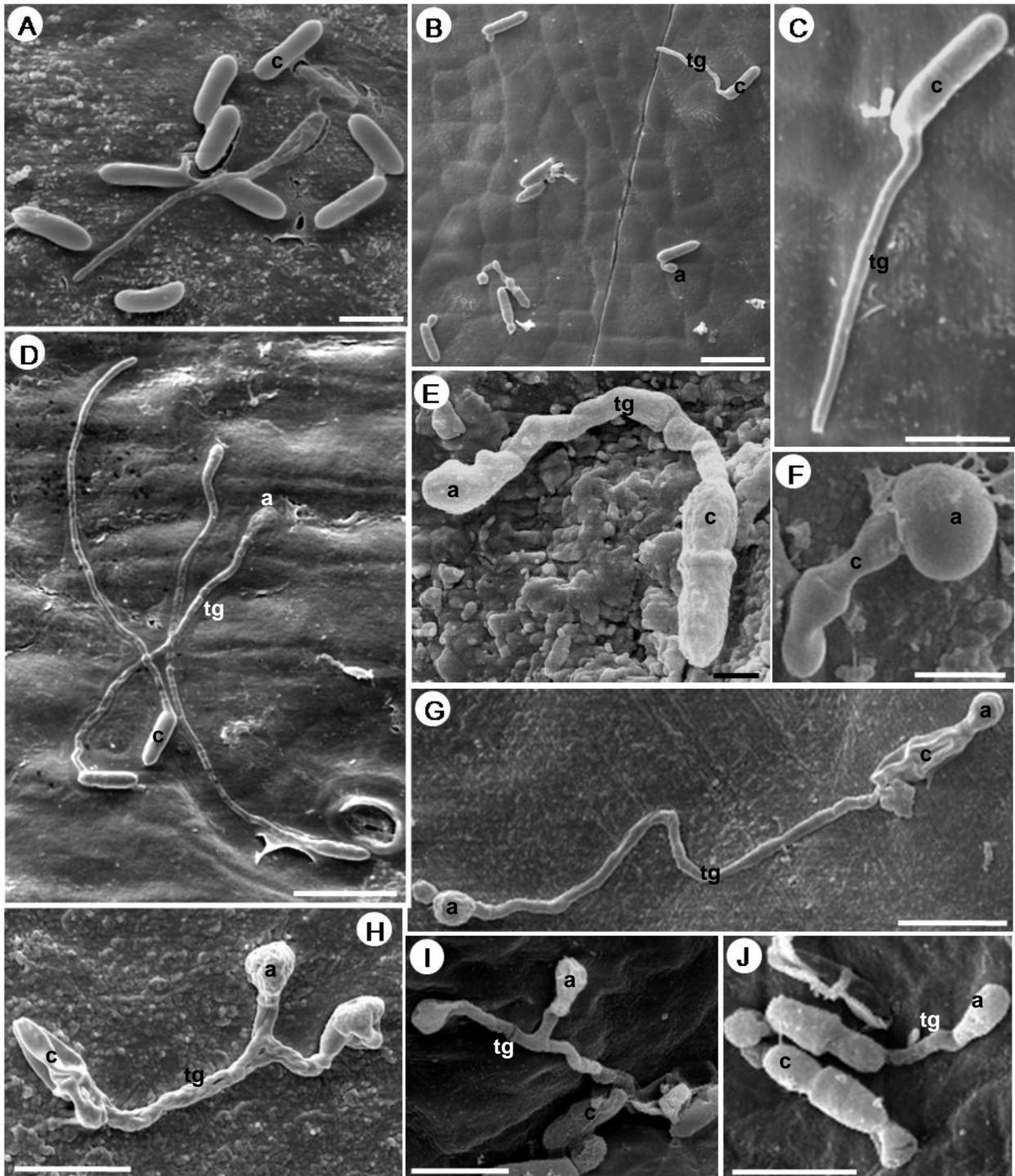


Figura 5 - Pré-penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba. **A.** Conídios não germinados após 12 h de molhamento a 10 °C (Barra = 10 µm); **B.** Conídios germinados, tubo germinativo e apressórios após 6 h a 15 °C (Barra = 20 µm); **C.** Tubo germinativo após 24 h a 15 °C (Barra = 10 µm); **D.** Conídios germinados, tubos germinativos longos e apressório após 24 h a 25 °C (Barra = 20 µm); **E.** Apressório na extremidade do tubo germinativo após 12 h de molhamento a 20 °C (Barra = 2 µm); **F.** Apressório sésseil após 12 h a 20 °C (Barra = 5 µm); **G.** Conídio germinado emitindo um apressório sésseil e um apressório na ponta do tubo germinativo após 12 h a 25 °C (Barra = 10 µm); **H.** Tubo germinativo ramificado após 12 h a 20 °C (Barra=10 µm); **I.** Tubo germinativo ramificado após 12 h a 25 °C (Barra= 10 µm); **J.** Conídios e apressórios após 24 h a 30 °C (Barra = 10 µm). a = apressório; c = conídio; tg = tubo germinativo

3.2.3.3 Frutos de goiabeira com diferentes idades: Pré-penetração e penetração

A influência das diferentes idades de frutos de goiabeira, quantificada ao microscópio eletrônico de varredura, não foi significativa para germinação de conídios de *C. gloeosporioides* ($P=0,2453$) e formação de apressórios ($P=0,3065$), sendo verificada alta porcentagem das variáveis analisadas em todos os frutos (Figuras 6 e 7).

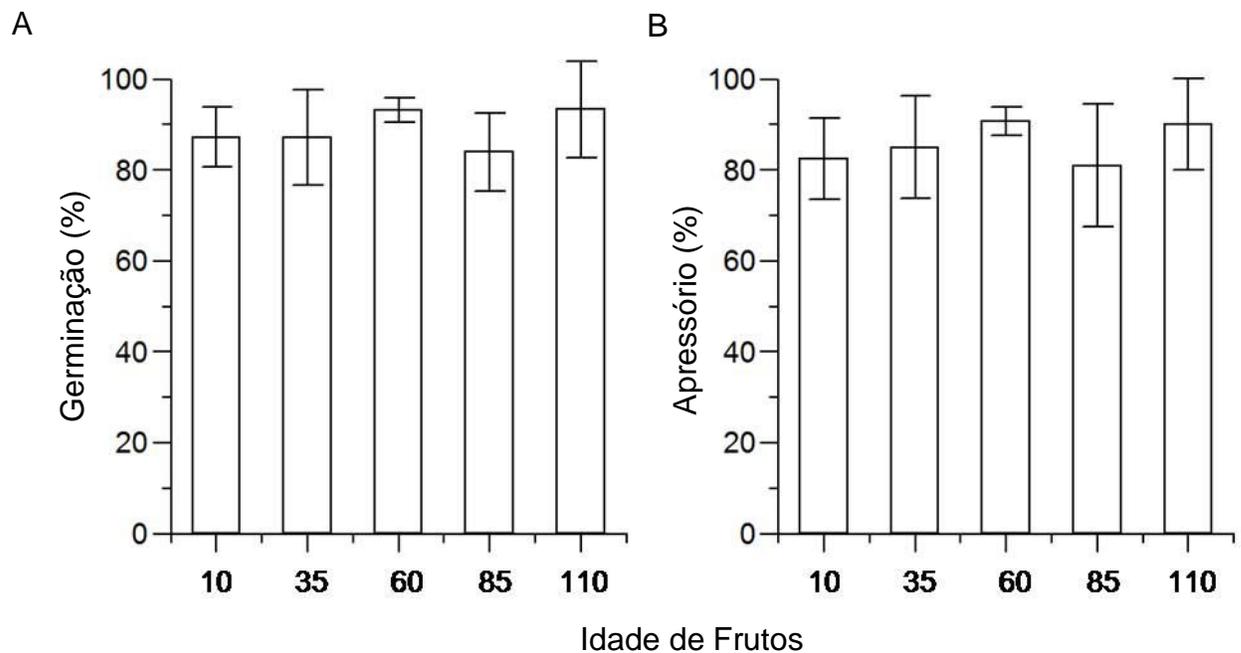


Figura 6 - Pré-penetração de *C. gloeosporioides* em frutos de goiabeira com diferentes idades (dias após a queda das pétalas). **A.** Porcentagem de conídios germinados; **B.** Porcentagem de apressórios formados. As barras representam o erro padrão

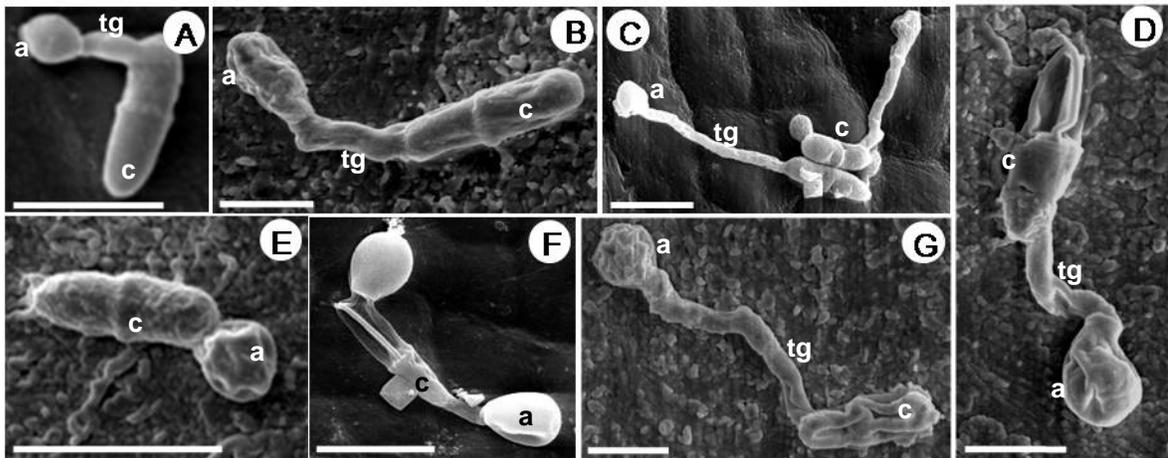


Figura 7 - Pré-penetração de *C. gloeosporioides* em frutos de goiabeira com diferentes idades. **A e B.** Conídios, tubos germinativos e apressórios na superfície de frutos com 10 dias após a queda das pétalas (Barra = 10 μm e 5 μm , respectivamente); **C.** Conídios, tubos germinativos e apressórios em frutos com 35 dias após queda das pétalas (Barra = 10 μm); **D.** Conídio, tubo germinativo e apressório em frutos com 110 dias após queda das pétalas (Barra = 10 μm); **E.** Conídio e apressório em fruto com 65 dias após queda das pétalas (Barra = 5 μm); **F e G.** Conídios, tubo germinativo e apressórios em frutos com 85 dias após queda das pétalas (Barra = 10 μm). a = apressório; c = conídio; tg = tubo germinativo

Ao microscópio eletrônico de transmissão foi observada a penetração direta de *C. gloeosporioides* na cutícula dos frutos de goiabeira, por meio da formação do *peg* de penetração, desenvolvido na base do apressório. O *peg* foi verificado apenas em frutos com 85 e 110 dias após a queda das pétalas, o qual ficou restrito à cutícula, não atingindo as células epidérmicas (Figuras 8C-D). Além disso, foi observado material adesivo extracelular associado ao conídio e aos apressórios. Em frutos com 60 dias após a queda das pétalas, não foi visualizada a emissão do *peg* de penetração, no entanto foram observados poros na parede celular do apressório, no local onde provavelmente seria emitido o *peg* de penetração. Material adesivo extracelular esteve sempre presente ao redor do apressório (Figuras 8A-B). Em frutos com 10 e 35 dias após a queda das pétalas não foi observado o *peg* de penetração, mas os apressórios permaneceram aderidos à superfície (Figuras 7A-C).

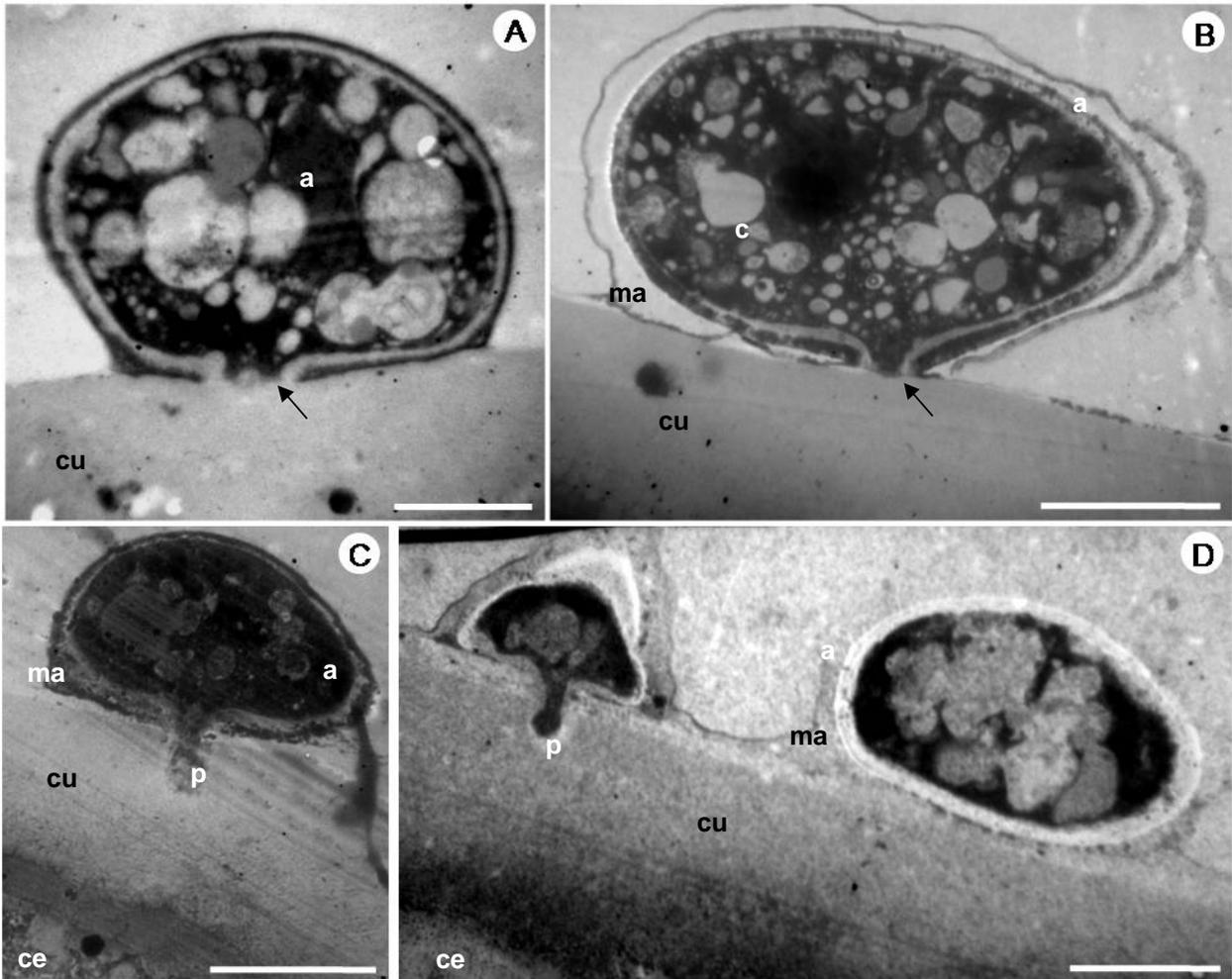


Figura 8 - Aspecto ultraestrutural do processo de infecção de *C. gloeosporioides* em frutos de goiabeira com diferentes idades. **A e B.** Apressórios com poro na parede celular (seta) no local onde seria emitido o *peg* de penetração com a maturação do fruto sobre a superfície do fruto com 65 dias após queda das pétalas (Barra = 1 μ m e 2 μ m, respectivamente); **C.** Apressório envolvido por material adesivo extracelular e *peg* de penetração na cutícula do fruto com 85 dias após queda das pétalas (Barra = 2 μ m); **D.** Conídio de *C. gloeosporioides* e apressório, envolvidos por material adesivo extracelular em fruto com 110 dias após a queda das pétalas. *Peg* de penetração restrito a cutícula (Barra = 2 μ m). a = apressório; c = conídio; ce = célula epidérmica; cu = cutícula; ma = material adesivo extracelular; p = *peg* de penetração

3.2.3.4 Frutos de goiabeira com diferentes idades: Alteração morfológica e química

Foram observadas alterações anatômicas e química nos frutos com diferentes idades (Figura 9).

Frutos de goiabeira com 10 dias após a queda das pétalas (Figuras 9A e F) apresentaram arquitetura celular adensada e homogênea, ausência de espaços intercelulares, maior quantidade de estruturas secretoras internas (cavidades lisígenas), além da maior quantidade de esclereídeos agrupados (células pétreas) quando comparado com os demais frutos (MÔRO et al., 2003). Os esclereídeos por apresentarem parede secundária lignificada, agem como barreira mecânica a fitopatógenos. Esses foram evidenciados pela cor azul claro em secções coradas com azul de tolúidina e pela cor amarela quando coradas com ACN.

Frutos com 35 (Figuras 9B e G) e 60 dias após queda das pétalas (Figuras 9C e H), apresentaram características similares aos frutos com 10 dias, porém foi verificado ligeiro declínio no número de cavidades lisígenas, de esclereídeos, além do aumento no tamanho das células e nos espaços intercelulares.

Frutos a partir de 85 dias (Figuras 9D-E e I-J), tiveram maior transformação histológica. As células tornaram-se maiores e mais espaçadas uma das outras, formando grandes espaços intercelulares. As cavidades lisígenas tornaram-se ausentes. Além disso, no parênquima, as células alongaram-se radialmente ao redor dos esclereídeos agrupados.

As secções evidenciaram compostos fenólicos presentes nos vacúolos celulares da epiderme e do parênquima. Com o aumento da idade dos frutos houve redução na quantidade desses compostos. Os compostos foram identificados pela cor azul-esverdeada em secções coradas com azul de toluidina (Figura 9A-E) e pela cor alaranjada em secções coradas com ACN (Figura 9F-J).

A espessura da cutícula também foi alterada com a idade dos frutos (Figura 10). Houve redução gradual da espessura com o aumento da idade dos frutos.

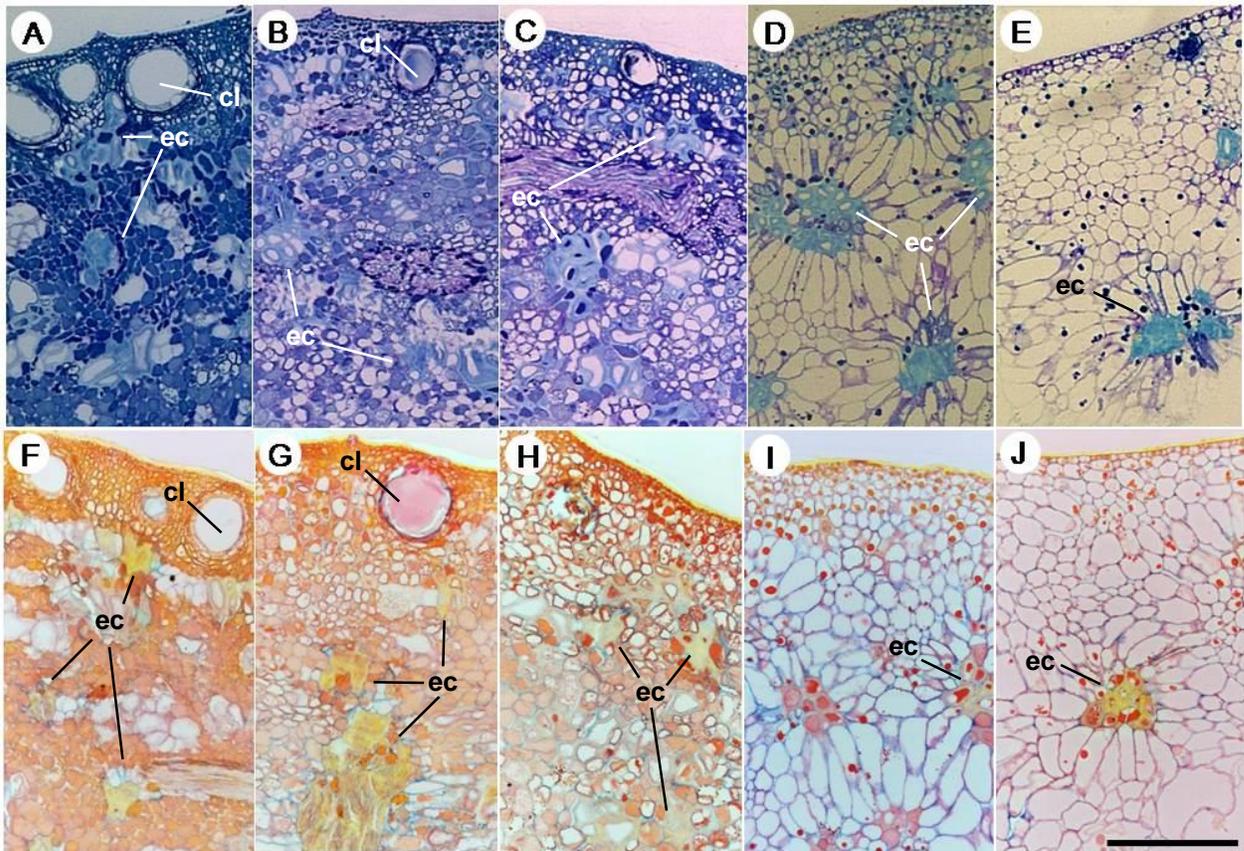


Figura 9 - Imagens de microscopia de luz. **A - E**, Cortes de frutos com cinco diferentes idades (10 dias, 35 dias, 60 dias, 85 dias e 110 dias após a queda das pétalas, respectivamente) utilizando corante toluidina; **F - J**, Cortes de frutos com cinco diferentes idades (10 dias, 35 dias, 60 dias, 85 dias e 110 dias após a queda das pétalas, respectivamente) utilizando corante ACN. (Barra = 100 μ m). cl = cavidade lisígena; ec = esclereídeo

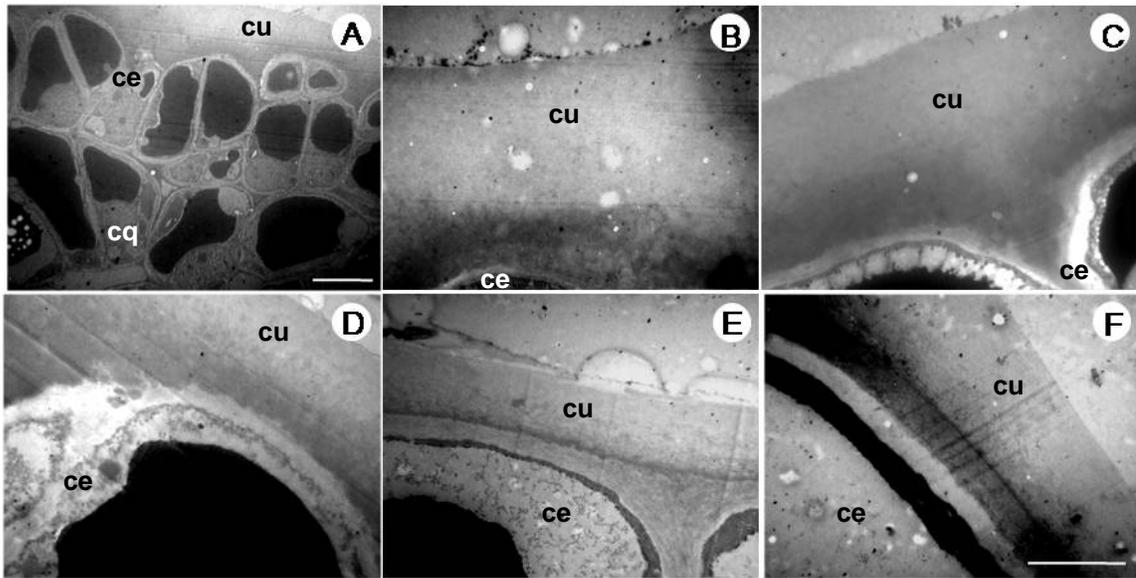


Figura 10 - Imagens ao microscópio eletrônico de transmissão. Espessura da cutícula de frutos de goiabeira, com diferentes idades. **A.** Visão Geral, cutícula, células epidérmicas e células parenquimáticas de fruto com 60 dias (Barra=5 μ m); **B - F.** Cutícula de fruto com 10 dias, 35 dias, 60 dias, 85 dias e 110 dias após queda das pétalas (Barra=10 μ m), respectivamente. ce = célula epidérmica; cq = célula parenquimática; cu = cutícula

3.2.4 Discussão

No presente trabalho, verificou-se a influência da temperatura e do período de molhamento na germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, na formação de apressórios e apressórios melanizados. Essas variáveis ocorreram sob ampla amplitude de temperatura, variando de 10 a 35 °C, com umidade contínua. Comportamento semelhante foi relatado por Soares, Lourenço e Amorim (2008) com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum*, provenientes de frutos de goiabeira. Assim como no presente trabalho, os autores verificaram que a 10 e 35 °C com seis horas de molhamento, os valores médios de conídios germinados e apressórios formados foram inferiores a 10%, a 40 °C não houve conídios germinados e as temperaturas favoráveis foram de 20 a 25 °C. A germinação de conídios em ampla faixa de temperatura pode inviabilizar o uso de sistemas de previsão de doenças se os valores de germinação forem elevados como observado no patossistema Pêra-*Venturia nashicola*, em que os conídios germinaram entre 5 e 30 °C, apresentando valores de

73,2% e 54,5% de conídios germinados, respectivamente, sendo a germinação máxima (91,3%) obtida a 20 °C (LI et al., 2003).

Os requerimentos ambientais ideais aos eventos de pré-penetração são dependentes do local de deposição dos conídios e da fase de desenvolvimento das estruturas de infecção. Nos ensaios *In vitro*, as temperaturas ótimas para a germinação de conídios, formação de apressórios e apressórios melanizados foram de 22,7, 20,6 e 23,0 °C, respectivamente, que corresponderam a 67% de conídios germinados, 66% de apressórios formados e 80% de apressórios melanizados, com 24 horas de molhamento. *In vivo* as temperaturas ótimas para germinação de conídios e formação de apressórios foram de 22,4 e 23,3 °C, com 86% de conídios germinados e 74% de apressórios formados. Essa diferença entre as variáveis estudadas *in vitro* e *in vivo* permitiu concluir que houve influência de compostos exógenos presentes na casca dos frutos de goiabeira. Situação semelhante foi observada na superfície de frutos de abacateiro, em que a cera agiu como sinalizador químico, pois induziu a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* e formação de apressórios (FLAISHMAN; HWANG; KOLATTUKUDY, 1995; PODILA; ROGERS; KOLATTUKUDY, 1993). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados com *Magnaporthe grisea*, agente causal da brusone do arroz. A cera encontrada nas folhas estimulou a formação de apressórios, porém a germinação de conídios não foi afetada (HEGDE; KOLATTUKUDY, 1997). Além da composição química a topografia da superfície de frutos também influencia a germinação de conídios e formação de apressórios (KOLATTUKUDY et al., 1995).

Estudos recentes, realizados com isolado de *Guignardia psidii*, agente causal da pinta preta em goiaba, relataram que as temperaturas ótimas para germinação de conídios e formação de apressórios *in vitro* foram 27,7 e 26,3 °C, respectivamente, que corresponderam a 31,3% de conídios germinados e 33,6% de apressórios formados. *In vivo*, as temperaturas ótimas foram 26,7 e 25,5 °C, com 50,4% de conídios germinados e 9,5% de apressórios formados, respectivamente (ESCANFERLA et al., 2009). No patossistema morango-*C. acutatum*, sob molhamento contínuo, as temperaturas favoráveis a germinação de conídios foram entre 23 e 27,7 °C, enquanto que para o desenvolvimento de apressórios foram entre 17,6 e 26,5 °C e para a produção de

conídios secundários foram entre 21,3 e 32,7 °C (LEANDRO et al., 2003). O mesmo ocorreu em folhas de oliveira atacadas por *Spilocaea oleagina*. Para germinação de conídios a temperatura ideal foi 20 °C e para formação de apressórios foi 15 °C (OBANOR et al., 2008).

Sob temperaturas favoráveis à germinação de conídios de *C. gloeosporioides* em manga foram observados ramificações no tubo germinativo após 48 horas (DINH et al., 2003) concordando com o resultado do presente trabalho, no qual as ramificações foram observadas apenas a 20 e 25 °C. Kolattukudy et al. (1995) relacionaram as ramificações no tubo germinativo, emitido de conídios de *C. gloeosporioides* com a exposição das estruturas fúngicas ao etileno. Esse resultado não está de acordo com o relatado no presente trabalho, pois as ramificações no tubo germinativo foram encontradas *in vitro* e *in vivo*.

Longos períodos de molhamento foram vitais para os eventos de pré-penetração. Germinação de conídios e formação de apressórios aumentaram progressivamente com a elevação das horas de molhamento. Com seis horas de molhamento a 10 °C não houve formação de apressórios *in vitro* e *in vivo*, enquanto com 12 horas de molhamento a formação de apressórios foi de 17% e 19%, respectivamente, e com 24 horas de molhamento foi de 24% e 37%. Em membrana de celulose a formação de apressórios de *C. gloeosporioides* iniciou após 12 horas de molhamento sob temperatura de 20, 25 e 30 °C. Foi observado aumento de 60%, aproximadamente, quando o período de molhamento passou de 12 para 30 horas (ESTRADA; DODD; JEFFRIES, 2000). Da mesma forma, Soares; Lourenço e Amorim (2008) relataram que períodos curtos de molhamento impedem a ocorrência de infecções de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

A infecção de frutos de morangueiro imaturos e maduros aumentou com a elevação do período de molhamento e temperatura até 30 °C, porém a incidência da doença foi maior nos frutos maduros (WILSON; MADDEN; ELLIS, 1990). *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* foram mais agressivos em frutos de morango em início de amadurecimento quando comparado a frutos jovens (10 dias após a antese) (TANAKA; PASSOS; ITO, 1994). Discordando desses resultados Xu e Robinson (2005) relataram

que o aumento da idade de frutos de macieira levaram à diminuição da incidência da sarna causada pelo fungo *Venturia inaequalis*.

No presente estudo, não foi observado diferença na germinação de conídios e formação de apressórios em frutos com diferentes idades. Esses resultados concordam com os obtidos em nectarina e ameixa inoculados com *Botrytis cinerea*. Em frutos verdes e maduros os conídios germinaram 3 horas após a inoculação e a formação de apressórios iniciou 9 horas após a inoculação. O *peg* de penetração foi formado após 72 horas da inoculação não ultrapassando a cutícula de frutos verdes (FOURIE; HOLZ, 1995). Por outro lado, frutos de goiabeira com diferentes idades apresentaram cinco vezes mais conídios de *G. psidii* germinados e oito vezes mais apressórios formados em frutos com 110 dias comparado a frutos com 10 dias após a queda das pétalas, porém não foi relatado a formação do *peg* de penetração (ESCANFERLA et al., 2009).

Diferentemente da germinação de conídios e formação de apressórios, o *peg* de penetração foi influenciado pela idade do fruto, sendo formado apenas em frutos de goiabeira com 85 e 110 dias após a queda das pétalas. Dessa forma, a penetração pode ser correlacionada com a espessura da cutícula, que reduziu com o aumento da idade do fruto. A cutícula é a primeira linha de defesa da planta, a qual deve ser vencida pelo patógeno para iniciar o processo de infecção (AGRIOS, 2005). O espessamento da cutícula em bagas de uva foi positivamente correlacionado com a suscetibilidade ao *Botrytis cinerea*. Ao microscópio eletrônico de transmissão observou-se maior espessura da cutícula em frutos jovens (30 dias após o florescimento) quando comparado a frutos maduros (COMMÉNIL; BRUNET; AUDRAN, 1997). Além da espessura da cutícula, Gabler et al. (2003) correlacionaram o número e a espessura das células epidérmicas com a suscetibilidade ao *Botrytis cinerea*.

A penetração do *peg* na cutícula e células epidérmicas, após 48 horas da inoculação, também foi verificado em frutos de abacateiro imaturos. A colonização inter e intracelular ocorreu somente após o amadurecimento (COATES et al., 1993; PRUSKY, PLUMBLEY & KOBILER, 1991).

Colletotrichum gloeosporioides inoculados em frutos de goiabeira com 10, 35 e 60 dias não formaram o *peg* de penetração, porém os apressórios permaneceram quiescentes aderidos à superfície dos frutos. Dessa forma, uma possível estratégia para

o controle da antracnose em pós-colheita seria a pulverização dos frutos jovens, já que os mesmos são ensacados com aproximadamente 65 dias após a queda das pétalas. Tal procedimento reduziria o inóculo inicial presente na superfície dos frutos e conseqüentemente, diminuiria a incidência da doença. Uma vez que o ensacamento dos frutos é importante para o controle de pragas, talvez os produtores pudessem utilizar sacos impregnados com produtos erradicantes com longa ação residual. Entretanto, essa forma de controle precisa ser estudada em cultivos comerciais para provar sua eficiência.

A penetração do patógeno apenas em frutos mais próximos à maturidade fisiológica, também pode ser correlacionada com a presença, em altas concentrações, de compostos antifúngicos em frutos jovens. No presente trabalho foi observado compostos fenólicos, evidenciado pelos corantes ACN e toluidina, os quais reduzem gradativamente com o aumento da idade dos frutos. Compostos fenólicos pré-formados inibiram o desenvolvimento de *Botrytis cinerea* em frutos verdes de morangueiro (7 dias após a antese). Esses compostos, não foram encontrados em frutos brancos e vermelhos (TERRY et al., 2004). Frutos de abacateiro imaturos foram resistentes ao *Colletotrichum gloeosporioides* devido a alta concentração de diene (1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosano-12,15-diene), o qual reduz com o amadurecimento (PRUSKY et al., 1982; PRUSKY; PLUMBLEY; KOBILER, 1991). O tanino presente em alta quantidade em frutos de goiabeira verde (SELVARAJ et al., 1999) pode estar envolvido na suscetibilidade de frutos maduros ao *C. gloeosporioides*. Em frutos verdes de bananeira, o tanino agiu na inativação das enzimas extracelulares produzidas por fungos patogênicos, reduzindo a infecção (GREEN; MORALES, 1967). O aumento das concentrações de açúcares, polifenóis e etileno com o amadurecimento de frutos de goiabeira e a redução dos constituintes da parede celular, como celulose, hemicelulose e lignina (BULK; BABIKER; TINAY, 1997; JAIN et al., 2001; JAIN et al., 2003; PRUSKY, 1996) também podem estar relacionados com a suscetibilidade dos frutos.

Diante dos resultados podemos concluir que na interação goiaba-*C. gloeosporioides* houve mecanismos físicos e químico que operaram simultaneamente ou sequenciados na fase de desenvolvimento do patógeno e na quiescência. Outros

mecanismos devem estar presentes, dessa forma mais investigações são necessárias para elucidar os mesmos.

3.3 Conclusões

A fase de pré-penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* foi influenciada pela temperatura e pelo período de molhamento. O intervalo entre 20 e 25 °C foi mais favorável a germinação de conídios, formação de apressórios e apressórios melanizados.

A idade do fruto não influenciou a pré-penetração de *C. gloeosporioides*. Por outro lado, diferenciou-se quanto à penetração. A penetração ocorreu apenas em frutos com 85 e 110 dias após a queda das pétalas. Essa diferença foi relacionada com a espessura da cutícula e quantidade de compostos fenólicos nos vacúolos da epiderme e parênquima.

Referências

AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: **Plant Pathology**. 5th ed. Burlington: Elsevier, 2005. chap. 6, p. 207-248.

AMARAL, C.S.; SALVAIA, A.; ANGELI, S.S; MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Incidência de patógenos pós-colheita em goiabas Kumagai. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 32, p. 57-58, 2006. Suplemento.

BARKAI-GOLAN, R. Factors affecting disease development. In: BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest disease of fruits and vegetables: development and control**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2001. chap 4, p.33-53.

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. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2001.

BINYAMINI, J.P.; SCHIFFMANN-NADEL, M. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 62, p. 592-594, 1972.

BROWN, G.E.; WILSON, W.C. Mode of entry of *Diplodia natalensis* and *Phomopsis citri* into Florida oranges. **Phytopathology**, Lancaster, v.58, p. 736-739, 1968.

BULK, R.E.; BABIKER, F.E.; TINAY, A.H. Changes in chemical composition of guava fruits during development and ripening. **Food Chemistry**, Whiteknights, v. 59, p. 395-399, 1997.

CHOUDHRY, M.M.; COSTA, T.S.da; ARAÚJO, J.L.P. Agronegócio da goiaba. In: CHOUDHRY, M.M. **Goiaba: pós-colheita**. Brasília: Embrapa, Frupex, 2001. 45p. (Frupex. Publicações técnicas, 19).

COATES, L.M.; MUIRHEAD, I.F.; IRWING, J.A.G.; GOWANLOCK, D.H. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 1363-1370, 1993.

COMMÉNIL, P.; BRUNET, L.; AUDRAN, J.C. The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 1599-1607, 1997.

DAS, M; MUKTA, D.; BORA, K.N. *Colletotrichum acutatum* a new fruit rotting pathogen of guava (*Psidium guajava* L.) in storage. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, cidade, v. 23, p. 331, 1993.

DINH, S.; CHONGWUNGSE, J.; PONGAM, P.; SANGCHOTE, S. Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 32, p. 533-538, 2003.

DODD, J.C.; ESTRADA, A.B.; MATCHAM, J.; JEFFRIES, P.; JEGER, M.J. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. **Plant Pathology**, London, v. 40, p. 568-575, 1991.

ECKERT, J.W. Postharvest diseases of fresh fruits and vegetables - etiology and control. HAARD, N.F. ;SALUNKHE, D.K. **Symposium: Postharvest biology and handling of fruits and vegetable**. Westport, Connecticut: The AVI publishing , 1975. chap 9, p. 81-117.

ESCANFERLA, M.E.; MORAES, S.R.G.; SALAROLI, R.B.; MASSOLA Jr. N.S. Pre-penetration stages of *Guignardia psidii* in guava: effect of temperature, wetness duration and fruit age. **Journal of Phytopathology**, Berlin, 2009. In press.

ESTRADA, A.B.; DODD, J.C.; JEFFRIES, P. Effect of humidity and temperature on conidial germination and apressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 608-618, 2000.

FEDER, N.; O,BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v. 55, p. 123-142, 1968.

FLAISHMAN, M.A.; HWANG, C.S.; KOLATTUKUDY, P.E. Involvement of protein phosphorylation in the induction of appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides* by its host surface wax and ethylene. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 47, p. 103-117, 1995.

FOURIE, J.F.; HOLZ, G. Initial infection processes by *Botrytis cinerea* on nectarine and plum fruit and the development of decay. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 82-87. 1995.

FOURIE, J.F.; HOLZ, G. Effects of fruit and pollen exudates on growth of *Botrytis cinerea* and infection of plum and nectarine fruit. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, p. 165-170, 1998.

FRANCISCO, V.L.F.S.; BAPTISTELLA, C.S.L.; AMARO, A.A. **A cultura da goiaba em São Paulo**. Março, 2005. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br> Acesso em: 27 out. 2008.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Goiaba. In:_____. **Agrianual 2008**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2008. p. 335-338.

GABLER, F.M.; SMILANICK, J.L.; MANSOUR, M.; RAMMING, D.W.; MACKEY, B.E. Correlations of morphological, anatomical and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 1263-1273, 2003.

GREENE, G.L.; MORALES, C. Tannins as the cause of latency in anthracnose infections of tropical fruits. **Turrialba**, Turrialba, v. 17, p. 447-449, 1967.

GOETZ, G.; FKYERAT, A.; METAIS, N.; KUNZ, M.; TABACCHI, R.; PEZET, R.; PONT, V. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. **Phytochemistry**, St. Louis, v. 52, p. 759-767, 1999.

GONGATTI NETO, A.; GARCIA, A.E.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.C; BLEINROTH, E.W.; MATALLO, M.; CHITARRA, M.I.F.; BORDIN, M.R. **Goiaba para exportação**: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: Embrapa, SPI, FrupeX, 1996. 35p. (FrupeX. Publicações Técnicas, 20).

GONZAGA, NETO; SOARES, J.M. **A cultura da goiaba**. Petrolina: Embrapa Semi-árido, 1995. 75p.

HAU, B.; KRANZ, J. Mathematics and statistic for analyses in epidemiology. In: KRANZ, J. (Ed.) **Epidemics of plant disease: mathematics analyses and modeling**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 12-52.

HEDGE, Y.; KOLATTUKUDY, P.E. Cuticular waxes relieve self-inhibition of germination and appressorium formation by the conidia of *Magnaporthe grisea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 75-84, 1997.

HUBER, L.; GILLESPIE, T.J. Modeling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 553-577, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS – IBRAF. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp Acesso em: 27 out. 2008.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA – IEA. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br> Acesso em: 27 out. 2008.

JAIN, N.; DHAWAN, K.; MALHOTRA, S.P.; SIDDIQUI, S.; SINGH, R. Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 23, p. 357-362, 2001.

JAIN, N.; DHAWAN, K.; MALHOTRA, S.P.; SINGH, R. Biochemistry of fruits ripening of guava (*Psidium guajava* L.): compositional and enzymatic changes. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 58, p. 309-315, 2003.

JARVIS, W.R. Latent infections in the pre- and postharvest environment. **HortScience**, St. Joseph, v. 29, p. 749-751, 1994.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M.J. & PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, London, v. 39, p. 343-366, 1990.

KADER, A.A. Fruit maturity, ripening and quality relationships. PLOCHARSKI, W. In: **International symposium on effect of preharvest and postharvest factors on storage of fruit**. Poland: ISHS, Acta Horticulturae, 1999. p. 203-208.

KOLATTUKUDY, P.E.; LINDA, M.R.; DAOXIN, L.; CHENG-SHINE, H.; MOSHE, A.F. Surface signaling in pathogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, Washington, v. 92, p. 4080-4087, 1995.

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

LI, B.; ZHAO, H.; LI, B.; XU, X.M. Effects of temperature, relative humidity and duration of wetness period on germination and infection by conidia of the pear scab pathogen (*Venturia nashicola*). **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 547-552, 2003.

LI, B.H.; XU, X.M.; LI, J.T.; LI, B.D. Effects of temperature and continuous and interrupted wetness on the infection of pear leaves by conidia of *Venturia nashicola*. **Plant Pathology**, London, v. 53, p. 357-363, 2005.

LIM, T.K.; MANICOM, B.Q. Diseases of Guava. In: PLOETZ, R.C. **Diseases of Tropical Fruit Crops**. University of Florida. p. 275 -289. 2003.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D.; SCHABENBERGER, O. **Sas for Mixed Models**. Ed. 2nd SAS Institute Inc., 2006. v. 813 p.

LI, Y.C.; AN, L.Z.; GE, Y.H.; LI, Y., BI, Y. Detection and isolation of preformed antifungal compounds from the peel of *Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Pingguoli at different stages of maturity. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, p. 115-119, 2008.

MANICA, I. Importância econômica. In: MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, I.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. **Fruticultura tropical 6. Goiaba**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000. p. 9-22.

MARTINS, M.C.; AMORIN, L.; LOURENÇO, S.F.; GUTIERREZ, A.S.D.; WATANABE, H.S. Incidência de danos pós-colheita em goiabas no mercado atacadista de São Paulo e sua relação com a prática de ensacamento dos frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, p. 245-248, 2007.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 98, p. 137-144, 1992.

MÔRO, F.V.; NATALE, W.; DAMIÃO FILHO, C.F.; PRADO, R.M. Morfologia de frutos de goiabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452003000100010&script=sci_arttext
Acesso em: 26 jan. 2009.

MUIRHEAD, I.F.; DEVERALL, B.J. Role of apleria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. **Physiological Plant Pathology**, Berlin, v. 19, p. 77-&, 1981.

MUNDY, D.C.; BERESFORD, R.M. Susceptibility of grapes to *Botrytis cinerea* in relation to berry nitrogen and sugar concentration. **New Zealand Plant Protection**, Hastings, New Zealand, v. 60, p. 123-127, 2007.

NARAYANASAMY, P. **Postharvest pathogens and disease management**. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, John Wiley, 2006. 578p.

NEUMÜLLER, M. **Die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume (*Prunus domestica* L.) gegenüber dem Scharkavirus (*Plum pox virus*)**. 2005. 153 p.

Dissertation (Doktors der agrarwissenschaften) - Universität Hohenheim, Stuttgart, 2005.

NDUBIZU, T.O.C. Relations of phenolic inhibitors to resistance of immature apple fruits to rot. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 51, p. 311-319, 1976.

OBANOR, F.O.; WALTER, M.; JONES, E.E.; JASPERS, M.V. Effect of temperature, relative humidity, leaf wetness and leaf age on *Spilocaea oleagina* conidium germination on olive leaves. **European Journal of Plant Pathology**, Lincoln, v. 120, p. 211-222, 2008.

OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIGGS, A.R. Brow rot. In: OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIRD, G.W.; RITCHIE, D.F.; URIU, K.; UYEMOTO, J.K. (Ed.). **Compendium of stone fruit diseases**. Saint Paul: APS, 1995. p. 7-10.

PANDEY, R.R.; ARORA, D.K.; DUBEY, R.C. Effect of environmental conditions and inoculum density on infection of guava fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 137, p. 165-172, 1997.

PEREIRA, F.M.; MARTINEZ Jr, M. **Goiabas para industrialização**. Jaboticabal: Editora Legis Summa, 1986. 142p.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L.de. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 128-134, 2002.

PERFECT, S.E., HUGHES, H.B., O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum* - A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, p. 186-198, 1999.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M. Doenças da goiabeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 4. ed., São Paulo: Editora Ceres, 2005. v. 2, cap. 44, p. 401-409.

PODILA, G.K.; DICKMAN, M.B.; KOLATTUKUDY, P.E. Transcriptional activation of a cutinase gene in isolated fungal nuclei by plant cutin monomers. **Science**, Washington, v. 242, p. 922-925, 1988.

PODILA, G.K.; ROGERS, L.M.; KOLATTUKUDY, P.E. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 267-272, 1993.

PODILA, G.K.; ROSEN, E.; SAN FRANCISCO, M.J.D.; KOLATTUKUDY, P.E. Targeted secretion of cutinase in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 238-242, 1995.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 413-434, 1996.

PRUSKY, D.; ASCARELLI, A.; JACOBY, B. Lack of involvement of nutrients in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 110, p. 106-109, 1984.

PRUSKY, D.; KEEN, N.T. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, p. 114-118, 1993.

PRUSKY, D.; KENN, N.T.; SIMS, J.J.; MIDLAND, S. Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 1578-1582, 1982.

PRUSKY, D.; KOBILER, I.; FISHMAN, Y.; SIMS, J.J.; MIDLAND, S.L.; KEEN, N.T. Identification of an antifungal compound in unripe avocado fruits and its possible involvement in the quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 132, p. 319-327, 2008.

PRUSKY, D.; LICHTER, A. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, p. 1-8, 2007.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R.A. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 289-307.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R.A.; KOBILER, I. The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, London, v. 40, p. 45-52, 1991.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-213, 1963.

SELVARAJ, Y.; PAL, D.K.; EDWARD RAJA, M.; RAWAL, R.D. Changes in chemical composition of guava fruits during growth and development. **Indian Journal of Horticulture**, Lucknow, v. 56, p. 10-18, 1999.

SINGH, R.S. **Diseases of fruit crops**. Enfield: Science Publishers, 2000. 310p.

SITTERLY, W.R.; SHAY, J.R. Physiological factors affecting the onset of susceptibility of apple fruit to rotting by fungus pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v. 50, p. 91-93, 1960.

- SOARES, A.R. **Infecção e colonização de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento**. 2008. 85p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008.
- SOARES, A.R.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e período de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 265-272, 2008.
- SWINBURNE, T.R. Quiescent infections in post-harvest diseases. In: DENNIS, C. (Ed.). **Post-harvest pathology of fruits and vegetables**. London: Academic Press, 1983. p.1-21.
- SWINBURNE, T.R.; BROWN, A.E. Appressoria development and quiescent infections of banana fruit by *Colletotrichum musae*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 80, p. 176-178, 1983.
- TANAKA, M.A.S.; PASSOS, F.A.; ITO, M.F. Influência da cultivar e do estágio fenológico do fruto de morangueiro sobre o desenvolvimento de lesões causadas por *Colletotrichum* spp. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 20, p. 160-163, 1994.
- TERRY, L.A.; JOYCE, D.C.; ADIKARAM, N.K.B.; KHAMBAY, B.P.S. Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 31, p. 201-212, 2004.
- VERHOEFF, K. Latent infections by fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 99-110, 1974.
- VILLALTRA, O.N.; WASHINGTON, W.S.; RIMMINGTON, G.M.; TAYLOR, P.A. Effects of temperature and leaf wetness duration on infection of pear leaves by *Venturia pirina*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 51, p. 97-106, 2000.
- XU, X.M.; ROBINSON, J. Modelling the effects of wetness duration and fruit maturity on infection of apple fruits of Cox's Orange Pippin and two clones of Gala by *Venturia inaequalis*. **Plant Pathology**, London, v. 54, p. 347-356, 2005.
- WALLACE, J.; KUC, J; WILLIAMS, E.B. Production of extracellular enzymes by 4 pathogens of apple fruit. **Phytopathology**, Lancaster, v. 52, p. 1004-1008, 1962.
- WATADA, A.E.; HERNER, R.C.; KADER, R.J.; ROMANI, R.J.; STABY, G.L. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. **HortScience**, St. Joseph, v. 19, p. 20-21, 1984.
- WILSON, L.L.; MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 80, p. 111-116, 1990.

4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA DURAÇÃO DO PERÍODO DE MOLHAMENTO NA PRÉ-PENETRAÇÃO DE *Colletotrichum acutatum* EM FOLHAS DE CITROS

Resumo

Colletotrichum acutatum é o agente causal de duas doenças dos citros, a podridão floral dos citros (PFC) e a antracnose do limoeiro galego (KLA). O objetivo do trabalho foi determinar as condições ambientais favoráveis à pré-penetração dos isolados FSH-CLB-2 e KLA-MGG-1 de *C. acutatum*, obtidos de pétalas de laranja e limoeiro, respectivamente. Em placas de poliestireno, a germinação e a formação de apressórios foram determinadas sob temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C e períodos de molhamento de 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Nos ensaios *in vivo*, folhas jovens de laranja doce e limão galego foram inoculadas com suspensões de conídios de dois isolados e incubadas em câmara de crescimento a 15, 20, 25 e 30°C e períodos de molhamento de 12, 24 e 48 horas. Folhas de laranja, 24 horas após a inoculação foram tratadas com água destilada, água de lavagem de pétalas ou extrato de pétalas e posteriormente incubadas por mais 24 horas, visando promover a germinação dos apressórios formados. Para isolado KLA-MGG-1, as temperaturas ótimas *in vitro* para germinação de conídios e formação de apressórios foram 23,9 e 23,5 °C (42% de conídios germinados e 36% de apressórios formados), respectivamente. Em folhas de laranja as temperaturas ótimas foram 24,1 e 21,2 °C (40% de conídios germinados e 28% de apressórios formados), respectivamente, e em folhas de limoeiro foram 18,1 e 16,2 °C (65% de conídios germinados e 47% de apressórios formados), respectivamente. Para isolado FSH-CLB-2, a temperatura ótima *in vitro* para germinação e formação de apressórios foi 21,6 °C (10% de conídios germinados e 10% de apressórios formados), enquanto em folhas de laranja foram 24 e 23 °C (27% de conídios germinados e 18% de apressórios formados), respectivamente, e em folhas de limoeiro foram 24,4 e 23,7 °C (54% de conídios germinados e 47% de apressórios formados). Nos ensaios *in vitro*, houve aumento progressivo das variáveis estudadas com a elevação do período de molhamento, enquanto em folhas de citros, esse aumento foi menor devido a grande quantidade de conídios secundários formados, os quais elevaram o número total de conídios na folha. A água de lavagem de pétalas e extrato de pétalas estimularam o crescimento vegetativo, o desenvolvimento de conídios secundários e a formação de apressórios ao longo da hifa.

Palavras-chave: Podridão floral dos citros; Antracnose do limoeiro galego; Citros

INFLUENCE OF TEMPERATURE AND WETNESS DURATION ON THE PRE-PENETRATION OF *Colletotrichum acutatum* ON CITRUS LEAVES

Abstract

Colletotrichum acutatum is the causal agent of two citrus diseases, postbloom fruit drop (PFC) and key lime anthracnose (KLA). The objective of this study was to determine the favorable environmental conditions for pre-penetration of isolates FSH-CLB-2 and KLA-MGG-1 of *C. acutatum*, obtained from petals of sweet orange and key lime trees, respectively. On polystyrene dishes, the germination and appressorial production were determined at 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C, with wetness periods of 6, 12, 24, 36 and 48 h. In *in vivo* experiments, young leaves of sweet orange key lime trees were inoculated with conidial suspensions of two isolates and incubated in greenhouse at 15, 20, 25 and 30 °C with wetness periods of 6, 12, 24, 36 and 48 h. Orange tree leaves, 24 hours after inoculation, were treated with distilled water, water from petals washing or petals extract and later incubated for more 24 h, aiming to promote the germination of the appressoria. For the isolate KLA-MGG-1, the optimum temperatures *in vitro* for conidial germination and appressoria formation were 23.9 and 23.5 °C (42% of conidial germination and 36% of appressoria formation), respectively. For orange trees leaves, the optimal temperatures were 24.1 and 21.2 °C (40% of conidial germination and 28% of appressoria formation). For key lime leaves, they were 18.1 and 16.2 °C (65% of conidial germination and 47% of appressoria formation). For the isolate FSH-CLB-2, the optimal temperature *in vitro* for germination and appressoria formation were 21.6 °C (10% of conidial germination and 10% of appressoria formation). For orange leaves, they were 24 and 23 °C (27% conidial germination and 18% of appressoria formation) and for key lime leaves, they were 24.4 and 23.7 °C (54% conidial germination and 47% of appressoria formation). *In vitro* there was a progressive increase of the variable studied following periods of continuous wetness, while on citrus leaves this increase was restricted due to the large amount of secondary conidiation, which elevated the total number of conidia on the leaf. Water from petals washing and petals extract stimulated the vegetative growth, the development of secondary conidiation and appressoria formation along the hypha.

Keywords: Postbloom fruit drop; Key lime anthracnose; Temperature; Wetness period

4.1 Introdução

Colletotrichum spp. causa três diferentes doenças em citros: podridão floral dos citros (PFC), antracnose do limoeiro galego (KLA) e antracnose pós-colheita (TIMMER; BROWN, 2000). A podridão floral e antracnose do limoeiro são causadas por *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds e a antracnose pós-colheita é causada por *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc.

Inicialmente, o agente causal das três doenças foi descrito como *Colletotrichum gloeosporioides* (FAGAN, 1979). Porém, em estudos comparativos de isolados, foi observada a existência de raças patogênicas e não patogênicas nas inflorescências e frutos afetados, sendo que estas raças apresentavam características diferentes quanto à morfologia, coloração das colônias, crescimento micelial e patogenicidade (ROSSETTI et al., 1981). Diante disso, alguns pesquisadores resolveram investigar o agente causal em maiores detalhes. Foram identificadas três estirpes de *C. gloeosporioides* comumente encontradas em citros, as quais podem ser diferenciadas em relação a morfologia e patogenicidade: (i) FGG (fast-growing gray): possui desenvolvimento rápido em meio de cultura, forma colônia de coloração acinzentada, sobrevive em tecidos mortos ou na forma de infecção latente, incapaz de causar podridão floral; (ii) SGO (slow-growing orange): o crescimento é lento em meio de cultura, forma colônia de coloração branca com presença de massa conidial de coloração alaranjada, causa a podridão floral em laranjeiras; (iii) KLA (Key lime anthracnose): as características morfológicas são semelhantes à estirpe SGO, porém causa a antracnose do limoeiro galego, produzindo manchas necróticas em folhas, ramos novos e em frutos (AGOSTINI; TIMMER, 1994).

Por meio de estudos moleculares, foi confirmado a presença de espécies distintas. Primeiramente, Brown; Spreenivasaprasad e Timmer (1996), através de PCR (reação de polimerase em cadeia) com “primer” específico e sequenciamento de nucleotídeos da região ITS1 do rDNA, reclassificaram os isolados de SGO e KLA como *C. acutatum* e o isolados de FGG como *C. gloeosporioides*. Posteriormente, em 2008 foi verificado que as estirpes de *C. acutatum* são distintas biologicamente e filogeneticamente (PERES et al., 2008), porém idênticas morfologicamente.

A podridão floral causa doença em flores de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e outros citros, provocando sintoma de necrose na pétala, queda de fruto e formação de cálice persistente. A antracnose do limoeiro galego causa doença nas folhas, ramos, flores e frutos de limoeiro galego [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle]. Os sintomas caracterizam-se por lesões necróticas e queima do tecido jovem (PERES et al., 2008; TIMMER; BROWN, 2000).

Colletotrichum acutatum sobrevive entre as floradas dos citros na superfície das folhas, na forma de apressório quiescente (TIMMER; BROWN, 2000; ZULIFQAR; BRANSKY; TIMMER, 1996). O apressório é estimulado a germinar, por meio de água de lavagem das flores, formando novos conídios, os quais servem de inóculo para a infecção das flores. Dessa forma, a severidade da doença é altamente correlacionada com a quantidade e intensidade de chuva (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). Em algumas localidades, as perdas causadas pela PFC, podem chegar a 100% quando o período chuvoso ocorre durante o florescimento (TIMMER et al., 1994).

As condições ambientais favoráveis a germinação e formação de apressórios não foram determinadas para os diferentes isolados de *C. acutatum*, em citros, sob condições controladas. Apenas a germinação de conídios foi avaliada sob diferentes temperaturas (FAGAN, 1979) e períodos de molhamento (DENHAM; WALLER, 1981) isoladamente. A temperatura favorável à germinação do conídio ocorre no intervalo de 22 a 23 °C e período de molhamento contínuo de 12 a 14 horas. Em morango, os requerimentos ambientais favoráveis são diferentes de acordo com o evento de pré-penetração. Germinação dos conídios de *C. acutatum* foi favorecida entre 23 e 27,7 °C e o apressório foi entre 17,6 e 26,5 °C (LEANDRO et al., 2003).

O objetivo do trabalho foi identificar as condições ambientais favoráveis (combinação de diferentes temperaturas e períodos de molhamento contínuo) à germinação e formação de apressório de dois isolados de *Colletotrichum acutatum* por meio de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, em folhas jovens de laranja doce e limão galego.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Revisão bibliográfica

4.2.1.1 Citricultura

Com mais de 850 mil hectares de plantas cítricas em seu território, o Brasil é o maior produtor mundial, seguido por Estados Unidos, México, Índia e Espanha (ABECITRUS, 2008; FAO, 2008). Em 2007, o Brasil produziu mais de 18 milhões de toneladas de laranja (FNP, 2008). A maior parte da produção brasileira concentra-se no Estado de São Paulo, responsável por 70% da área de laranja plantada no Brasil, 80% da produção nacional e 98% do suco de laranja exportado. Movimenta mais de 5 bilhões de dólares, sendo considerada uma das principais atividades em 348 municípios paulistas, gerando cerca de 400.000 empregos diretos, com mais de 3 mil frentes de trabalho simultâneas na fase de colheita (NEVES, 2008).

A concentração dos pomares está na região denominada “cinturão citrícola paulista”, a qual é dividida em quatro regiões produtoras: norte, nordeste, sudoeste e sudeste. As regiões norte e nordeste são as mais produtivas com 60% da produção e 70% da área plantada do cinturão citrícola. No entanto, nos últimos anos a citricultura paulista vêm migrando dessas regiões para a região sudoeste. Entre 2001 e 2005, a região sudoeste apresentou aumento, tanto na área plantada quanto na produção, com crescimento de 19% e 59%, respectivamente (NEVES et al., 2007).

Essa migração resulta em alterações macro-ambientais, que poderão afetar o estabelecimento de patógenos que antes ocorriam esporadicamente. O clima da região sudoeste do Estado é favorável ao fungo *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral do citros (PFC) e da antracnose do limoeiro galego (KLA - “Key lime antracnose”), devido ao baixo déficit hídrico (TIMMER; BROWN, 2000).

4.2.1.2 Podridão Floral dos Citros

A Podridão Floral dos Citros (PFC), também conhecida por “Queda Prematura de Frutos Jovens” ou “estrelinha” é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, isolado SGO (slow-growing orange). A doença foi relatada pela primeira vez

por Fagan (1979), em Belize, porém o sintoma característico tem sido observado desde 1950 nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas. No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez no Rio Grande do Sul, na década de 70 (PORTO et al., 1979), sendo em seguida observada nos pomares do Estado de São Paulo, causando sérios prejuízos na safra 77/78 e 90/91, devido a ocorrência, de condições de prolongada pluviosidade coincidindo com o período de floração das plantas (DENHAM, 1979; FEICHTENBERGER, 1991). Na Flórida, foi constatada primeiramente em limão 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka) em 1983, e subsequentemente em laranja doce [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e outros citros. Em 1988, foi amplamente dispersa no Estado, causando prejuízos significativos na produção (SONODA; HEBB, 1991; McMILLAN; TIMMER, 1989).

Praticamente, todas as variedades de laranja doce são afetadas pela doença. No Brasil, a laranja 'Pera' e a 'Natal' são as mais afetadas (FEICHTENBERG, 1991; TIMMER; BROWN, 2000). Na Flórida, as perdas são maiores em laranja 'Bahia' e limão 'Tahiti' e, em menor escala na laranja 'Valência' (McMILLAN; TIMMER; McGOVERN, 1994). A suscetibilidade dessas variedades está relacionada com a presença de vários surtos de florescimento que contribuem para o aumento do inóculo.

Sabe-se que a temperatura e o período de molhamento (umidade relativa do ar, orvalho e chuva) afetam o processo de infecção de *Colletotrichum* spp.. Em folhas de morango, a temperatura favorável ao *C. acutatum* depende da fase de pré-penetração (LEANDRO et al., 2003). Sob molhamento contínuo, a temperatura favorável à germinação do conídio foi entre 23,0 e 27,7 °C, enquanto que para o desenvolvimento do apressório foi entre 17,6 e 26,5 °C e para a produção de conídios secundários foi entre 21,3 e 32,7 °C. Para *C. lagenarium* a temperatura favorável para a germinação do conídio foi de 20 a 32 °C e para a formação do apressório foi de 20 a 26 °C (ISHIDA; AKAI, 1969). Estudos mais recentes, realizados com *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, causadores da antracnose em goiaba, demonstraram que o intervalo de temperatura e de molhamento favorável a germinação e formação de apressório foi de 20 a 25 °C, para ambos (SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008).

Por sua vez, isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de frutos de manga de uma mesma área geográfica, exibem variação do efeito da temperatura no

desenvolvimento de estruturas de infecção. A temperatura ótima para a germinação, formação de apressório e emissão do *peg* de penetração foi diferente para os isolados testados. O isolado I-2 formou as estruturas de infecção mais rapidamente a 25 °C enquanto, o isolado I-4 formou a 20 °C. Com relação a umidade, a germinação dos conídios de ambos os isolados ocorreram somente a 97,5 e 100% de umidade relativa (ESTRADA; DODD; JEFFRIES, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com duas subpopulações clonais de *C. acutatum* de amendoeira. A temperatura ótima para o crescimento de ambas foi de 25 °C, porém uma das subpopulações conseguiu crescer com rapidez em temperaturas mais amenas (10-15 °C), enquanto a outra foi inibida nessa condição, mas cresceu rapidamente a 32 °C (FOSTER; ADASKAVEG, 1999).

O sintoma da podridão floral caracteriza-se pela presença de lesões necróticas de coloração róseo-alaranjada nas pétalas e subseqüentemente, amarelecimento dos frutos recém formados e posterior queda, deixando os cálices e os pedúnculos retidos nos ramos, formando estruturas que recebem o nome de “estrelinhas”. Essas estruturas são típicas da doença e podem permanecer fixadas aos ramos por até 18 meses. Ramos que permanecem com essas estruturas (cálices e pedúnculo) aderidas, no ano seguinte não florescem e respondem como se estivessem suportando frutos. As folhas ao redor da inflorescência doente são frequentemente pequenas, deformadas, com nervuras grossas e dão aos ramos aparência de roseta (FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER, et al., 1994).

O agente causal da PFC sobrevive na superfície de folhas, ramos ou nos cálices persistentes resultantes da florada anterior na forma de apressório quiescente. Após o surgimento das primeiras flores com a chegada da primavera, esses apressórios germinam em função do aumento do período molhamento e de substâncias presentes nas pétalas, dando origem aos conídios. Os conídios são dispersos atingindo as novas flores, que serão infectadas em 12 a 18 horas. A penetração ocorre diretamente na pétala, sem a formação do apressório, reiniciando o ciclo (AGOSTINI; TIMMER, 1994; TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996). Em morango, *C. acutatum* foi introduzido no campo por meio de material propagativo infectado. O patógeno sobreviveu em folhas assintomáticas de morango, na forma de apressório e conídio secundário até o

aparecimento dos frutos (LEANDRO et al., 2001; LEANDRO et al., 2003). Estudos realizados com *C. acutatum*, agente causal de antracnose em amêndoa, concluíram que a fonte de inóculo para o ano seguinte vem dos frutos infectados e mumificados que permaneceram dormentes nas árvores após a colheita (ADASKAVEG; FÖRSTER, 2000). Em blueberry, *C. acutatum* sobreviveu nos botões florais, ramos e pedúnculos remanescentes (VERMA; MacDONALD; PUNJA, 2006).

4.2.1.3 Antracnose do limoeiro galego

A antracnose do limoeiro galego é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, porém esse fungo foi originalmente descrito como *Gloeosporium limetticola* R. E. Clausen (CLAUSEN, 1912). Os sintomas da doença são idênticos aos observados nas flores e botões da PFC, no entanto, em limoeiro galego o patógeno afeta também as folhas jovens, brotos e frutos (TIMMER; BROWN, 2000). As folhas e brotos apresentam-se queimadas, secas e caem. Em condições ambientais pouco favoráveis ou tecidos vegetais maduros, ocorre o desenvolvimento de lesão necrótica de tamanho variável. Nos frutos, as lesões são grandes e deprimidas, causando sua deformação (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000).

A antracnose do limoeiro galego foi pouco estudada, porém presume-se que suas características são similares a PFC. A única diferença descrita, até o momento, é a maior disponibilidade de inóculo entre as estações devido à reprodução do patógeno em todos os tecidos vegetais dos citros afetados (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000).

4.2.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Plantas do Centro de Pesquisa e Educação da Costa do Golfo/Universidade da Flórida, município de Wimauma, Flórida, Estados Unidos.

4.2.2.1 Obtenção dos isolados e preparo da suspensão fúngica

Foram utilizados dois isolados de *Colletotrichum acutatum* coletados de flores de laranja doce (FSH-CLB-2) e limão galego (KLA-MGG-1) no Estado de São Paulo. Esses isolados foram previamente estudados por Peres et al. (2008).

Os isolados, inicialmente mantidos em papel de filtro, com sílica gel a -80 °C foram colocados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubados a 23 °C sob luz contínua. Após esporulação, o fungo foi repicado para BDA, permanecendo por cinco dias nas mesmas condições. Após esse período, as suspensões de conídios foram preparadas e ajustadas para 10⁵ conídios/mL de água destilada, com o auxílio da câmara de Neubauer.

4.2.2.2 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na pré-penetração de *C. acutatum* in vitro

Gotas contendo 45 µL das suspensões de conídios foram depositadas em placas de poliestireno, para avaliação da germinação e formação de apressórios. As placas foram colocadas em bandejas plásticas, previamente desinfestadas com álcool 70%, contendo papel de filtro umedecido com água destilada para a obtenção de ambiente saturado de umidade. Posteriormente, as bandejas foram acondicionadas em câmaras de crescimento (BOD) com temperaturas ajustadas para 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C e duração do período de molhamento (DPM) de 6, 12, 24, 36 e 48 horas, sob luz contínua. Decorrido os tempos, foram adicionados 10 µL de lactoglicerol sobre as gotas com o objetivo de interromper o processo de germinação e corar as estruturas fúngicas.

A determinação da porcentagem de conídios germinados e apressórios formados foram feitas em microscópio de luz Olympus modelo CX21, com o aumento de 400 vezes. Foram contados 100 conídios por repetição. As imagens foram obtidas por câmera digital acoplada ao microscópio. Os conídios foram considerados germinados quando o tubo germinativo excedeu a metade do diâmetro do conídio ou com a formação do apressório séssil.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial, com dois fatores (temperatura e período de molhamento) e com seis repetições para cada tratamento. O experimento foi repetido uma vez.

Os dados obtidos foram analisados por meio de regressões não-lineares, utilizando-se o programa STATISTICA versão 6.0. (Stat Soft, EUA). O modelo beta-monomolecular (HAU; KRANZ, 1990), descrito pela equação

$$Y=[B1*((T-B2)^{B3})*((B4-T)^{B5})]*[B6*(1-B7*\exp(-B8*M))]$$

foi ajustado aos dados, em que Y corresponde a germinação de conídios (%) ou formação de apressórios (%), T corresponde à temperatura (°C), M corresponde ao período de molhamento (horas), B2 e B4 representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima, B5 representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica, B8 está relacionado à velocidade de aumento da variável dependente em função do molhamento e B1, B3, B6 e B7 são parâmetros da equação, sem significado biológico.

4.2.2.3 Efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na pré-penetração de *C. acutatum* in vivo

Folhas jovens de laranja doce e limão galego foram coletadas, desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,5% por 30 segundos e, em seguida, lavadas em água destilada por três vezes, secas, colocadas em suporte plástico e acondicionadas em bandejas plásticas transparente previamente desinfestadas com álcool 70%. Em cada bandeja foram colocadas duas folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada. Posteriormente, suspensões de conídios dos isolados FSH-CLB-2 e KLA-MGG-1 foram depositadas na superfície das folhas. A suspensão foi colocada em círculos de 0,5 cm de diâmetro, previamente demarcados, com o auxílio de adesivos, para facilitar a localização das estruturas durante os estudos com microscopia de luz. No centro de cada círculo foi colocado 45 µL de suspensão com conídios, e posteriormente as bandejas foram acondicionadas em câmara de crescimento nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e períodos contínuos de molhamento de 12, 24 e 48 horas, sob luz contínua.

Após os períodos estabelecidos, película de esmalte transparente foi colocado sobre a área do tecido vegetal inoculada. Após uma hora, a película foi cuidadosamente

retirada e colocada sobre lâmina de vidro contendo cinco μL de lactoglicerol, e subsequentemente visualizada ao microscópio (AGOSTINI; TIMMER, 1994).

Foram quantificadas as porcentagens de conídios germinados e formação de apressórios. Amostraram-se aleatoriamente 100 conídios em cada repetição. Os experimentos foram realizados duas vezes, com cinco repetições para cada tratamento.

A análise dos dados coletados *in vivo* foi feita de maneira diferente, pois o número de temperaturas testadas, assim como os períodos de molhamento foram menores do que no experimento *in vitro*. Dessa forma, não foi possível ajustar uma superfície de resposta utilizando o modelo beta-monomolecular, que possui oito parâmetros. Assim, os dados coletados *in vivo* foram analisados por meio de regressões não-lineares, utilizando-se o procedimento LOGISTIC do programa SAS para o seguinte modelo:

$$Y = \frac{\exp(\beta)}{1 + \exp(\beta)} * 100$$

em que, Y corresponde à taxa de germinação de conídios ou formação de apressórios e o β é o preditor linear que corresponde à combinação dos parâmetros T (temperatura), M (molhamento) e P (parâmetros da equação) que, em todos os casos, foram representados da seguinte forma: $(P1 * M + P2 * M^2 + P3 * T + P4 * T^2)$.

4.2.2.4 Efeito de substâncias presentes na pétala na pré-penetração de *C. acutatum* *in vivo*

Folhas jovens de laranja doce foram inoculadas com suspensão de conídios (FSH-CLB-2) de maneira idêntica à descrita anteriormente, e em seguida acondicionadas em câmara de crescimento a 20 °C por 24 horas. Após esse período, sobre a área inoculada, foram adicionados 45 μL de água destilada (controle), água de lavagem das pétalas de citros (dez partes de água:uma parte de pétala) ou extrato de pétalas de citros (três partes de água:uma de pétala) para induzir a germinação dos apressórios (ZULFIQAR et al., 1996) e em seguida, acondicionadas em câmara úmida por mais 24 horas a 20 °C. Para obtenção da água de lavagem, as pétalas foram colocadas em recipiente com água destilada e agitadas por 5 minutos. O extrato de

pétalas foi obtido por meio de maceração das pétalas em água destilada e, em seguida centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro, com o auxílio de bomba a vácuo (AGOSTINI; TIMMER, 1994).

Decorrido o tempo, película de esmalte transparente foi colocado sobre a área do tecido inoculado, procedendo-se como mencionado anteriormente para visualização das estruturas.

4.2.3 Resultados

Conídio germinado e não germinado, conídio secundário, fiálide, tubo germinativo e apressório foram observados em placas de poliestireno e em folhas jovens de citros (Figura 1). Os conídios secundários originaram-se de outros conídios (Figura 1B, D e F) ou de fiálides presentes ao longo da hifa (Figura 1E, G e H). Devido a adesão de poucos conídios secundários às fiálides ou aos conídios primários, não foi possível identificá-los e nem mesmo quantificá-los. Dessa forma, conídios secundários foram os responsáveis pelo aumento do número total de conídios ao longo das avaliações, com maior evidência nos estudos realizados nas folhas, principalmente após 24 horas de molhamento.

Os isolados FSH-CLB-2 e KLA-MGG-1 de *C. acutatum* não apresentaram diferenças morfológicas e estruturais tanto *in vitro* como *in vivo*.

A partir da hifa foi observado a formação de apressórios (Figura 1J), principalmente em folhas tratadas com água de lavagem de pétalas e extrato de pétalas, 24 horas após a inoculação (Figura 1K e L). O tratamento das folhas com água de lavagem ou extrato das pétalas também estimulou o crescimento vegetativo e o desenvolvimento de conídios secundários, quando comparado ao controle (Figura 1J-L).

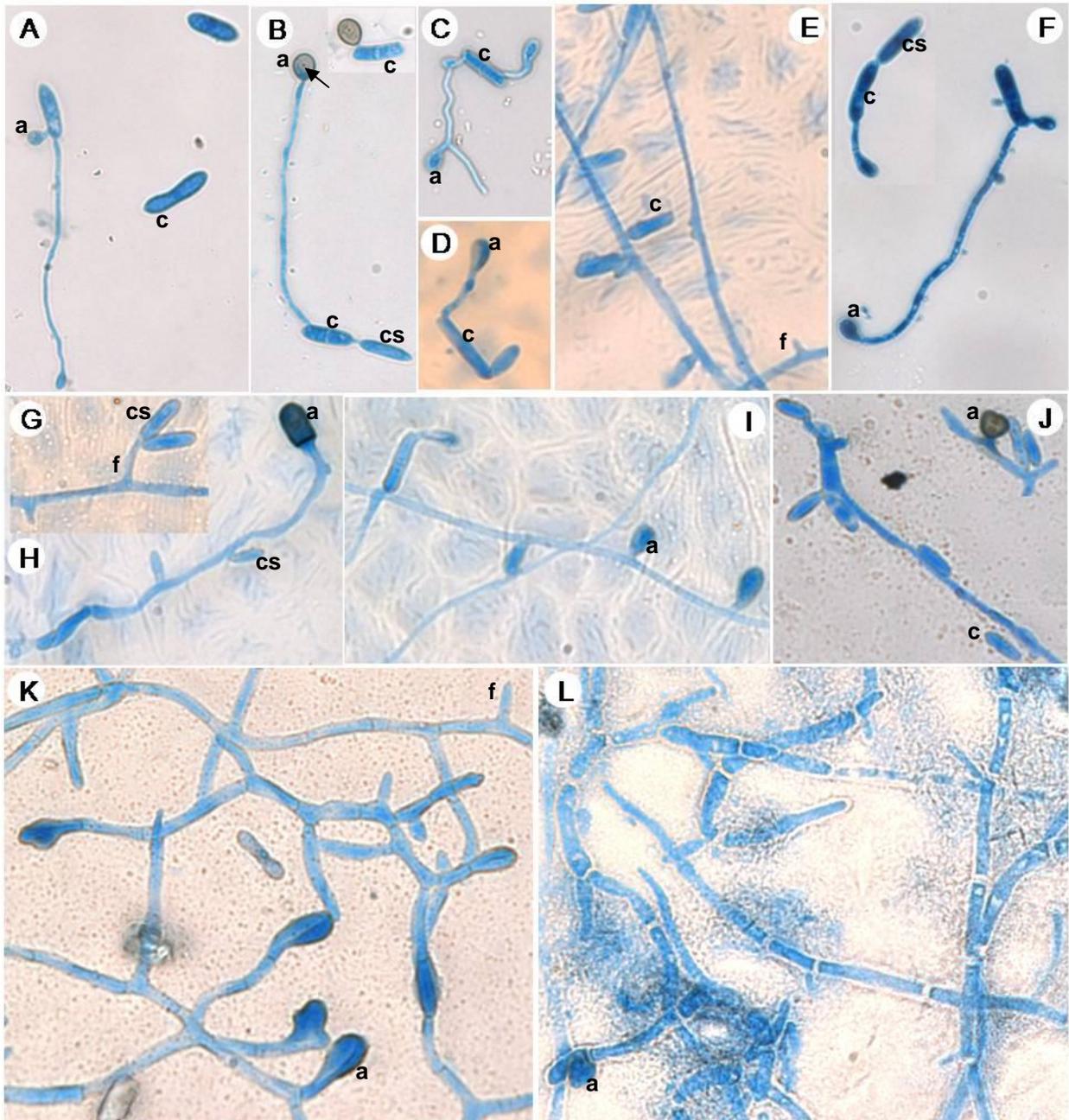


Figura 1 - Aspectos estruturas de *C. acutatum*, isolado FSH-CLB-2 e KLA-MGG-1, em placas de poliestireno e em folhas de citros jovens. **A.** Conídios germinados e não germinados do isolado FSH-CLB-2 em placas de poliestireno; **B.** Conídio secundário, tubo germinativo longo e curto, apressório melanizado e o poro de penetração (seta) formado em placas de poliestireno; **C.** Ramificação do tubo germinativo e formação de apressórios; **D.** Conídio secundário e apressório em folhas de citros jovens; **E.** Fiáldes e conídios secundário presente ao longo da hifa; **F.** Conídios germinados, conídio secundário e apressório do isolado KLA-MGG-1, *in vitro*; **G.** Hifa, fiálide e conídios secundários, em folhas de citros; **H.** Conídios secundários e apressório melanizado em folhas de citros; **I.** Conídio secundário e apressório ao longo da hifa; **J.** Conídios secundários e apressório melanizado em folhas tratadas com água 24 horas após a inoculação; **K.** Fiáldes e apressórios em folhas tratadas com a água das pétalas; **L.** Fiáldes e apressórios em folhas tratadas com extrato das pétalas. a = apressório; c = conídio; cs = conídio secundário; f = fiálide

O modelo beta-monomolecular se ajustou aos dados de pré-penetração de *C. acutatum in vitro* em relação a temperatura e período de molhamento. A superfície de resposta para estimar a germinação de conídios para o isolado FSH-CLB-2 (Figura 2A) foi obtida através da função,

$$Y=[0,001*((T-4,999)^{3,5})*((35-T)^{2,83})*[0,003*(1-0,988*\exp(-0,002*M))]]$$

O isolado KLA-MGG-1 (Figura 3A) foi descrito pela função,

$$Y=[0,004*((T-4,843)^{2,26})*((35,352-T)^{1,35})*[0,458*(1-1,234*\exp(-0,047*M))]]$$

O comportamento da formação de apressórios, para o isolado FSH-CLB-2 (Figura 2B) obedeceu a função,

$$Y=[2,067*((T-4,999)^{3,19})*((35,002-T)^{2,62})*[0,0004*(1-0,999*\exp(-0,00003*M))]]$$

O isolado KLA-MGG-1 (Figura 3B) foi descrito pela função,

$$Y=[0,0004*((T-4,988)^{2,66})*((35,806-T)^{1,80})*[0,479*(1-1,197*\exp(-0,039*M))]]$$

Para todas as funções descritas, Y é a variável analisada, T é a temperatura em °C e M o período de molhamento em horas.

Os isolados FSH-CLB-2 e KLA-MGG-1 apresentaram conídios germinados e apressórios formados em todas as temperaturas estudadas, exceto a 5 e 35 °C. As variáveis atingiram o máximo entre 20 e 25 °C, sendo 21,6 °C para germinação de conídios e formação de apressórios do isolado FSH-CLB-2, enquanto para o isolado KLA-MGG-1 foi 23,9 °C para germinação de conídios e 23,5 °C para formação de apressório, com 48 horas de molhamento.

Para o isolado FSH-CLB-2, em todas as combinações foi observado menor porcentagem de conídios germinados e apressórios formados. A 20 °C, a germinação e formação de apressório no isolado FSH-CLB-2 atingiu, respectivamente, 10% e 9% com

48 horas de molhamento enquanto, para o isolado KLA-MGG-1 a média foi de 37% e 32%.

A germinação e a formação de apressórios, em ambos os isolados, aumentaram com o aumento das horas de molhamento. Para o isolado FSH-CLB-2, os valores médios da germinação foram de 2, 7, 6, 10 e 10% nos períodos de molhamento de 6, 12, 24, 36 e 48 horas, respectivamente. Para o isolado KLA-MGG-1, os valores médios foram 6, 16, 34, 36 e 39%.

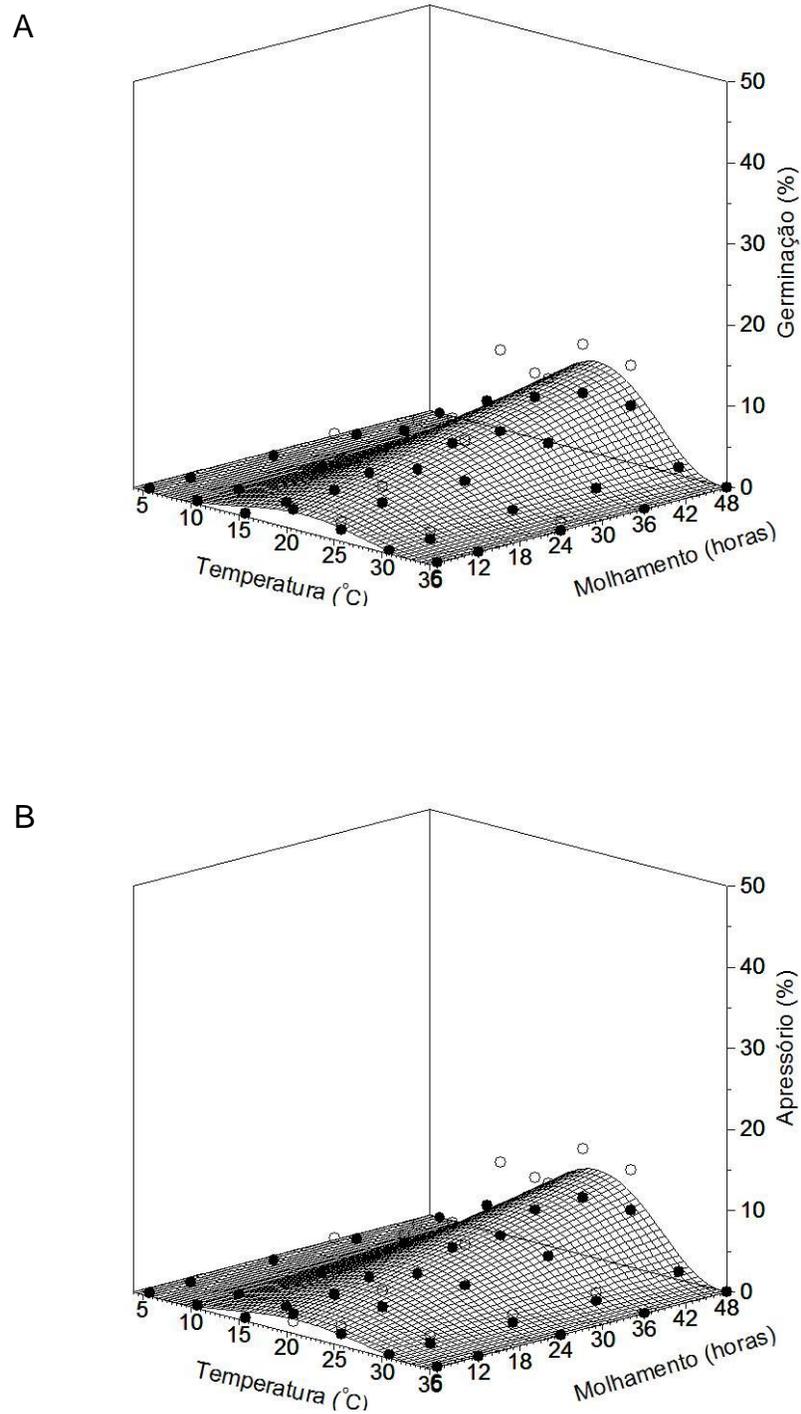


Figura 2 - Superfície de resposta da germinação de conídios de *C. acutatum* (A) e formação de apressórios (B) (isolado FSH-CLB-2), em função da temperatura e do período de molhamento *in vitro*. Círculos brancos representam dados do primeiro experimento e pretos representam dados do segundo experimento

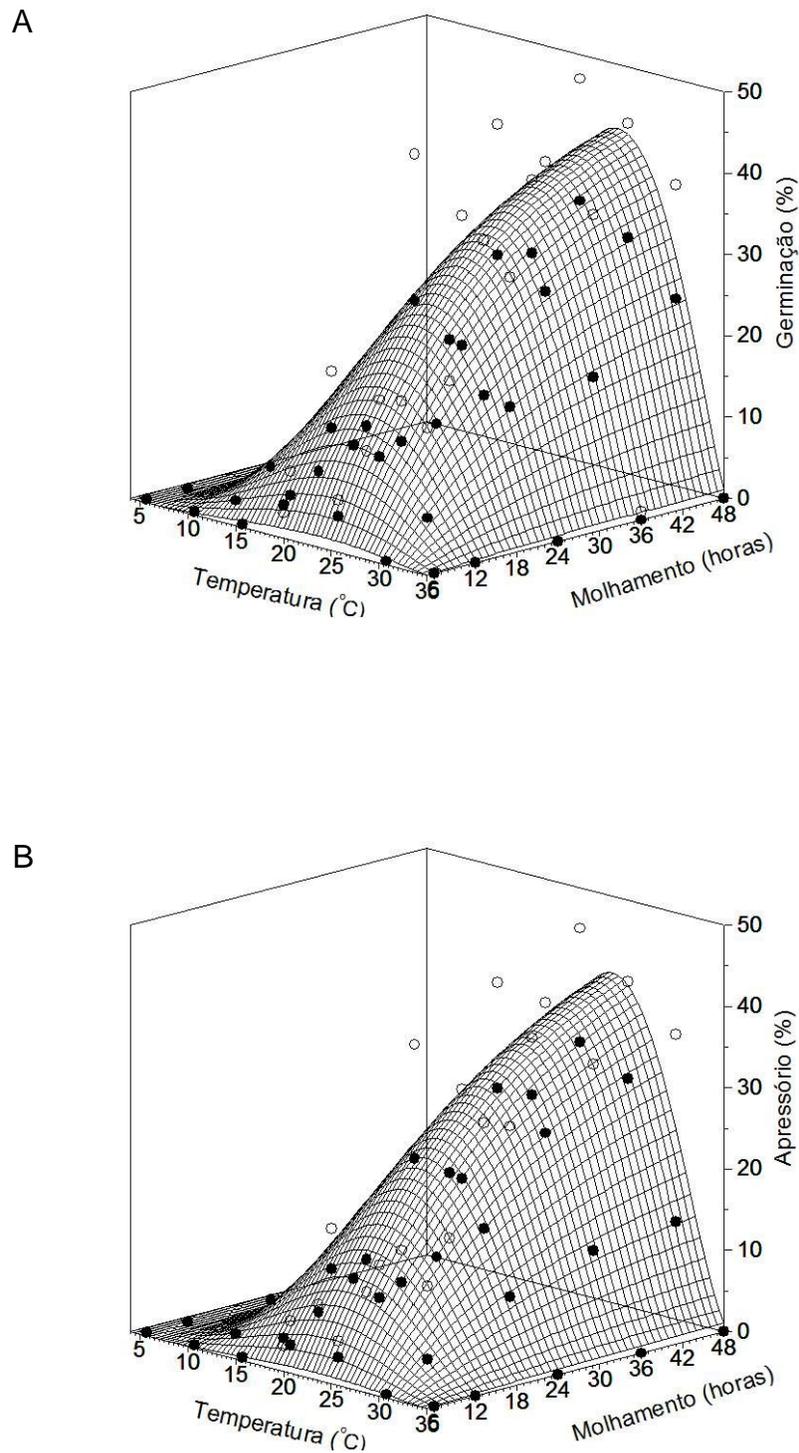


Figura 3 - Superfície de resposta da germinação de conídios de *C. acutatum* (A) e formação de apressórios (B) (isolado KLA-MGG-1), em função da temperatura e do período de molhamento *in vitro*. Círculos brancos representam dados do primeiro experimento e pretos representam dados do segundo experimento

Em folhas de citros, foi utilizado o modelo $Y=\exp(\beta)/1+\exp(\beta)*100$ para ajustar a relação entre temperatura, período de molhamento e os eventos de pré-penetração. A superfície de resposta para a germinação de conídios em folhas de laranjeira inoculadas com o isolado FSH-CLB-2 (Figura 4A) foi descrita pela função,

$$Y=[\exp(-12,763+(0,403*M)-(0,005*M^2)+(0,447*T)-(0,009*T^2))]/[1+\exp(-12,763+(0,403*M)-(0,005*M^2)+(0,447*T)-(0,009*T^2))]*100$$

Formação de apressório (Figura 4B) foi descrita pela função,

$$Y=[\exp(-19,923+(0,448*M)-(0,005*M^2)+(0,923*T)-(0,020*T^2))]/[1+\exp(-19,923+(0,448*M)-(0,005*M^2)+(0,923*T)-(0,020*T^2))]*100$$

Em folhas de limoeiro, a geminação de conídios (Figura 5A) foi descrita pela função,

$$Y=[\exp(-7,610+(0,115*M)-(0,001*M^2)+(0,447*T)-(0,009*T^2))]/[1+\exp(-7,610+(0,115*M)-(0,001*M^2)+(0,447*T)-(0,009*T^2))]*100$$

A formação de apressório (Figura 5B) foi descrita pela função,

$$Y=[\exp(-9,093+(0,115*M)-(0,001*M^2)+(0,534*T)-(0,011*T^2))]/[1+\exp(-9,093+(0,115*M)-(0,001*M^2)+(0,534*T)-(0,011*T^2))]*100$$

Conídios do isolado FSH-CLB-2 germinaram e formaram apressórios em todas as combinações de temperaturas e períodos de molhamento em folhas de laranjeira e limoeiro, exceto a 15 °C com 12 horas de molhamento em folhas de laranjeira. De acordo com o modelo, a temperatura ideal para germinação de conídios e formação de apressórios em folhas de laranjeira foi 24 e 23 °C, respectivamente. A 24 °C a germinação de conídios e formação de apressórios foi 27% e 11%, respectivamente, com 24 horas de molhamento e aumentou para 28% e 18%, com 48 horas de

molhamento. A partir de 25 °C, houve queda na porcentagem das variáveis estudadas com o aumento das horas de molhamento devido ao desenvolvimento de conídios secundários, os quais contribuíram para o aumento do número total de conídios na folha.

Em folhas de limoeiro não foi observado queda na porcentagem de conídios germinados, mesmo com a presença de conídios secundários. A germinação de conídios e formação de apressórios aumentaram gradativamente com o aumento da temperatura e período de molhamento. Essas variáveis atingiram o máximo a 24,4 e 23,7 °C, respectivamente, e período de molhamento de 48 horas, que corresponderam a 54% de conídios germinados e 49% de apressórios formados.

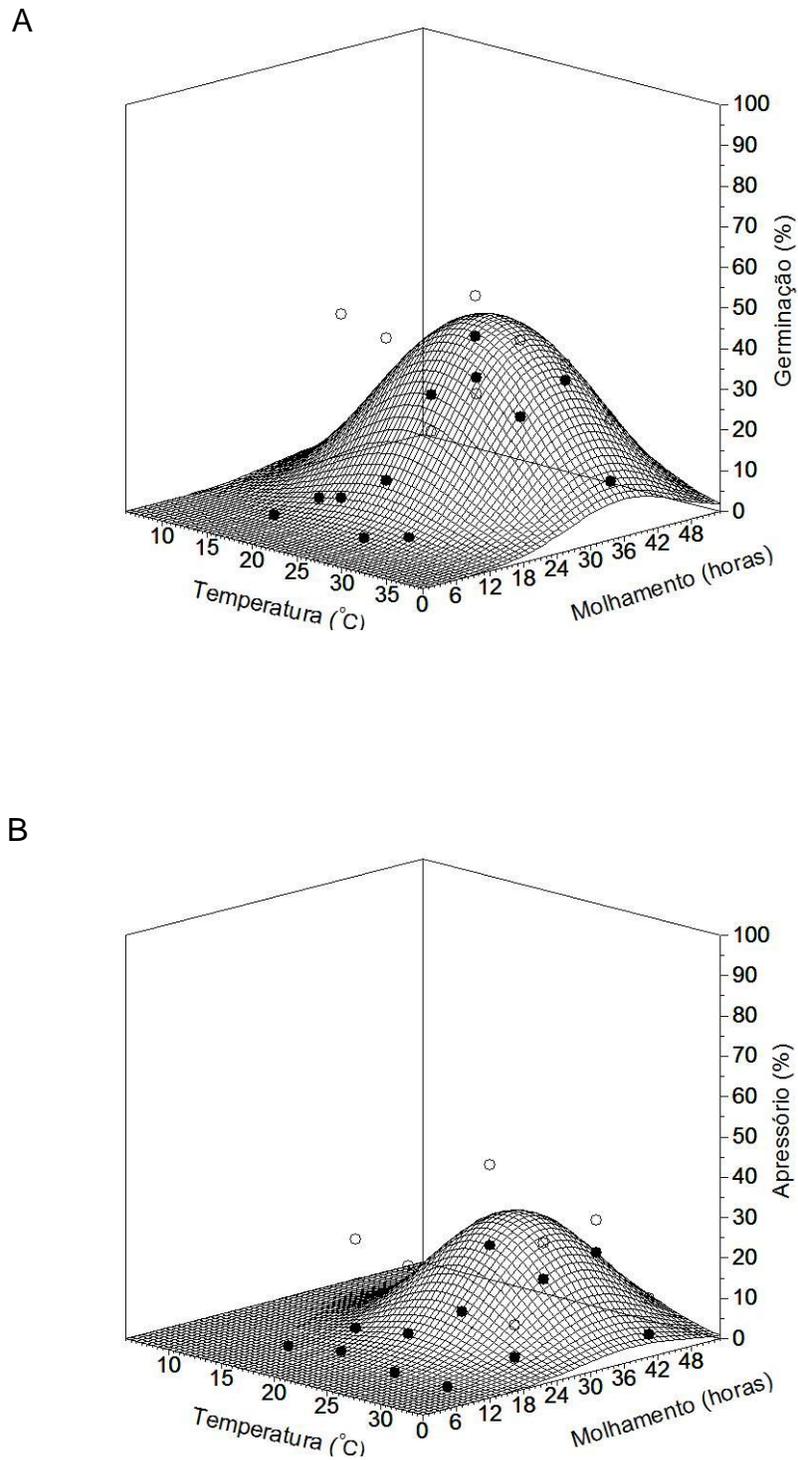
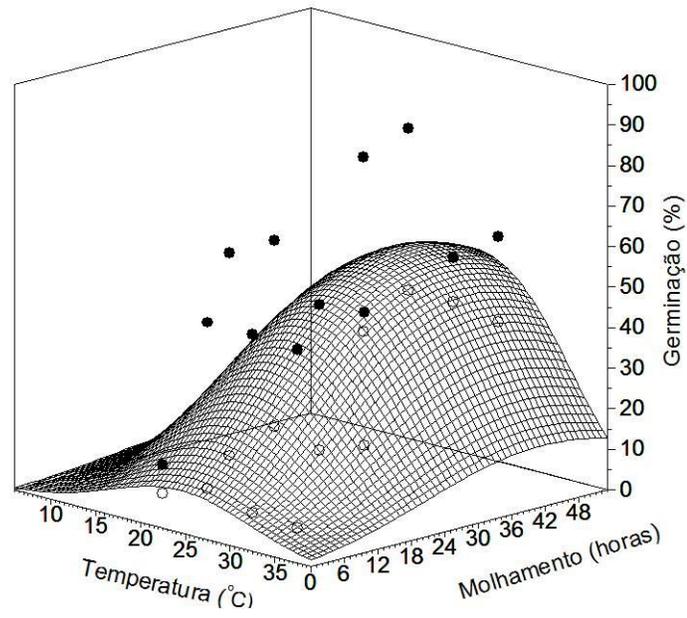


Figura 4 - Superfície de resposta da germinação de conídios de *C. acutatum* (A) e formação de apressórios (B) (isolado FSH-CLB-2) em folhas de laranjeira, em função da temperatura e do período de molhamento. Círculos brancos representam dados do primeiro experimento e pretos representam dados do segundo experimento

A



B

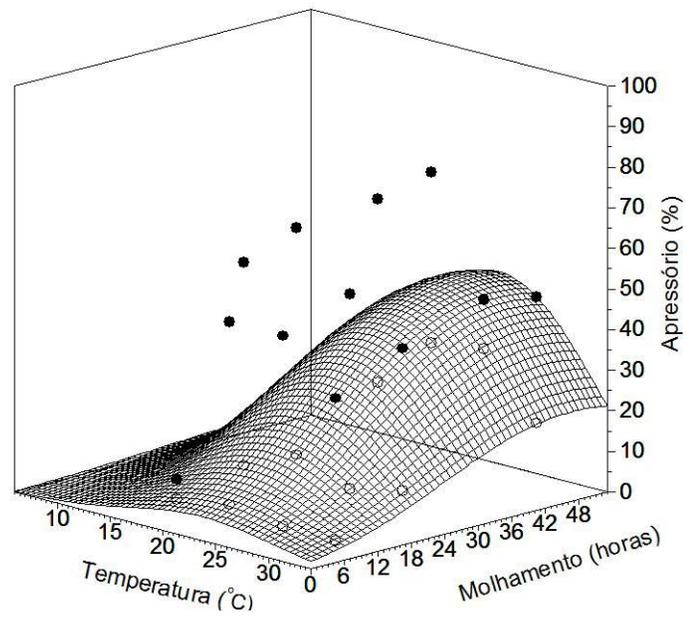


Figura 5 - Superfície de resposta da germinação de conídios de *C. acutatum* (A) e formação de apressórios (B) (isolado FSH-CLB-2) em folhas de limoeiro, em função da temperatura e do período de molhamento. Círculos brancos representam dados do primeiro experimento e pretos representam dados do segundo experimento

A superfície de resposta para estimar a germinação de conídios em folhas de laranjeira inoculadas com o isolado KLA-MGG-1 (Figura 6A) foi obtida através da função,

$$Y = [\exp(-16,287 + (0,357 * M) - (0,004 * M^2) + (0,815 * T) - (0,016 * T^2))] / [1 + \exp(-16,287 + (0,357 * M) - (0,004 * M^2) + (0,815 * T) - (0,016 * T^2))] * 100$$

A formação de apressórios (Figura 6B) foi descrita pela função,

$$Y = [\exp(-21,006 + (0,437 * M) - (0,005 * M^2) + (1,074 * T) - (0,025 * T^2))] / [1 + \exp(-21,006 + (0,437 * M) - (0,005 * M^2) + (1,074 * T) - (0,025 * T^2))] * 100$$

Em folhas de limoeiro, a germinação de conídios (Figura 7A) pôde ser estimada pela função,

$$Y = [\exp(-10,902 + (0,446 * M) - (0,006 * M^2) + (0,485 * T) - (0,013 * T^2))] / [1 + \exp(-10,902 + (0,446 * M) - (0,006 * M^2) + (0,485 * T) - (0,013 * T^2))] * 100$$

A formação de apressórios (Figura 7B) foi descrita pela função,

$$Y = [\exp(-11,589 + (0,544 * M) - (0,007 * M^2) + (0,341 * T) - (0,010 * T^2))] / [1 + \exp(-11,589 + (0,544 * M) - (0,007 * M^2) + (0,341 * T) - (0,010 * T^2))] * 100$$

Em folhas de laranjeira e limoeiro, o isolado KLA-MGG-1 não germinou a 15 °C com 12 horas de molhamento. As temperaturas ideais para germinação de conídios e formação de apressórios em folhas de laranjeira foram 24,1 e 21,2 °C, respectivamente, correspondendo a 40% de conídios germinados e 28% de apressórios formados, com 48 horas de molhamento. Em folhas de limoeiro, a porcentagem de conídios germinados e apressórios formados atingiram o máximo a 18,1 e 16,2 °C, respectivamente, em que 65% de conídios germinaram e 47% de apressórios foram

formados. Comparando os hospedeiros, observou-se maior suscetibilidade das folhas de limoeiro.

Queda na porcentagem das variáveis estudadas com o aumento das horas de molhamento foi observada em folhas de laranjeira e limoeiro.

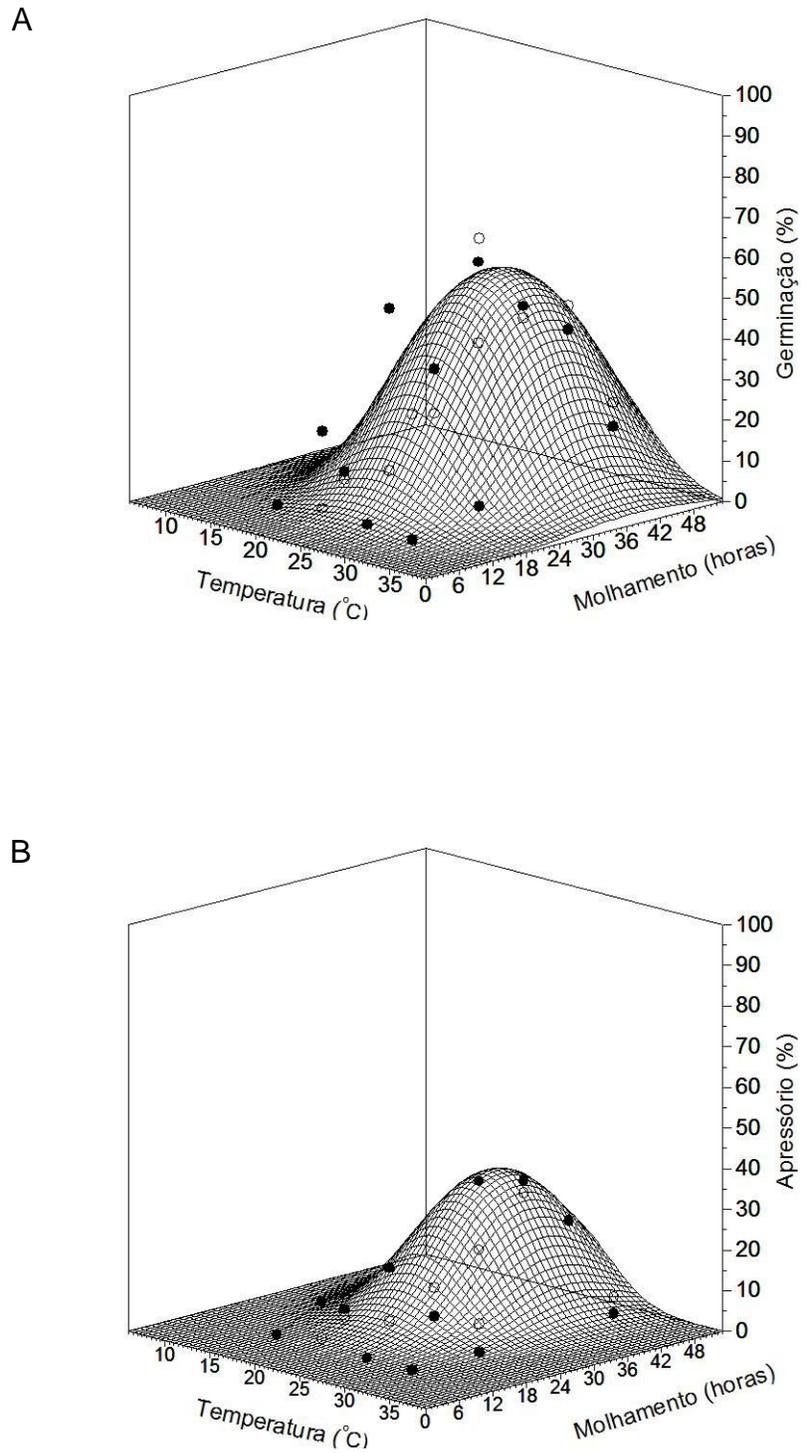


Figura 6 - Superfície de resposta da germinação de conídios de *C. acutatum* (A) e formação de apressórios (B) (isolado KLA-MGG-1) em folhas de laranjeira, em função da temperatura e do período de molhamento. Círculos brancos representam dados do primeiro experimento e pretos representam dados do segundo experimento

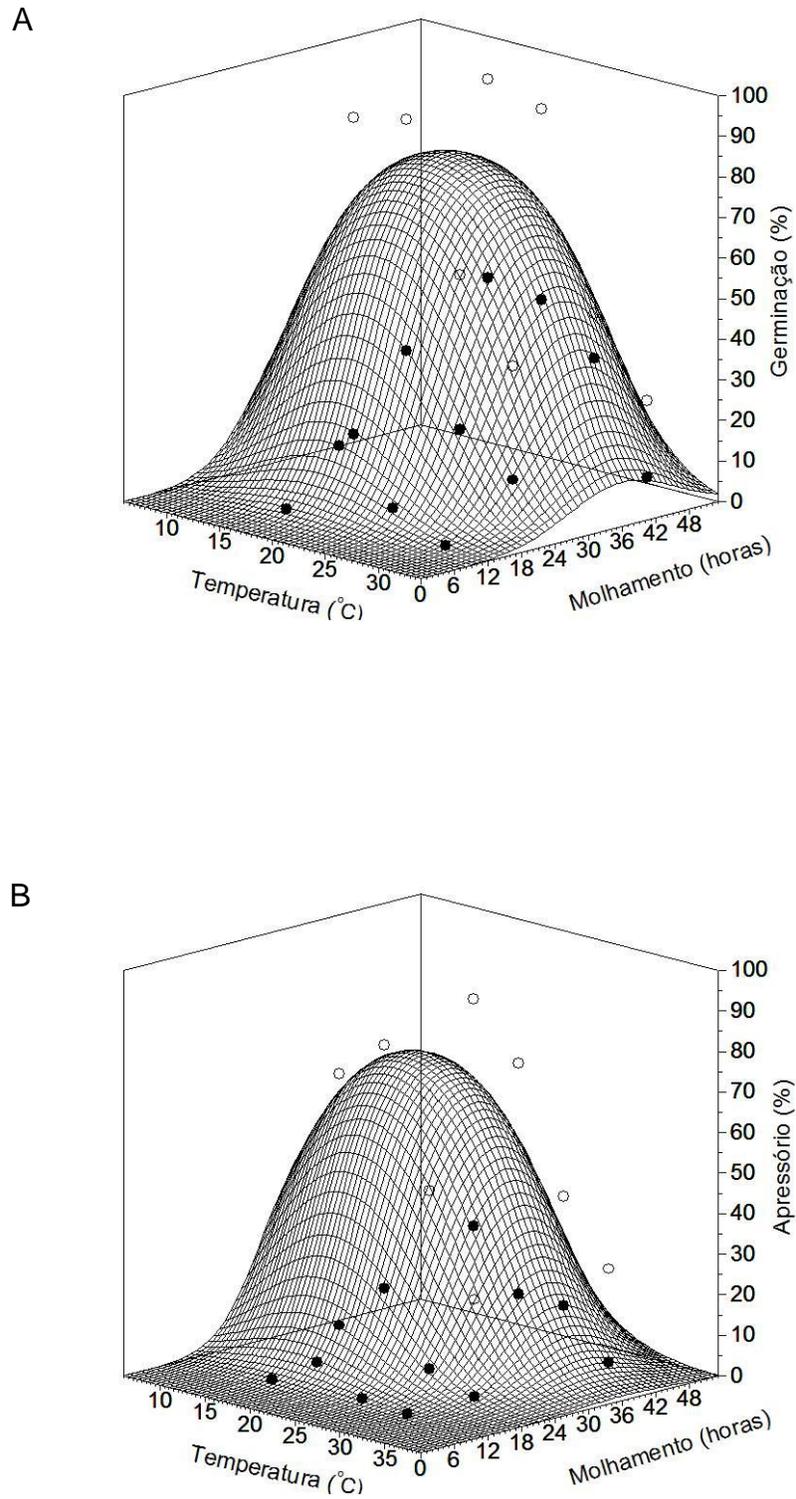


Figura 7 - Superfície de resposta da germinação de conídios de *C. acutatum* (A) e formação de apressórios (B) (isolado KLA-MGG-1) em folhas de limoeiro, em função da temperatura e do período de molhamento. Círculos brancos representam dados do primeiro experimento e pretos representam dados do segundo experimento

4.2.4 Discussão

Os resultados desse trabalho indicam que a germinação dos conídios e a formação de apressórios de *C. acutatum* foram influenciadas pela temperatura e período de molhamento, em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*.

A comparação dos isolados FSH-CLB-2 e KLA-MGG-1, *in vitro*, demonstrou que os requerimentos ambientais foram semelhantes, com temperatura ideal entre 20 e 25 °C e longo período de molhamento, no entanto, a porcentagem de conídios germinados e apressórios formados foram maiores para o isolado KLA-MGG-1. Esse resultado foi confirmado nos testes realizados *in vivo*, porém a temperatura ideal depende do hospedeiro, provavelmente devido à disponibilidade de nutrientes e compostos químicos presentes nas folhas de laranjeira e limoeiro (OBANOR et al., 2008; PRUSKY; PLUMBERY; KOBILER, 1991). Essa variação entre os dois isolados na fase de pré-penetração também foi observada para *C. gloeosporioides*. A porcentagem de conídios germinados e a formação de apressórios foram superiores no isolado HM 502 quando comparado ao isolado HM 514 (MUNAUT; MARAITE, 1998). Em frutos de maracujá-amarelo, foi verificado que os dois isolados de *C. gloeosporioides* testados foram favorecidos pela mesma faixa de temperatura, porém se diferenciam com base na agressividade (LIMA FILHO et al., 2005). Por outro lado, estudos realizados com isolados de *C. gloeosporioides* que causam antracnose em manga, demonstraram diferença entre os isolados quanto a temperatura ideal para a formação de apressórios e *peg* de penetração (ESTRADA; DODD; JEFFRIES, 2000). No presente trabalho era esperado que os isolados apresentassem o mesmo comportamento, pois apesar de terem sido obtidos de diferentes hospedeiros, os isolados pertencem ao mesmo agrupamento genético (PERES et al., 2008).

Os requerimentos ambientais ideais ao evento de pré-penetração foram dependentes dos estudos realizados *in vitro* ou *in vivo*, além da combinação entre isolado e hospedeiro. Para a germinação de conídios e formação de apressórios do isolado KLA-MGG-1, testadas *in vitro*, as temperaturas ideais foram 23,9 e 23,5 °C, respectivamente, enquanto em folhas de laranjeira foram 24,1 e 21,2 °C e, em folhas de limoeiro foram 18,1 e 16,2 °C. Para isolado FSH-CLB-2, as temperaturas ideais para a

germinação de conídios e formação de apressórios *in vitro* foi 21,6 °C, enquanto em folhas de laranjeira foram 24 e 23 °C, respectivamente, e em folhas de limoeiro de 24,4 e 23,7 °C, respectivamente. Situação semelhante foi observada no patossistema goiaba-*Guignardia citricarpa* em ensaios realizados *in vitro* e *in vivo*. As temperaturas ideais para a germinação de conídios e formação de apressório *in vitro* foram 27,7 e 26,3 °C, respectivamente, e em frutos de goiabeira foram 26,7 °C para germinação de conídios e 25,5 °C para formação de apressórios (ESCANFERLA et al., 2009). Estrada; Dodd e Jeffries (2000) em estudo com o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* em membrana de celofane e frutos de mangueira relataram diferença na formação das estruturas de infecção nos dois substratos. A porcentagem de tubo germinativo emitido pelos conídios sob temperaturas de 20, 25 e 30 °C foram 58, 90 e 56% em membrana de celofane e 38, 71 e 42% na superfície de frutos de mangueira, respectivamente.

O desenvolvimento de estruturas fúngicas de *C. acutatum* em citros ocorreu em grande amplitude de temperatura, embora seja favorecida no intervalo de 20 a 25 °C (FAGAN, 1979). Resultados similares foram encontrados no presente estudo para os isolados FSH-CLB-2 e KLA-MGG-1 em placas de poliestireno e em folhas de citros, exceto o isolado KLA-MGG-1 em folhas de limoeiro, o qual foram favorecidos no intervalo de 15 a 20 °C. Timmer e Zitko (1993) não relataram à importância da temperatura no desenvolvimento da podridão floral em experimentos realizados no Sul da Flórida. Mas os resultados dos dois trabalhos não devem ser comparados, pois o estudo realizado em 1993 foi baseado na correlação de observações no campo. Inúmeros fatores estão correlacionados com a doença no campo, por exemplo, no presente estudo a inoculação foi realizada apenas em folhas jovens. A influência da idade das folhas de morango na infecção de *Mycosphaerella fragariae* foi observada por Carisse; Bougeois e Duthie (2000). Os autores relataram dez vezes mais lesões em folhas jovens (5 a 7 dias) quando comparado as folhas velhas (19 a 21 dias).

A temperatura favorável à germinação de conídios coincidiu com aquela para a formação de apressórios apenas nos experimentos com isolado FSH-CLB-2 *in vitro* e em folhas de limoeiro. Resultados similares foram obtidos em folhas de morango, onde a temperatura favorável depende da fase de desenvolvimento da estrutura de infecção (LEANDRO et al., 2003). A germinação dos conídios de *C. acutatum* foi favorecida no

intervalo de 23 a 27,7 °C, mas para o desenvolvimento de apressórios foi de 17,6 a 26,5 °C e para a produção de novos conídios a partir dos apressórios foi de 21 a 32,7 °C. Resultados semelhantes foram observados para *Spilocaea oleagina* em folhas de oliveira, em que a porcentagem de conídios germinados foi maior a 20 °C e a formação do apressório a 15 °C (OBANOR et al., 2008). Para *C. gloeosporioides* proveniente de manga, a temperatura ótima para a formação de apressório foi 25 °C, enquanto que para o apressório tornar-se melanizado foi 30 °C (ESTRADA; DODD; JEFFRIES, 2000). Soares; Lourenço e Amorim (2008) relataram que o intervalo de temperatura favorável a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, estimada pelo modelo beta monomolecular foi de 20 a 25 °C, enquanto para a formação de apressórios foi entre 15 e 30 °C para *C. acutatum* e entre 20 e 25 °C para *C. gloeosporioides*.

Exceto a 5 e 35 °C, a porcentagem de germinação e formação de apressórios *in vitro* aumentou com a elevação dos períodos de molhamento. Esses resultados foram similares aos obtidos em testes *in vitro* e em morango com *C. acutatum* (BULGER; ELLIS; MADDEN, 1987; WILSON; MADDEN; ELLIS, 1990) e em estudos mais recentes com *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* obtidos de frutos de goiabeira (SOARES; LOURENÇO; AMORIM, 2008). No presente estudo, os resultados obtidos *in vivo* foram compatíveis com os *in vitro*. Entretanto, o desenvolvimento de conídios secundários aumentou o número total de conídios principalmente nas folhas, acarretando a baixa porcentagem de conídios germinados com 48 horas de molhamento. Conídios secundários foram observados em folhas e placas de poliestireno, porém no último a quantidade foi menor não proporcionando queda na porcentagem das variáveis estudadas com o aumento das horas de molhamento. Tal resultado leva a concluir que o fenômeno ocorreu na ausência de penetração do hospedeiro e de outras fontes de nutrientes assim como em experimentos realizados em folhas de morango e *in vitro* (LEANDRO et al., 2001). Dessa forma, nosso trabalho sugeriu que os conídios secundários aumentam a quantidade de inóculo, enquanto as pétalas não estão disponíveis.

O aumento das variáveis testadas com a elevação do período de molhamento confirma a importância do molhamento foliar no desenvolvimento de estruturas fúngicas e no progresso da doença, sugerindo, principalmente na época da florada, o plantio de

citros em área com baixa pluviosidade, já que substâncias presentes nas pétalas estimulam a germinação de apressórios e desenvolvimento de novos conídios de *C. acutatum* (ZULFIQAR et al., 1996). No presente trabalho, foi observado estímulo ao crescimento vegetativo, ao desenvolvimento de conídios secundários e a formação de apressórios ao longo das hifas em função do contato das folhas inoculadas com água e substâncias presentes na pétala. Germinação dos apressórios não foi observada, provavelmente devido ao curto período de tempo em que as folhas ficaram incubadas. No ensaio realizado por Zulfiqar et al. (1996), as plantas de citros foram inoculadas e após 30 dias foram pulverizadas com extrato de pétalas e avaliadas após 48 horas.

A relação entre as condições ambientais favoráveis e o desenvolvimento de estruturas fúngicas poderá ser útil para a construção de sistemas de previsão de doenças, cujo propósito é determinar o momento ideal das pulverizações com fungicidas. No entanto, a grande amplitude de temperaturas e períodos de molhamento favoráveis à infecção de *C. acutatum* indica que sua ocorrência é muito frequente, com isso o manejo da doença deverá ser por meio de medidas preventivas.

4.3 Conclusões

Os isolados FSH-CLB-2 e KLA-MGG-1 de *Colletotrichum acutatum* obtidos de flores de laranjeira e limoeiro, respectivamente, germinaram, formaram apressórios e desenvolveram-se em condições de temperatura e período de molhamento semelhantes, porém as porcentagens das variáveis estudadas foram maiores para o isolado KLA-MGG-1. A faixa de temperatura ideal foi de 20 a 25 °C, exceto em folhas de limoeiro inoculadas com o isolado KLA-MGG-1 que foi entre 15 e 20 °C.

Foi comum a presença de conídios secundários em ambos os isolados, sendo esses os responsáveis pelo declínio da porcentagem de conídios germinados e apressórios formados após 48 horas da inoculação.

Referências

ADASKAVEG, J. E.; FÖRSTES. Occurrence and management of anthracnose epidermics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**, St. Paul: APS Press, 2000. chap. 19, p. 317-336.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CÍTRICOS - ABECITRUS. **A laranja no Brasil**. Acesso em 17 de novembro de 2008. Disponível em http://www.abecitrus.com.br/historia_br.html#brasil

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

BULGER, M.A.; ELLIS, M.A.; MADDEN, L.V. Influence of temperature and wetness duration on infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and disease incidence of fruit originating from infected flowers. **Phytopathology**, Lancaster, v. 77, p. 1225-1230, 1987.

CARISSE, O.; BOURGEOIS, G.; DUTHIE, J.A. Influence of temperature and leaf wetness duration on infection of strawberry leaves by *Mycosphaerella fragariae*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 90, p. 1120-1125. 2000.

CLAUSEN, R.E. A new fungus concerned in wither tip of varieties of *Citrus medica*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 2, p. 217-236. 1912.

DENHAM, T.G. Citrus production and premature fruitdrop disease in Belize. **PANS**, London, v. 25, p. 30-36, 1979.

DENHAM, T.G.; WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 98, p. 65-77, 1981.

DODD, J. C.; ESTRADA, A.; JEGER, M. J. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics, In: BAILEY, A.J.; JEGER, J.M. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. p. 308-325.

ESCANFERLA, M.E.; MORAES, S.R.G.; SALAROLI, R.B.; MASSOLA Jr., N.S. Pre-penetration stages of *Guignardia psidii* in guava: effect of temperature, wetness duration and fruit age. **Journal of Phytopathology**, Berlin, 2009. In press.

ESTRADA, A.B.; DODD, J.C.; JEFFRIES, P. Effect of humidity and temperature on conidial germination and apressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 608-618, 2000.

EVERETT, K. R. The effect of low temperatures on *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing body rots of avocados in New Zealand, **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 32, n. 4, p. 441-448, 2003.

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

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

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**. 4° ed. São Paulo: Editora Ceres. 2005. v. 2, cap. 28, p. 239-269.

FNP CONSULTORIA & COMÉRIO. Laranja. In: _____. **Agrianual 2008**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2008. p. 273-303.

FOSTER, H.; ADASKAVEG, J.E. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. **Phytopathology**, Lancaster, v. 89, p. 1056-1065, 1999.

HAU, B.; KRANZ, J. Mathematics and statistic for analyses in epidemiology. In: KRANZ, J. (Ed.) **Epidemics of plant disease: mathematics analyses and modeling**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 12-52.

ISHIDA, N.; AKAI, S. Relation of temperature to germination of conidia and apressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. **Mycologia**, Lancaster, v. 61, p. 382-389, 1969.

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

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

- LIMA FILHO, R.M.L.; OLIVEIRA, S.M.A.de; MACIEL, M.I.S.; MORAES, L.M.de. Influência da temperatura e período de molhamento no desenvolvimento da antracnose do maracujá-amarelo em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 31, p. 27-32, 2005.
- McMILLAN, R.T; TIMMER, L.M. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, p. 81, 1989.
- McMILLAN, R.T; TIMMER,L.M; McGOVERN, R.J. **Postbloom fruit drop**. University of Florida, Florida Cooperative Extension Service, may, 1994.
- MUNAUT, F.; MARAIT, H. Conidium germination and apressorium penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Stylosanthes guianensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, p. 19-26, 1998.
- NEVES, M.F.; LOPES, F.F.; TROMBIN, V.G.; AMARO, A.A.; NEVES, E.M.; JANK, M.S. **Caminhos para a citricultura. Uma agenda para manter a liderança mundial.**, São Paulo: Editora Atlas, 2007. 110p.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; LOPES, F.F. **Uma agenda de competitividade para a indústria paulista: sistema agropecuário da laranja**. São Paulo. Fev.2008. (http://www.ipt.br/atividades/pit/notas/files/NT_Laranja.pdf).
- OBANOR, F.O; WALTER, M.;JONES, E.E.; JASPERS, M.V. Effect of temperature, relative humidity, leaf wetness and leaf age on *Spilocoaea oleagina* conidium germination on olive leaves. **European Journal of Plant Pathology**, Lincoln, v. 120, p. 211-222, 2008.
- PERES, N. A.; MACKENZIE, S. J.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 98, p. 345-352, 2008.
- PORTO, O.M.de; ROSSETTI, V.; DORNELLES, C.M.M. Queda de frutos jovens de citrus, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas, 1979. p. 681-692.
- PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R.A.; KOBILER, I. The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, London, v. 40, p. 45-52, 1991.
- ROSSETTI, V.; CARVALHO, M.L.V.; VECHIATO, M.H.; BATISTA, F.A.S. Estudos sobre a queda prematura de frutos cítricos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FRUTICULTURA, 6., 1981, Recife. **Anais...** Recife, 1981. p. 641-654.

SOARES, A.R.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e período de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 265-272, 2008.

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

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

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). **Colletotrichum. Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction**. Saint Paul: APS Press, 2000. p. 300-316.

TIMMER, L.M.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. St. Paul: APS Press, 2000. 92p.

VERMA, N.; MACDONALD, L.; PUNJA, Z.K. Inoculum prevalence, host infection and biological control of *Colletotrichum acutatum*: causal agent of blueberry anthracnose in British Columbia, **Plant Pathology**, London, v. 55, p. 442-450, 2006.

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

WILSON, L.L.; MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 80, p. 111-116, 1990.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)