

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

**Epidemiologia comparativa de podridão parda do pessegueiro
causada por *Monilinia fructicola* e *Monilinia laxa*: o monociclo**

Sthela de Siqueira Angeli

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

**Piracicaba
2008**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Sthela de Siqueira Angeli
Engenheiro Agrônomo

Epidemiologia comparativa de podridão parda do pessegueiro causada por
***Monilinia fructicola* e *Monilinia laxa*: o monociclo**

Orientadora:
Prof^a. Dra. LILIAN AMORIM

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

Piracicaba
2008

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

Angeli, Sthela de Siqueira

Epidemiologia comparativa de podridão parda do pessegueiro causada por *Monilinia fructicola* e *Monilinia laxa*: o monociclo. / Sthela de Siqueira Angeli - - Piracicaba, 2008.
71 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Fungos fitopatogênicos 2. Pessêgo 3. Podridão (Doenças de plantas) - Epidemiologia
I. Título

CDD 634.25
A582e

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades oferecidas ao longo do meu caminho e por estar sempre presente em minha vida;

À minha família, em especial à minha mãe, Martha A. S. Angeli, pela compreensão e apoio em todas as ocasiões da minha vida;

À Professora Doutora Lilian Amorim pela orientação, ensinamentos, dedicação, apoio, confiança e paciência ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

À FAPESP, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de Mestrado;

Aos professores do Departamento, pela disponibilidade no esclarecimento de eventuais dúvidas;

Aos funcionários do Departamento, sempre disponíveis para ajudar e com um sorriso no rosto, em especial à Silvia, Jeferson e Carmem;

A todos os meus amigos, de longa data ou não, pela amizade, apoio e por estarem presentes em todas as situações

A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho;

A todos, o meu MUITO OBRIGADA!!!!!!

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| Referências | 9 |
| 2 EFEITO DA TEMPERATURA, DO PERÍODO DE MOLHAMENTO E DO FUNGICIDA IMINOCTADINA NO COMPORTAMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Monilinia fructicola</i> E <i>M. laxa</i> | 10 |
| Resumo | 10 |
| Abstract | 11 |
| 2.1 Introdução | 11 |
| 2.2 Revisão bibliográfica | 12 |
| 2.3 Materiais e métodos | 17 |
| 2.3.1 Avaliação do efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de conídios de <i>M. fructicola</i> e <i>M. laxa</i> <i>in vitro</i> | 17 |
| 2.3.2 Avaliação do efeito da temperatura na taxa de crescimento micelial e na esporulação das colônias de <i>M. fructicola</i> e <i>M. laxa</i> <i>in vitro</i> | 18 |
| 2.3.3 Avaliação da sensibilidade de isolados de <i>M. fructicola</i> e <i>M. laxa</i> à molécula iminoctadina <i>in vitro</i> | 19 |
| 2.3.4 Análise dos dados | 20 |
| 2.4 Resultados | 21 |
| 2.4.1 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de conídios de <i>M. fructicola</i> e <i>M. laxa</i> <i>in vitro</i> | 21 |
| 2.4.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial de <i>M. fructicola</i> e <i>M. laxa</i> <i>in vitro</i> | 28 |
| 2.4.3 Efeito da temperatura na esporulação de <i>M. fructicola</i> e <i>M. laxa</i> <i>in vitro</i> | 31 |
| 2.4.4 Sensibilidade de isolados de <i>M. fructicola</i> e <i>M. laxa</i> à molécula iminoctadina <i>in vitro</i> | 32 |
| 2.5 Discussão | 34 |
| 2.6 Conclusões..... | 36 |
| Referências | 36 |

| | |
|---|----|
| 3 EFEITO DA TEMPERATURA E DA DURAÇÃO DO MOLHAMENTO NA INFECÇÃO DE CONÍDIOS DE AGENTES CAUSAIS DA PODRIDÃO PARDA DO PESSEGUEIRO | 39 |
| Resumo | 39 |
| Abstract | 39 |
| 3.1 Introdução | 40 |
| 3.2 Revisão bibliográfica | 41 |
| 3.3 Material e métodos..... | 48 |
| 3.3.1 Avaliação do efeito da temperatura e da duração do molhamento na infecção de pêssegos por conídios de <i>M. fructicola</i> e <i>M. laxa</i> | 48 |
| 3.3.2 Análise dos dados | 51 |
| 3.4 Resultados | 52 |
| 3.5 Discussão | 61 |
| 3.6 Conclusões..... | 64 |
| Referências | 65 |
| ANEXOS..... | 69 |

RESUMO

Epidemiologia comparativa de podridão parda do pessegueiro causada por *Monilinia fructicola* e *Monilinia laxa*: o monociclo

Frente à recente detecção em território brasileiro de *Monilinia laxa*, que assim como *M. fructicola*, é causadora da podridão parda do pessegueiro, e à falta de informações sobre a epidemiologia dos patógenos causadores da doença em regiões subtropicais, surgiu a necessidade deste trabalho, que teve por objetivos determinar as melhores condições de temperatura e molhamento para o desenvolvimento de *M. fructicola* e *M. laxa in vitro* e para a infecção e colonização pêssegos por conídios dos patógenos. Quatro isolados de *M. fructicola* e um isolado de *M. laxa*, provenientes de plantios do Estado de São Paulo e mantidos no laboratório de Epidemiologia da ESALQ, foram estudados. Foram avaliados os efeitos da temperatura e da duração do molhamento na germinação dos conídios *in vitro* e o efeito da temperatura no crescimento micelial e na esporulação dos patógenos. Ensaio para determinar a sensibilidade dos patógenos ao fungicida iminocadina também foram conduzidos. Adicionalmente, pêssegos maduros foram adquiridos, feridos, inoculados com suspensão de conídios e incubados em diferentes temperaturas sob diferentes períodos de câmara úmida. Diariamente incidência e severidade foram avaliadas. A esporulação foi avaliada ao final de cada tratamento. A faixa ótima de temperatura para germinação de conídios de *M. laxa*, de 5 a 30°C, é maior que a de *M. fructicola*, de 10 a 30°C. O período de molhamento não teve influência na germinação dos conídios. A melhor faixa de temperatura para crescimento micelial tanto de *M. fructicola* quanto *M. laxa* foi de 20 a 25°C. A esporulação de *M. laxa* foi inversamente proporcional à temperatura de incubação. Não houve relação entre temperatura e produção de esporos em *M. fructicola*. Ambas as espécies mostraram-se sensíveis, *in vitro*, à molécula iminocadina. A incidência da podridão parda foi superior a 80,9% em todos os tratamentos, para as duas espécies fúngicas. A 10°C os períodos de incubação e de latência foram menores para *M. laxa* que para *M. fructicola*. A faixa ótima de temperatura para o desenvolvimento de lesões variou de 15 a 25°C para os dois patógenos. A esporulação dos patógenos não mostrou relação com a temperatura nos ensaios *in vivo*. Diferenças nos sinais da espécie do patógeno foram observados nas lesões.

Palavras-chave: Podridão parda, *Prunus persica*

ABSTRACT

Comparative epidemiology of peach brown rot caused by *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa*: the monocycle

Due to the recent detection in Brazil of *Monilinia laxa*, that similar to *M. fructicola* causes the brown rot of peaches, and the lack of information about the epidemiology of the causal agents of this disease from subtropical regions, raised the need of such a study, which the aims were to determine the best temperature and wetness duration conditions to the development of *M. fructicola* and *M. laxa* in vitro and to infection and colonization of peaches by conidia from both pathogens. Four *M. fructicola* isolates and one *M. laxa* isolate, collected from infected fruit of São Paulo orchards and maintained at the Epidemiology Laboratory at ESALQ, were studied. Temperature and wetness duration effects on conidia germination in vitro and temperature effects on mycelial growth and sporulation of pathogens were evaluated. Trials to evaluate the sensitivity of isolates to the fungicide iminoctadine were also conducted. Furthermore, mature peaches were wounded on the surface, inoculated with a conidia suspension and incubated at different temperatures during different wet chamber periods. Incidence and severity of the disease were evaluated daily. Sporulation was evaluated at the end of each treatment. The favorable range of temperature to conidia germination of *M. laxa*, from 5 to 30°C, was greater than *M. fructicola* range, from 10 to 30°C. The wetness duration showed no influence on conidia germination. The best range of temperature for mycelial growth of both *M. fructicola* and *M. laxa* was from 20 to 25°C. Sporulation of *M. laxa* showed an inverse relationship to the incubation temperature. No relationship between temperature and conidia production was found for *M. fructicola*. Both species were sensitive to the iminoctadine fungicide *in vitro*. Incidence of brown rot was greater than 80.9% in all treatments, for both species. At 10°C incubation and latency periods were shorter for *M. laxa* than for *M. fructicola*. The best temperatures for lesion development varied between 15 and 25°C for both pathogens. Sporulation of the two species showed no relationship to the temperature on the in vivo trials. Visual differences were observed on pathogen symptoms on fruit.

Keywords: Brown rot, *Prunus persica*

1 INTRODUÇÃO

A podridão parda, uma das mais importantes doenças de espécies de *Prunus* em plantios comerciais de todo o mundo, pode ser causada por três espécies do gênero *Monilinia*: *M. fructicola* (G. Winter) Honey, *M. laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey e *M. fructigena* Honey. *M. fructigena* é endêmica na Europa e foi eliminada da América do Norte (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995), região onde *M. fructicola* ocorre abundantemente – assim como no Japão, na Austrália e na América do Sul. *M. fructicola* foi também relatada na França, Espanha e Áustria, mas foi erradicada dos dois últimos países, além de ter sido encontrada em pêssegos importados na Suíça (BOSSHARD *et al.*, 2006) e na Hungria (OEPP/EPPO, 2005). *M. laxa* é o patógeno responsável pelas grandes perdas na Europa (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995).

No Brasil, até o momento, só a espécie *M. fructicola* foi relatada como agente causal da doença. Entretanto, um isolado de *M. laxa* foi recentemente detectado em pêssego sintomático, proveniente de Jundiaí e encaminhado à Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP para diagnose (SOUZA *et al.*, 2008). Apesar da origem do pomar de onde o fruto foi proveniente não ter sido identificada, há um grande esforço da equipe de epidemiologia da ESALQ na determinação dessa espécie em pomares do Estado de São Paulo, pois a introdução de novos patógenos sempre representa uma ameaça aos plantios que, por décadas, foram conduzidos na ausência do organismo. A introdução de fungos fitopatogênicos em cultivos que nunca antes haviam sido a eles expostos é preocupante devido à propensão para reprodução sexuada, aumentando o potencial de adaptação evolutiva a novos ambientes (BOSSHARD *et al.*, 2006). No caso específico de *M. laxa* em São Paulo, mesmo na ausência de reprodução sexuada, a introdução da espécie pode trazer consequências desastrosas, pois poderá modificar a epidemiologia da doença, uma vez que ela é mais frequentemente associada à podridão floral e aos cancrios de ramos, contrariamente a *M. fructicola*, que ocasiona, mais frequentemente a podridão de frutos (BYRDE; WILLETTS, 1977), embora em condições favoráveis os dois patógenos infectem flores e frutos. A podridão floral ocasiona prejuízos diretos por meio da necrose das flores, além de contribuir com o aumento do inóculo no início da formação de frutos. Ademais, como as variedades cultivadas no Estado de São Paulo foram melhoradas na ausência dessa espécie patogênica e a resistência

a doenças não é o foco principal dos programas de melhoramento, seus níveis de suscetibilidade são desconhecidos (BARBOSA et al., 1997; BARBOSA, 2000).

Numa tentativa de antever o comportamento da doença causada por *M. laxa*, este trabalho teve por objetivo comparar o comportamento do isolado deste agente causal, mantido atualmente no Laboratório de Epidemiologia da ESALQ, com isolados de *M. fructicola* oriundos das principais regiões produtoras de São Paulo e provenientes das variedades mais plantadas.

Referências

- BARBOSA, W.; OJIMA, M.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; RIGITANO, O.; MARTINS, F.P.; SANTOS, R.R.; CASTRO, J.L. **Melhoramento do pessegueiro para regiões de clima subtropical-temperado**: realizações do Instituto Agrônômico no período de 1950-1990. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997. 22 p. (IAC. Documentos, 52).
- BARBOSA, W. **Relatórios anuais ao Instituto Agrônômico**: 1991-2000. Campinas: Instituto Agrônômico, 2000. Disponível em < <http://www.iac.sp.gov.br/> > Acesso em 12 nov. 2008.
- BOSSHARD, E.; HILBER-BODMER, M.; SCHÄRER, H.-J.; BÜNTER, M.; DUFFY, B. First report of the quarantine brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on imported stone fruits in Switzerland. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 12, p. 1554, 2006.
- BYRDE, R.J.W.; WILLETTS, H.J. **The Brown rot fungi of fruit**: their biology and control. Oxford: Pergamum Press, 1977. 171 p.
- OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIGGS, A.R. Brown rot. In: OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIRD, G.W.; RITCHIE, D.F.; URIU, K.; UEYMOTO, J.K. (Ed.). **Compendium of stone fruit diseases**. Saint Paul: APS, 1995. cap 1, p. 7-10.
- OEPP/EPPO. **List of A2 pests regulated as quarantine pests in the EPPO region**. 2005.
- SOUZA, D.C.; FAZZA, A.C.; CAMARGO, L.A.; MIO, L.M.; ANGELI, S.S.; AMORIM, L. First report of *Monilinia laxa* causing brown rot on peaches in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 6, p. S148-S149, 2008. Abstract.

2 EFEITO DA TEMPERATURA, DO PERÍODO DE MOLHAMENTO E DO FUNGICIDA IMINOCTADINA NO COMPORTAMENTO *in vitro* DE *Monilinia fructicola* E *M. laxa*

Resumo

A podridão parda do pessegueiro tinha como único agente causal no Brasil *M. fructicola*, porém, recentemente foi relatada a presença de *M. laxa*. Este trabalho teve por objetivos comparar o comportamento *in vitro* das duas espécies, quanto às exigências de temperatura e molhamento para germinação, crescimento micelial e esporulação. Foram avaliados quatro isolados de *M. fructicola* e um isolado de *M. laxa*, mantidos no laboratório de Epidemiologia da ESALQ, em BDA a 20°C no escuro. Três alíquotas de 40 µL de suspensões de 10⁴ conídios/mL de cada isolado foram colocadas em placas de poliestireno que, por sua vez, foram dispostas dentro de gerbox contendo papel de filtro e 30 mL de água. Os gerbox tampados foram mantidos em câmaras de crescimento a 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C durante 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Calculou-se a porcentagem de germinação por meio da observação de 100 conídios por alíquota. Para o crescimento micelial, discos de micélio foram retirados dos bordos das respectivas colônias e transferidos para o centro de placas de Petri com BDA. As placas foram colocadas em câmaras de crescimento a 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C até que houvesse completa colonização do fungo em uma das temperaturas. Medições diárias do diâmetro das colônias foram realizadas. Ao término deste experimento, discos de micélio próximos ao centro das colônias foram transferidos para tubos de ensaio, agitados em vórtex e após a retirada dos mesmos, avaliou-se a esporulação das colônias, através de contagem em hemocitômetro. A sensibilidade dos isolados ao princípio ativo iminoctadina também foi avaliada. Para tanto, discos de micélio dos bordos das colônias foram transferidos para BDA acrescido de 1, 10, 100 e 1000 ppm do princípio ativo, além da testemunha. Medições diárias do diâmetro da colônia foram feitas e avaliou-se a esporulação ao término do experimento. A faixa de temperatura favorável à germinação de *M. laxa* variou de 5 a 30°C, sendo maior que a faixa favorável à germinação por *M. fructicola*, de 10 a 30°C. O período de molhamento não exerceu influência na germinação dos conídios. O crescimento micelial das duas espécies ocorreu em uma ampla faixa de temperatura, abrangendo todas as temperaturas estudadas. O máximo crescimento foi observado na faixa de 20 a 25°C tanto para *M. fructicola* quanto para *M. laxa*. A esporulação de *M. laxa* foi inversamente proporcional à temperatura. Não houve relação entre temperatura e produção de esporos em *M. fructicola*. A molécula iminoctadina foi eficiente no controle dos dois patógenos *in vitro*, em concentrações a partir de 100 ppm para *M. fructicola* e 10 ppm para *M. laxa*.

Palavras-chave: Germinação; Crescimento; Esporulação; Temperatura; Podridão parda

Abstract

The only causal agent of brown rot in peaches in Brazil was *M. fructicola*. However, the detection of *M. laxa* has been reported recently. This work aimed to compare the *in vitro* behavior of both species with regard to temperature and wetness duration requirements for conidia germination and temperature requirements for mycelial growth and sporulation. Four *M. fructicola* isolates and one *M. laxa* isolate, kept at the Epidemiology Laboratory at ESALQ on PDA at 20°C in the dark were studied. Three 40 µL aliquots of 10⁴ conidia/mL suspensions of each isolate were placed in plastic petri dishes, which were put inside a gerbox containing a filter paper and 30 mL of water. The gerboxes were covered and incubated in growth chambers at 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35°C for 6, 12, 24, 36 and 48 hours. Germination percentage was calculated through observation of 100 conidia per aliquot. For mycelial growth trials, mycelial plugs from the edges of respective colonies were transferred to the center of petri dishes containing PDA. The dishes were incubated in growth chambers at 10, 15, 20, 25, 30 and 35°C until complete colonization of the isolate at one temperature. Evaluation was done by taking diameter measures of colonies daily. At the end of this trial, mycelial plugs next to the center of colonies were put in tubes with water, shaken in a vortex and removed. Sporulation was estimated in a hemocytometer. Sensitivity of isolates to the iminocadine fungicide was also evaluated. Mycelial plugs from the edge of colonies were transferred to PDA and 1, 10, 100 and 1000ppm of the active ingredient were added, together with a control treatment. Colony diameters were measured daily and sporulation was estimated at the end of the trial. The favorable temperature range for conidia germination of *M. laxa* varied from 5 to 30°C, which was greater than the favorable temperature range of *M. fructicola*, from 10 to 30°C. The wetness period showed no influence on conidia germination. Mycelial growth of both species occurred in a wide range of temperature, including all temperatures studied. Maximum mycelial growth was observed at 20 to 25°C both for *M. fructicola* and for *M. laxa*. Sporulation of *M. laxa* showed an inverse relationship to the incubation temperature. No relationship between temperature and conidia production was found for *M. fructicola*. The iminocadine molecule was efficient in controlling both species *in vitro*, in concentrations of 100ppm or more for *M. fructicola* and 10ppm or more for *M. laxa*.

Keywords: Germination; Growth; Sporulation; Temperature; Brown rot

2.1 Introdução

A ocorrência da podridão parda foi pioneiramente relatada no século XVI, causando problemas em frutos no continente europeu (BYRDE; WILLETTS, 1977) e atualmente é um dos principais problemas no cultivo de fruteiras de caroço em todas

as regiões produtoras do mundo (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995). No Brasil, somente *M. fructicola* era relatada como agente causal da doença até recentemente, quando foi constatada a presença de *M. laxa* no País (SOUZA et al., 2008).

Estudos sobre a epidemiologia de *M. fructicola*, até então a única espécie presente no Estado de São Paulo, já se faziam necessários, pois, embora estudos dessa natureza já tenham sido desenvolvidos desde a década de 40 (WEAVER, 1950), isolados oriundos de regiões tropicais e subtropicais nunca foram levados em consideração. Além disso, os resultados dos trabalhos realizados nessa época com as principais espécies causadoras da podridão parda, que buscavam determinar as melhores condições de temperatura e umidade relativa, principalmente, para o desenvolvimento *in vitro* dos patógenos, muitas vezes, divergiam. Isto foi atribuído ao fato de equipamentos utilizados para a manutenção de temperaturas acuradas ainda não estarem disponíveis para a execução desses trabalhos (BYRDE; WILLETTS, 1977).

Frente à detecção de *M. laxa* causadora da doença em território nacional e à carência de informações epidemiológicas sobre isolados de origem tropical, este trabalho foi proposto, a fim de comparar o comportamento *in vitro* dos dois agentes causais da podridão parda do pessegueiro encontrados no Brasil.

2.2 Revisão bibliográfica

A podridão parda é uma das mais importantes doenças de espécies de *Prunus*, tanto em plantios comerciais como em pós-colheita em todas as regiões produtoras do mundo. Os primeiros problemas com podridão parda em frutos foram relatados em 1796, no continente europeu e eram associados ao fungo denominado *Torula fructigena* (BYRDE; WILLETTS, 1977). Apenas no século XX, o gênero do patógeno foi alterado para *Monilinia* e a ocorrência da doença passou a ser atribuída à presença de três espécies deste novo gênero: *M. fructicola* (G. Winter) Honey, *M. laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey e *M. fructigena* Honey. Em 2002, isolados identificados como *Monilinia fructigena* no Japão foram reclassificados em uma nova espécie, *Monilia polystroma* G. Leeuwen (LEEUWEN et al., 2002) e em 2004, *Monilia mumecola* Y. Harada, Y. Sasaki & T. Sano foi descrita também no Japão, causando podridão parda em abricó (HARADA et al., 2004).

As três espécies originalmente descritas como causadoras da podridão parda estão mundialmente distribuídas nas áreas produtoras de rosáceas de caroço. *M. fructigena* ocorre em pomáceas e rosáceas na Europa, tendo sido eliminada da América do Norte. *M. laxa* é espécie que causa a maior quantidade de perdas na Europa, e também pode ser encontrada na África do Sul, no Chile, no Iraque e nos Estados Unidos. *M. fructicola* já foi encontrada nos Estados Unidos, no Canadá, na Austrália, na Nova Zelândia e no Japão, além de países da América do Sul (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995). No Brasil, a única espécie relatada como agente causal da podridão parda em *Prunus* era *M. fructicola* (MARTINS et al., 2005). No entanto, recentemente foi constatada a presença de *M. laxa* causando podridão em frutos de pessegueiro no País (SOUZA et al., 2008).

O gênero *Monilinia* pertence à classe dos Ascomycetos e à ordem Helotiales, cujas características são a formação de apotécios e escleródios. A fase reprodutiva assexuada dos fungos do gênero recebe o nome de *Monilia*. A diferenciação entre as espécies do gênero na fase assexuada, através dos conídios, é difícil de ser realizada, pois os conídios de todas as espécies de *Monilia* são limoliformes e hialinos, produzidos em cadeia. Apenas o tamanho dos esporos é variável entre espécies, embora a variação intraespecífica seja muito grande. *M. fructicola* forma conídios que medem de 15 a 25 x 8 a 14 μm , *M. laxa* forma conídios de 5 a 23 x 4 a 16 μm e *M. fructigena* forma conídios de 12 a 34 x 9 a 15 μm (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995).

Frente à necessidade de identificação do agente causal e à dificuldade da diferenciação através dos conídios e da diagnose através de sintomas e sinais destes patógenos (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995), métodos de diferenciação entre as espécies baseados em meios seletivos ou morfologia foram propostos. Antes do surgimento de métodos moleculares com essa finalidade, a inoculação de pêras maduras era usada para diferenciar *M. fructicola* de *M. laxa*, por exemplo, uma vez que a esporulação de *M. fructicola* é abundante nesse fruto enquanto que a esporulação de *M. laxa* é esparsa (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995). Baseado exclusivamente na morfologia das colônias, Lane (2002) propôs uma chave dicotômica para separar as três espécies de maior importância, pois cor da colônia, taxa de crescimento, formato das margens e da colônia em si, são diferentes nas três espécies do gênero. De acordo com essa chave, *M. laxa* caracteriza-se por coloração da superfície da colônia cinza (ou branca), ocorrência de margens

lobadas, esporulação esparsa e sem a ocorrência de anéis concêntricos, colônia, geralmente, em forma de roseta – formando diferentes níveis de camada de micélio – e taxa de crescimento em BDA baixa, inferior a 70 mm após 10 dias de incubação a 22°C num regime de luz de 12 horas. *M. fructicola* caracteriza-se por coloração cinza na parte superior da colônia, ausência de margens lobadas, sem aspecto de rosetas, esporulação abundante, geralmente, na forma de anéis concêntricos e rápido crescimento em BDA, superior a 80 mm, nas mesmas condições de incubação. *M. fructigena* caracteriza-se por coloração amarelada (ou branca) da superfície da colônia, crescimento médio em BDA entre 70 e 80 mm, nas mesmas condições de incubação, esporulação esparsa na ausência de anéis concêntricos, margens não lobadas da colônia e sem aparência de rosetas. Segundo o autor, a esporulação abundante em anéis concêntricos ou esparsa sem a formação desses anéis e a ocorrência de margens lobadas foram as melhores características para se distinguir morfológicamente *M. fructicola* de *M. laxa*.

Com o advento e a popularização de métodos moleculares para a identificação de espécies patogênicas, técnicas como RFLP e PCR passaram a fazer parte do diagnóstico desses patógenos. Sequências de primers específicos para diferenciar *M. fructicola* de *M. laxa* foram desenhadas e têm sido usadas com sucesso (BOEHM; MA; MICHAILIDES, 2001; CÔTÉ; TARDIF; MELDRUM, 2004). Aliado a esses fatores, a confiança unicamente em caracteres morfológicos não têm obtido total sucesso na diferenciação dos isolados brasileiros (L. L. MAY-DE-MIO - comunicação pessoal).

A observação de características morfológicas diferentes das normalmente observadas nos isolados do país, como margens lobadas e aspecto de roseta, foram observadas em um isolado proveniente de pêsego sintomático recebido na Clínica Fitopatológica da ESALQ e mantido em laboratório. A semelhança dessas características morfológicas observadas com aquelas descritas para *M. laxa* por Lane (2002) levou a uma desconfiança inicial de se tratar de uma espécie quarentenária no Brasil. Para a confirmação desta hipótese, foram utilizados métodos moleculares na identificação do patógeno. Resultados positivos para *M. laxa* foram obtidos em análises de RFLP e em PCR com primers específicos (CÔTÉ; TARDIF; MELDRUM, 2004) para este isolado (SOUZA et al., 2008).

Estudos epidemiológicos já se faziam necessários para determinar as condições favoráveis ao desenvolvimento de *M. fructicola*, pois embora muitos

estudos dessa natureza já tenham sido realizados (BYRDE; WILLETTS, 1977), isolados provenientes de regiões subtropicais, com condições ambientais bem diferentes das condições temperadas, nunca foram estudados em seus requerimentos, principalmente, de temperaturas e duração do molhamento, durante o seu ciclo. No entanto é sabido que isolados de diferentes regiões geográficas têm diferentes preferências e que a diferença na especificidade patogênica entre *M. laxa* e *M. fructicola* pode estar relacionada com temperatura e umidade (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995).

O efeito de variáveis ambientais, principalmente da temperatura e do período de molhamento, no crescimento *in vitro* desses patógenos é estudado há décadas. Em ampla revisão, Weaver (1950) discutiu trabalhos realizados entre 1939 e 1942, relatando o efeito da temperatura na germinação, no crescimento e na esporulação de *M. fructicola*. Conídios de *M. fructicola* (*Sclerotinia fructicola*, na época) germinaram quando colocados em água em lâminas de vidro, mas não germinaram quando colocados secos. A germinação ocorreu entre 5 e 30°C, com maior porcentagem na faixa de 20 a 25°C. Crescimento micelial em BDA, ocorreu na faixa de temperatura de 5 a 30°C, com a maior taxa de crescimento observada a 25°C, diminuindo a 30°C. A 35°C não foi observado crescimento. Também se observou que abaixo de 93% de umidade relativa o crescimento era retardado. A esporulação também foi favorecida pelas mesmas condições do crescimento micelial.

Porém, nem todos os trabalhos realizados nessa época chegavam aos mesmos resultados, pois a manutenção de temperaturas acuradas para a realização desses estudos só se tornou possível mais tarde, na década de 60, devido à disponibilização de equipamentos específicos para este fim. Além disso, a interação entre temperatura e outros fatores externos ou internos pode ter interferido nos resultados obtidos (BYRDE; WILLETTS, 1977).

Requerimentos de temperatura parecem diferir, em alguns aspectos, entre *M. fructicola* e *M. laxa*, pois o frio pode interferir menos ou até favorecer seu desenvolvimento (MASRI, 1967). O máximo crescimento *in vitro* da espécie *M. laxa*, isolada de cereja, ocorre na temperatura de 25°C, embora o crescimento do fungo ocorra na faixa de 2,5 a 31°C (TAMM; FLÜCKIGER, 1993). Outros autores, estudando isolados de nectarina, relatam que é possível que *M. laxa* cresça em temperatura menor ou igual a 0°C, embora o crescimento seja consideravelmente retardado (TIAN; BERTOLINI, 1999). A esporulação de *M. laxa*, no entanto, é

favorecida por temperaturas baixas. Temperaturas maiores que 20°C diminuíram significativamente a produção de conídios do patógeno (TAMM; FLÜCKIGER, 1993). A germinação de conídios de *M. laxa* em BDA foi observada até mesmo em -4°C, temperatura inferior à mínima para crescimento micelial (TIAN; BERTOLINI, 1999). Em condições ideais de temperatura, a germinação dos conídios é bastante rápida. Conídios colocados em água livre germinaram logo após 2 horas de incubação, atingindo 98% após 12 horas no intervalo de 15 a 25°C (TAMM; FLÜCKIGER, 1993).

A rápida germinação de conídios também foi relatada, *in vitro*, para *M. fructigena*, cujos conídios germinaram em porcentagens similares após 4 ou 24 horas, se mantidos em 100% de umidade relativa (XU et al., 2001).

O controle desses patógenos não é conseguido somente pela adoção de práticas que visem reduzir o inóculo inicial, embora esta seja a primeira medida a ser tomada (MARTINS et al., 2005). Devido ao prejuízo ocasionado pela doença no decorrer da safra e à ampla distribuição geográfica dos seus agentes causais, as empresas de agroquímicos desenvolveram produtos para o controle da doença, tornando o uso de fungicidas um dos métodos mais eficientes para o controle da podridão parda.

O controle *in vitro* consiste na primeira fase da avaliação da eficiência do princípio ativo do produto no controle de patógenos, pois assim pode-se saber o efeito da molécula no desenvolvimento do agente patogênico de forma rápida, sem a necessidade do cultivo do hospedeiro e utilizando pouco espaço. Somente com resultados positivos gerados nesta fase, os testes seguirão para as próximas fases, buscando verificar a eficiência do princípio ativo no controle do patógeno e na presença do hospedeiro.

No Brasil, os princípios ativos registrados para o controle da podridão parda pertencem a vários grupos químicos, como dicarboximidas, cloroaromáticos, triazóis, quinonas, ditiocarbamatos, fenilpiridinilaminas, fungicidas inorgânicos e guanidinas (AGROFIT, 2008). Dentre esses grupos químicos registrados, um princípio ativo do grupo das guanidinas, iminoctadina tris albesilate, tem se destacado no controle de *M. fructicola* (MOREIRA et al., 2002) por meio de pulverizações na florada e na pré-colheita. Como membro deste grupo químico, a iminoctadina tem como características ser um fungicida de contato, usado de forma protetora, cujo modo de ação é a inibição da biossíntese de lipídios da membrana celular, causando alteração na sua permeabilidade e levando a célula fúngica à morte. Não é um

produto fitotóxico ao pessegueiro, porém é classificado como muito perigoso ao ambiente e extremamente tóxico aos humanos, sem relatos de atividade mutagênica, no entanto.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Avaliação do efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de conídios de *M. fructicola* e *M. laxa* in vitro

Quatro isolados de *M. fructicola* provenientes das principais regiões produtoras do Estado de São Paulo (Jarinú e Paranapanema) e um isolado de *M. laxa*, proveniente de frutos produzidos em Jundiaí, SP, mantidos no laboratório de Epidemiologia da ESALQ/USP foram cultivados em Batata-Dextrose-Ágar (BDA), meio de cultura favorável ao crescimento e esporulação do fungo.

A partir das culturas puras, foram feitas suspensões de conídios, separadamente para cada isolado, adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada à colônia. A concentração final de cada suspensão foi ajustada para 10^4 conídios/mL, com auxílio de hemocitômetro. Três alíquotas de 40 μ L de cada suspensão foram pipetadas e depositadas em placas de poliestireno, equidistantes entre si e da borda da placa. Cada placa fechada foi colocada em uma caixa de gerbox tampada, contendo uma folha de papel de filtro e 30 mL de água destilada. Os gerbox, contendo as placas, foram mantidos em câmaras de crescimento (Incubadora B.O.D/Fotoperíodo, modelo AC 71) ajustadas nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C, sob luz contínua durante 6, 12, 24, 36 e 48 horas (Figura 1). Para facilitar a avaliação, o processo de germinação foi interrompido adicionando-se uma gota de lactoglicerol sobre cada gota de cada suspensão fúngica, depositando-se, posteriormente, uma lamínula de microscopia óptica sobre cada gota.

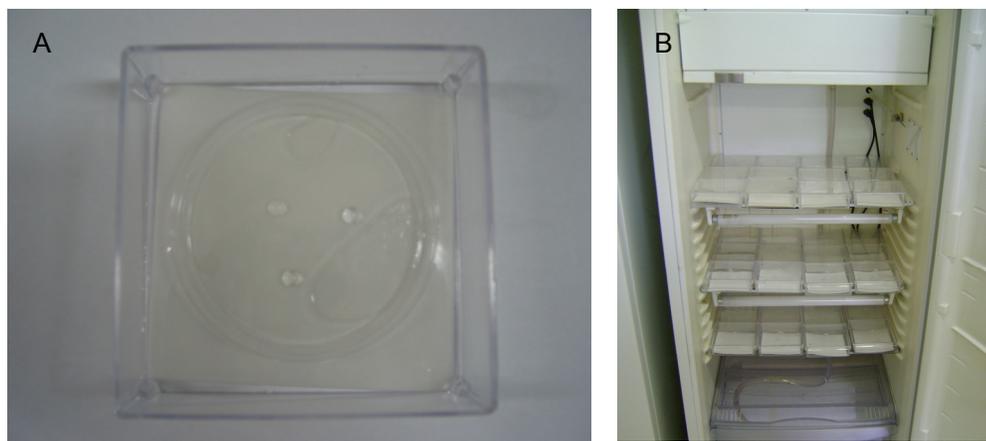


Figura 1 - Gerbox contendo placa com as gotas de suspensão de conídios (A) e vista dos tratamentos em uma temperatura (B)

A avaliação consistiu na contagem dos 100 primeiros conídios encontrados em cada gota, visualizados sob microscópio óptico em aumento de 400 vezes. Considerou-se germinado o conídio que apresentou tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao seu comprimento.

Foram utilizadas três placas (repetições) por tratamento, com três gotas cada uma, totalizando nove gotas avaliadas. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. O experimento foi repetido uma vez.

2.3.2 Avaliação do efeito da temperatura na taxa de crescimento micelial e na esporulação das colônias de *M. fructicola* e *M. laxa* in vitro

Discos de micélio dos mesmos isolados utilizados para a avaliação da germinação com 0,5 cm de diâmetro, provenientes de colônias com 7 dias de idade, foram repicados para o centro de placas de Petri Pirex com meio BDA, as quais foram colocadas em câmaras de crescimento ajustadas nas temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C, sob fotoperíodo de 12 horas. Em cada câmara foram colocadas cinco placas (repetições) de cada isolado.

A avaliação foi feita diariamente através do diâmetro das colônias, determinado por meio da média de duas medidas perpendiculares. O término das avaliações, para cada isolado, ocorreu após a primeira colônia atingir 9 cm de diâmetro, mesma medida do diâmetro da placa.

Ao término da avaliação do crescimento micelial, estimou-se a esporulação de cada placa colonizada. Para isso, discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro, a aproximadamente 1 cm do centro da colônia foram retirados das placas e colocados em tubos de ensaio com 5 mL de água esterilizada e 1 gota de tween. Os tubos foram agitados em vortex por 30 segundos e 2 gotas de lactoglicerol foram colocadas em cada um, após agitação. Os discos de micélio foram retirados dos tubos e a concentração dos conídios foi estimada através da média de três contagens realizadas em hemocitômetro.

O experimento teve delineamento inteiramente casualizado e foi realizado duas vezes.

2.3.3 Avaliação da sensibilidade de isolados de *M. fructicola* e *M. laxa* à molécula iminocadina *in vitro*

A sensibilidade dos cinco isolados à molécula iminocadina, fungicida do grupo das guanidinas, registrado no Brasil sob o nome comercial de Bellkute foi avaliada *in vitro*. Foram testadas as concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ppm do princípio ativo, comparadas com um tratamento controle, sem adição do fungicida. A concentração desejada do fungicida foi adicionada ao meio BDA fundente, só então vertido para placas de Petri Pirex. Discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro, obtidos dos bordos de colônias puras de 7 dias de idade, foram transferidos para o centro de placas contendo somente o meio de cultura ou o meio de cultura acrescido do fungicida, de acordo com o tratamento. As placas ficaram incubadas a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada da mesma forma que no experimento de crescimento micelial, até a colonização da placa por completo. Após o crescimento da colônia por toda a placa avaliou-se a esporulação dos isolados, realizada da mesma maneira descrita no item anterior. Este experimento teve uma repetição no tempo.

2.3.4 Análise dos dados

O efeito da temperatura na germinação de conídios e no crescimento micelial de cada isolado de *Monilinia sp.* foi analisado por meio de regressões não-lineares utilizando o modelo beta: $Y=b_1*((T-b_2)^{b_3})*((b_4-T)^{b_5})$, onde Y representa a proporção de conídios germinados ou o diâmetro final da colônia (cm), T é a temperatura (°C) a que os conídios ou a colônia foram submetidos, b_2 e b_4 correspondem às temperaturas mínima e máxima, respectivamente, b_5 representa a amplitude do patamar da curva e b_1 e b_3 são parâmetros do modelo (HAU; KRANZ, 1990). As análises foram realizadas com o auxílio do programa STATISTICA 6.0 (Statsoft, Tulsa).

A análise conjunta do efeito das variáveis ambientais (temperatura e molhamento) na germinação de conídios foi realizada utilizando-se o modelo beta-monomolecular, obtido pela multiplicação dos modelos beta e monomolecular: $Z=(b_1*(T-b_2)^{b_3}*(b_4-T)^{b_5}*(1-b_6*\exp(-b_7*M)))$, onde Z representa a proporção de conídios germinados, T corresponde à temperatura de incubação (°C), M corresponde ao período de molhamento (horas), b_2 e b_4 correspondem às temperaturas mínima e máxima, respectivamente, b_5 representa a amplitude do patamar da curva, b_8 está relacionado à velocidade de aumento da variável dependente em função do molhamento e b_1 , b_3 , b_6 e b_7 são parâmetros do modelo.

O efeito da temperatura na esporulação de *M. laxa* foi analisado por meio de regressão não-linear utilizando-se o modelo exponencial negativo (ZAR, 1999): $Y=b_1*\exp(-b_2*T)$, onde Y é o número de conídios produzidos em 0,5 cm² de colônia, T corresponde à temperatura onde as colônias permaneceram (°C), b_1 representa a produção de conídios quando a temperatura for igual a zero e b_2 está relacionado à taxa de redução de conídios à medida que a temperatura aumenta. Para os isolados de *M. fructicola* a esporulação foi avaliada pela comparação da produção média de conídios dos isolados em cada temperatura, utilizando o Teste de Duncan, a 5% de probabilidade, realizado no programa PLOT-IT.

A sensibilidade dos isolados ao fungicida iminoctadina foi analisada de maneira semelhante à esporulação de *M. laxa*, através do mesmo modelo, exponencial negativo.

O ajuste dos modelos foi verificado através dos coeficientes de determinação (R^2) e da presença ou não de padrões nos resíduos. Os dados das duas repetições

de cada experimento foram analisados de forma conjunta, devido à baixa variabilidade observada entre as repetições. A comparação entre os parâmetros dos modelos de regressão obtidos pelo ajuste das equações aos diferentes isolados foi feita pelo teste “t”.

2.4 Resultados

2.4.1 Efeito da temperatura e da duração do molhamento na germinação de conídios de *M. fructicola* e *M. laxa in vitro*

A faixa de temperatura ótima para germinação de *M. fructicola* foi ampla, variando de 10 a 30°C, com taxas de germinação, geralmente, superiores a 75%, principalmente no intervalo de 15 a 25°C (Figuras 2A – 2L). As temperaturas de 10 e 30°C combinadas com o molhamento de 6 horas resultaram em uma porcentagem de germinação inferior, que variou de acordo com o isolado estudado (Figuras 2A, 2D, 2G e 2J). Nos demais períodos de molhamento a porcentagem de germinação foi elevada, superior a 75%. A 5°C, com 6 e 12 horas de molhamento, a porcentagem de germinação foi inferior a 25%, para todos os isolados. No entanto, dois isolados (A e B), apresentaram mais que 50% de conídios germinados nessa temperatura quando o molhamento foi de 24 horas (Figuras 2C e 2F); os outros dois pouco germinaram (C e D), mesmo sob 48 horas de molhamento (Anexo B). O modelo Beta estimou a temperatura mínima, para todos os isolados, muito próxima a 5°C sob 6 e 12 horas de molhamento; sob 24 horas, as temperaturas mínimas estimadas pelo modelo para os isolados A e B foram 2,5 e 3,3°C, mas não houve diferença significativa quando comparadas a 5°C, temperatura mínima estimada para os isolados C e D (Tabela 1).

A 35°C, temperatura máxima estimada pelo modelo, a porcentagem de germinação foi muito baixa ou nula para todos os isolados, em todos os períodos de molhamento. A exceção foi o isolado B, onde a temperatura máxima de germinação foi estimada em 30°C para 6 horas de molhamento. Nesta situação, a temperatura foi significativamente inferior à estimada para os demais isolados (35°C), evidenciando-se a variabilidade existente dentro da espécie (Figura 2D, Tabela 1).

Nos demais molhamentos, a temperatura máxima estimada do isolado B se igualou à dos demais isolados, em 35°C.

M. laxa comportou-se de forma diferente para alguns parâmetros. A temperatura mínima de germinação, estimada em 0°C (Tabela 1), foi significativamente diferente da estimada para *M. fructicola* (5°C), quando submetida a 12 horas de molhamento (Figura 2N). No entanto, a mesma temperatura mínima estimada de 0°C não diferiu estatisticamente de *M. fructicola*, a 24 horas de molhamento. Para o molhamento de 6 horas, não houve diferença de comportamento entre os patógenos, embora *M. laxa* tenha apresentado porcentagem média de germinação próxima a 25% a 5°C (Figura 2M).

A temperatura máxima encontrada para *M. laxa* não foi significativamente diferente daquela encontrada para *M. fructicola*, 35°C, em todos os molhamentos estudados. O parâmetro b_5 também não apresentou diferenças significativas entre as espécies, para nenhuma combinação temperatura-molhamento testada, indicando que as condições ótimas de germinação são igualmente amplas para os patógenos (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros e erros (entre parênteses) das curvas de germinação dos isolados de *M. fructicola* (A-D) e *M. laxa* (E) para períodos de molhamento de 6, 12 e 24 horas, gerados pelo modelo Beta. Média de dois experimentos

| Molh. (horas) | Isolado | b_1 | b_2 | b_3 | b_4 | b_5 | R ² |
|---------------|---------|--------------|----------------|---------------|---------------|--------------|----------------|
| 6 | A | 0,04 (0,057) | 4,99 (0,038) | 0,54 (0,261) | 35,00 (0,018) | 0,52 (0,258) | 0,67 |
| | B | 0,02 (0,036) | 4,65 (1,648) | 1,03 (0,438) | 30,01 (0,034) | 0,37 (0,264) | 0,81 |
| | C | 0,11 (0,095) | 4,99 (0,060) | 0,43 (0,210) | 35,00 (0,000) | 0,31 (0,191) | 0,80 |
| | D | 0,07 (0,060) | 4,99 (0,006) | 0,371 (0,160) | 35,00 (0,026) | 0,56 (0,190) | 0,86 |
| | E | 0,09 (0,091) | 4,01 (1,426) | 0,526 (0,216) | 35,00 (0,002) | 0,27 (0,137) | 0,84 |
| 12 | A | 0,06 (0,029) | 4,94 (0,069) | 0,49 (0,085) | 35,00 (0,000) | 0,52 (0,087) | 0,94 |
| | B | 0,04 (0,083) | 8,23 (2,906) | 0,53 (0,458) | 35,00 (0,033) | 0,66 (0,309) | 0,77 |
| | C | 0,17 (0,021) | 4,99 (0,065) | 0,41 (0,045) | 35,00 (0,000) | 0,22 (0,035) | 0,95 |
| | D | 0,07 (0,587) | 5,00 (16,214) | 0,46 (1,380) | 35,0 (15,028) | 0,51 (1,387) | 0,53 |
| | E | 0,10 (0,045) | -0,001 (0,003) | 0,48 (0,099) | 35,00 (0,000) | 0,31 (0,068) | 0,98 |
| 24 | A | 0,11 (0,078) | 3,53 (1,602) | 0,39 (0,172) | 35,17 (0,239) | 0,39 (0,068) | 0,84 |
| | B | 0,08 (0,112) | 2,27 (3,865) | 0,46 (0,326) | 35,00 (0,000) | 0,41 (0,162) | 0,82 |
| | C | 0,19 (0,036) | 4,97 (0,111) | 0,36 (0,077) | 35,00 (0,000) | 0,19 (0,065) | 0,84 |
| | D | 0,05 (0,023) | 4,96 (0,081) | 0,59 (0,082) | 35,00 (0,000) | 0,49 (0,082) | 0,95 |
| | E | 0,10 (0,152) | -0,001 (6,084) | 0,48 (0,347) | 35,00 (0,000) | 0,31 (0,123) | 0,88 |

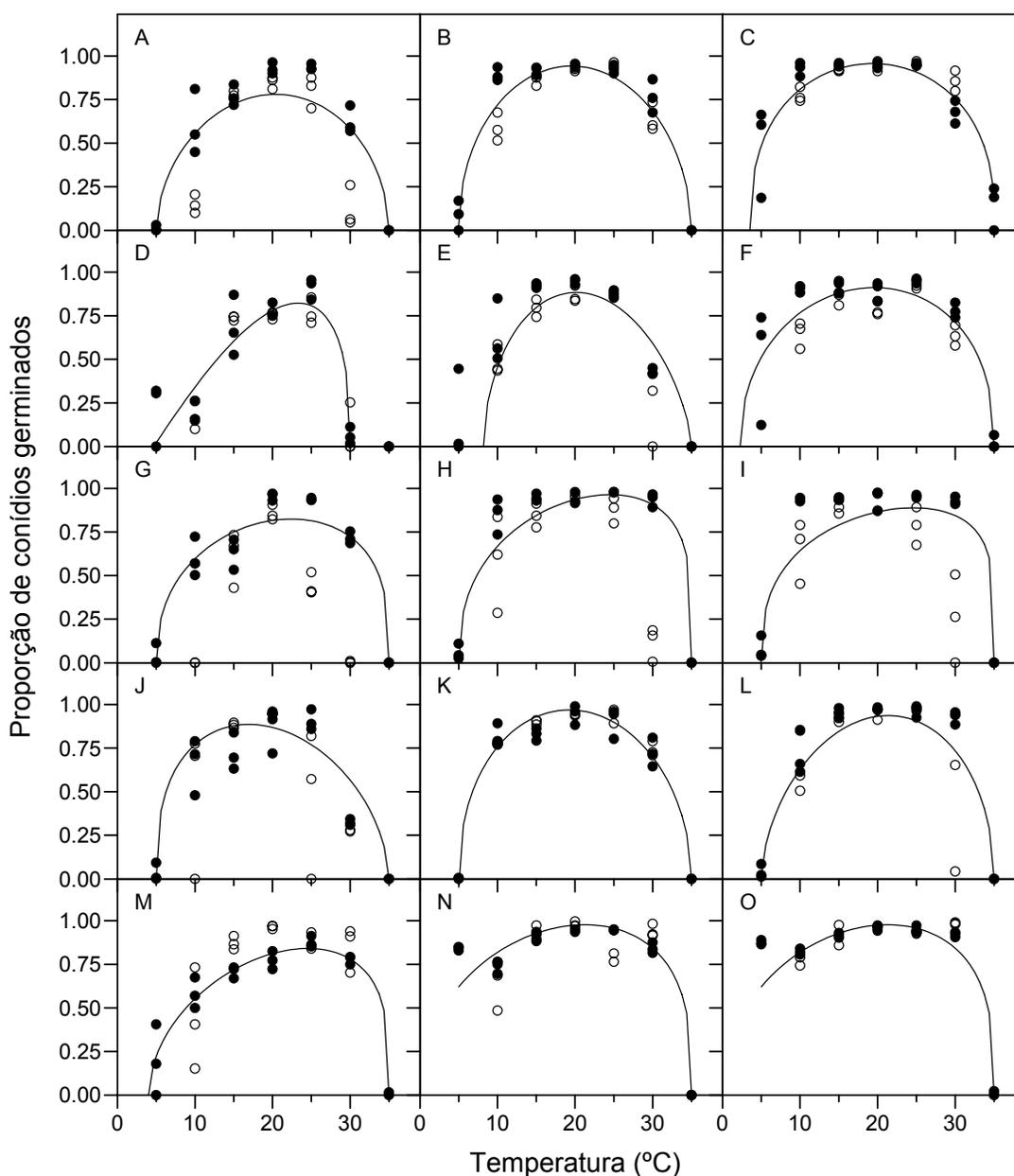


Figura 2 – Curvas ajustadas para a proporção de conídios germinados em função das temperaturas para os isolados A (A – C), B (D- F), C (G – I) e D (J – L) de *M. fructicola* e para o isolado E, de *M. laxa* (M – O). Os períodos de molhamento correspondentes a 6 horas estão representados nas figuras A, D, G, J e M, os de 12 pelas figuras B, E, H, I e N e os de 24 horas pelas figuras C, F, I, L e O. Símbolos brancos representam as médias do primeiro experimento e símbolos pretos representam as médias do segundo experimento

As curvas em função da temperatura para os molhamentos de 36 e 48 horas não foram ajustadas pelo modelo beta devido à distribuição dos dados no intervalo estudado; a porcentagem de germinação dos conídios superior a 70% em todas as temperaturas estudadas não possibilitou estimar as temperaturas mínimas e máximas de germinação nessas condições em que os patógenos foram submetidos,

indicando que a presença de água livre por longos períodos compensa o efeito de temperaturas menos favoráveis (Anexos A e B).

Os molhamentos testados (6, 12, 24, 36 e 48 horas) não tiveram influência significativa sobre a germinação dos conídios nas temperaturas favoráveis, ou seja, tanto o menor (6 horas) como o maior molhamento (48 horas) levaram à mesma porcentagem de germinação nas temperaturas favoráveis (Figura 3). Períodos de molhamento maiores que 6 horas interferiram na germinação nas temperaturas de 10 e 30°C (temperaturas menos favoráveis), compensando o efeito desfavorável imposto por estas condições de incubação para ambos os patógenos estudados (Figura 3: A2 – E2; A6 – E6). O efeito desta variável não foi notado na temperatura de 35°C, pois a temperatura se mostrou o fator limitante à germinação (Figura 3: A7 – E7). A 5°C, o efeito de molhamentos superiores a 6 horas é nítido para *M. laxa*, cuja porcentagem de germinação passa de 20%, com 6 horas de molhamento, para 85%, com 12 horas de molhamento (Figura 3: E1). Somente dois isolados de *M. fructicola*, A e B, apresentaram porcentagens superiores a 50%, após 24 horas de molhamento, quando mantidos a 5°C (Figura 3: A1, B1). Portanto, devido à rápida germinação dos conídios, não foi possível ajustar as porcentagens de germinação em função do período de molhamento por qualquer modelo não-linear (Figura 3).

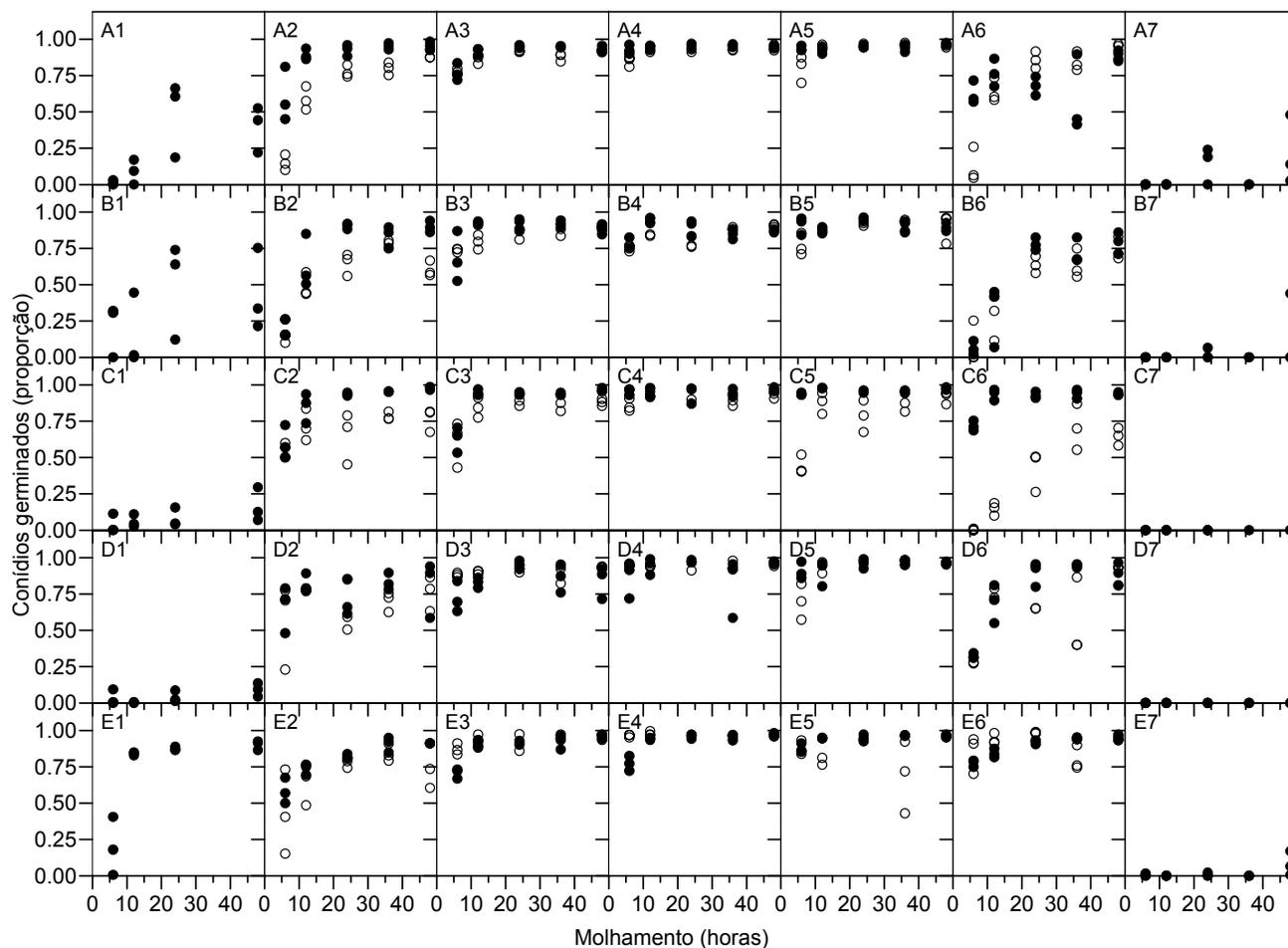


Figura 3 - Proporção de conídios germinados em função dos períodos de molhamento para os isolados de *M. fructicola* (letras A – D) e para o isolado de *M. laxa* (letra E). A temperatura correspondente a 5°C está representada nos gráficos A1 – E1; a de 10°C em A2 – E2, a de 15°C, em A3 – E3; a de 20°C, em A4 – E4; a de 25°C, em A5 – E5; a de 30°C, em A6– E6 e a de 35°C, em A7 – E7. Símbolos brancos representam as médias do primeiro experimento e símbolos pretos representam a média do segundo experimento

Unicamente o isolado B de *M. fructicola* formou apressórios na extremidade do tubo germinativo dos conídios, de formato oval (Figura 4). Esse isolado apresentou apressórios no intervalo de temperatura de 10 a 30°C e em todos os períodos de molhamento estudados.



Figura 4 - Formação de apressórios (extremidade das setas) em conídios germinados no isolado B de *M. fructicola*

O ajuste de superfícies de resposta à germinação de conídios em função da temperatura e do molhamento foi feito por espécie patogênica, devido à semelhança observada no comportamento dos isolados de *M. fructicola* (Figura 5).

À semelhança dos valores obtidos nas regressões com o modelo beta, a temperatura mínima de germinação estimada pelo modelo Beta monomolecular para *M. fructicola* foi 4,7°C e a temperatura máxima foi 35°C (Tabela 2).

Para *M. laxa*, a temperatura mínima prevista pelo modelo foi 0°C e a máxima foi 35°C. Embora a temperatura mínima varie em 5°C entre as espécies, esta variação não foi significativa, pelo teste “t” (Tabela 2).

Somente o parâmetro b_5 da equação, que está relacionado à amplitude do patamar da curva, foi significativamente diferente entre as espécies, mostrando que, ao combinar os diferentes molhamentos, a faixa favorável de temperatura é maior para *M. laxa* (Figura 6, Tabela 2).

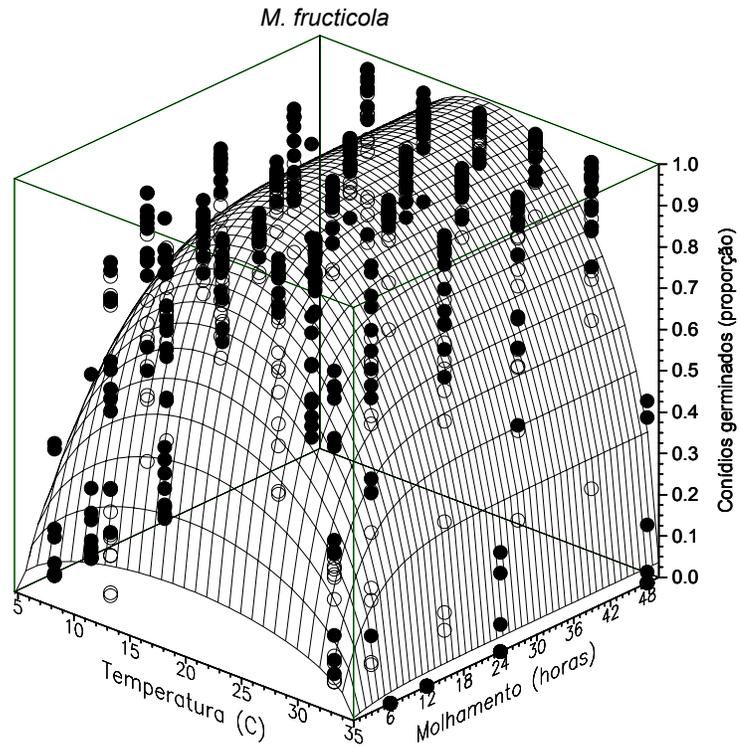


Figura 5 - Superfícies de resposta de conídios germinados (em proporção) de *M. fructicola* em função da temperatura de incubação e do período de molhamento, gerada pelo modelo beta monomolecular. Símbolos brancos representam os dados do primeiro experimento e símbolos pretos representam dados do segundo experimento

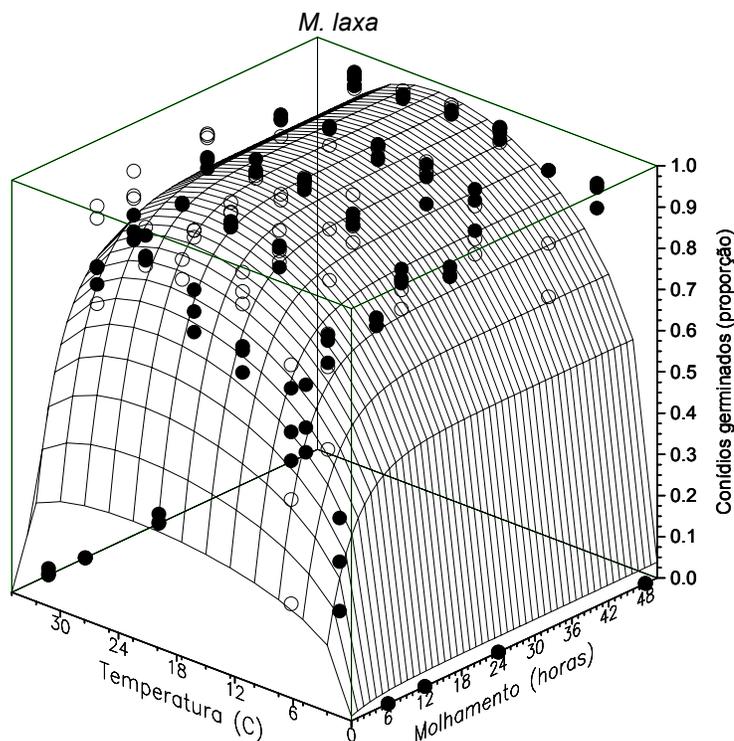


Figura 6 - Superfície de resposta de conídios germinados (em proporção) de *M. laxa* em função da temperatura de incubação e do período de molhamento, gerada pelo modelo beta monomolecular. Símbolos brancos representam os dados do primeiro experimento e símbolos pretos representam dados do segundo experimento

Tabela 2 - Parâmetros e erros (entre parênteses) das curvas ajustadas às superfícies de germinação de *M. fructicola* e *M. laxa*. Média de dois experimentos

| | <i>M. fructicola</i> | <i>M. laxa</i> |
|-------|----------------------|----------------|
| b_1 | 0,06 (0,013) | 0,21 (0,173) |
| b_2 | 4,71 (0,117) | -0,001 (4,80) |
| b_3 | 0,49 (0,041) | 0,34 (0,190) |
| b_4 | 35,01 (0,018) | 35,00 (0,000) |
| b_5 | 0,52 (0,037) | 0,18 (0,066)* |
| b_6 | 0,83 (0,215) | 0,71 (0,402) |
| b_7 | 0,20 (0,041) | 0,23 (0,092) |
| R^2 | 0,76 | 0,82 |

* Há diferença significativa entre as colunas, pelo teste t, a 5% de probabilidade.

2.4.2 Efeito da temperatura no crescimento micelial de *M. fructicola* e *M. laxa* *in vitro*

Todos os isolados de *M. fructicola* comportaram-se de forma similar, apresentando uma ampla faixa de temperatura favorável ao seu crescimento, que incluiu todas as temperaturas testadas (Anexo C). Devido à similaridade de comportamento dos isolados da espécie, os quais não diferiram entre si pelo teste “t”

nos parâmetros testados (b_2 , b_4 e b_5), o modelo foi ajustado ao conjunto de dados dos isolados, sendo representativo da espécie (Figura 7). Os diâmetros finais das colônias de *M. fructicola* aumentaram a partir de 10°C, até atingir um máximo de incremento a 20°C, quando começaram a declinar. A 35°C não houve crescimento das colônias. As temperaturas mínima e máxima estimadas pelo modelo foram 7,5°C e 30,9°C, respectivamente (Tabela 3).

O crescimento micelial de *M. laxa* foi parecido com *M. fructicola*, com os maiores diâmetros observados no intervalo entre 20 e 25°C, quando começaram a declinar (Figura 7). A 35°C o crescimento do patógeno também foi completamente inibido. A temperatura mínima estimada pelo modelo beta foi de 3,9°C e a máxima foi de 30,3°C. Embora os parâmetros encontrados para as duas espécies sejam diferentes, não foi encontrada diferença significativa pelo teste “t”.

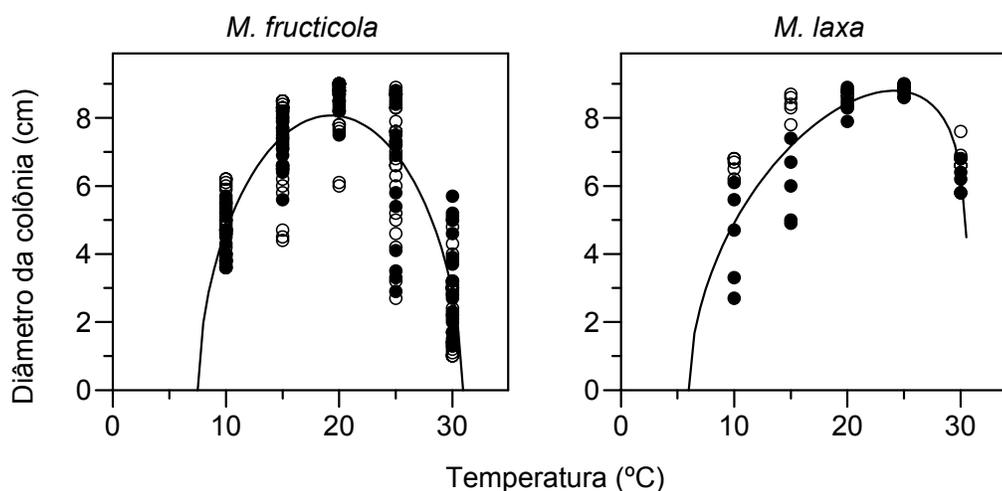


Figura 7 - Curvas geradas pelo modelo beta para o crescimento micelial *in vitro* de *M. fructicola* e *M. laxa* sob influência da temperatura. Símbolos brancos representam os diâmetros finais das colônias (cm) no primeiro experimento e símbolos pretos representam os diâmetros no segundo experimento

Tabela 3 - Parâmetros e erros (entre parênteses) para as curvas de crescimento micelial de *M. fructicola* e *M. laxa* gerados pelo modelo beta. Dados originados da média de dois experimentos

| | <i>M. fructicola</i> | <i>M. laxa</i> |
|-------|----------------------|----------------|
| b_1 | 0,53 (0,953) | 1,26 (5,934) |
| b_2 | 7,51 (2,61) | 3,90 (15,833) |
| b_3 | 0,56 (0,382) | 0,55 (1,178) |
| b_4 | 30,93 (0,874) | 30,32 (2,157) |
| b_5 | 0,55 (0,265) | 0,15 (0,391) |
| R^2 | 0,70 | 0,63 |

Os aspectos finais das colônias também apresentaram algumas diferenças, de acordo com a temperatura em que foram mantidas, principalmente para a colônia de *M. laxa* (Figura 8).

Na temperatura de 30°C, a colônia de *M. laxa* perde a característica típica do crescimento em rosetas, além de apresentar coloração mais escura (Figura 8). A coloração dos isolados de *M. fructicola* variou, de esbranquiçada a cinza escuro, conforme a temperatura a que foram submetidos, porém, de forma aleatória.

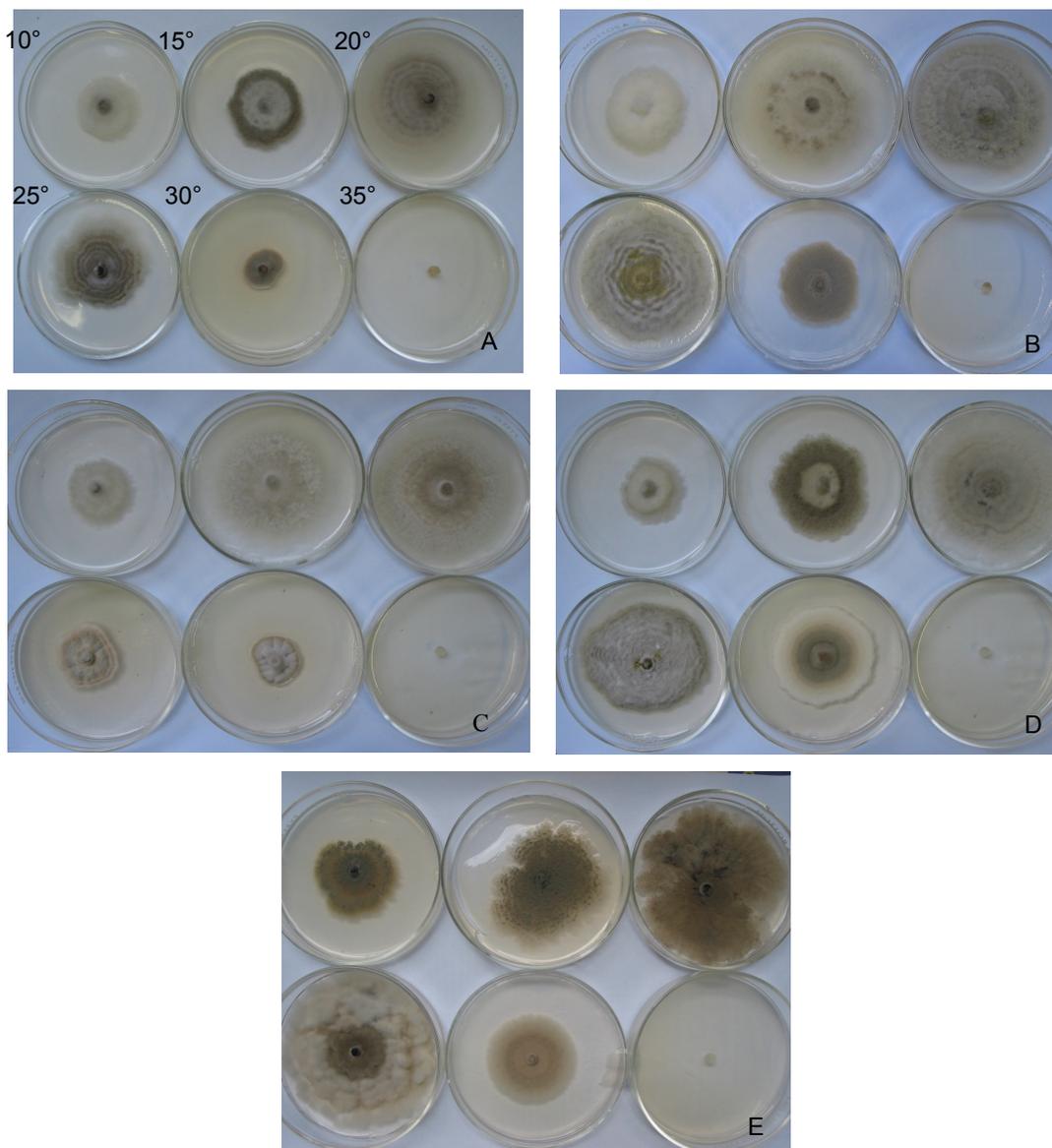


Figura 8 - Aspecto final de colônias de *M. fructicola* (A - D) e *M. laxa* (E) *in vitro*, mantidas em diferentes temperaturas

2.4.3 Efeito da temperatura na esporulação de *M. fructicola* e *M. laxa* *in vitro*

A esporulação dos isolados de *M. fructicola* não teve relação com a variação de temperatura (Figura 9A). A produção de conídios foi observada em todas as temperaturas de crescimento, porém as temperaturas de 15 e 20°C foram estatisticamente melhores que as demais, segundo o Teste de Duncan, a 5% de probabilidade (Tabela 4).

M. laxa apresentou relação inversa entre número de conídios produzidos e temperatura a que foram mantidos, ajustando-se ao modelo exponencial negativo (Figura 9B).

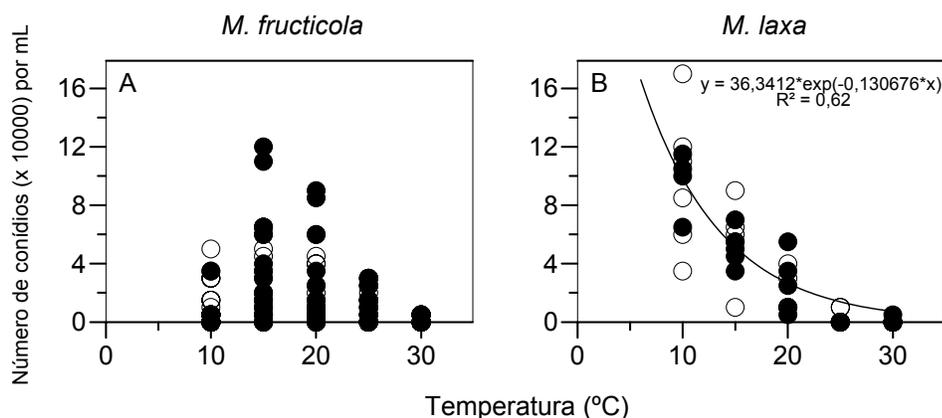


Figura 9 - Produção de conídios *in vitro* de colônias de *M. fructicola* e *M. laxa* em função das temperaturas. Símbolos brancos representam os dados do primeiro experimento e símbolos pretos representam os dados do segundo experimento

Tabela 4 - Produção de conídios *in vitro* de *M. fructicola* em diferentes temperaturas de incubação. Dados representam a média de dois experimentos

| Temperatura (°C) | Número de conídios produzidos (x 10 ⁴) /ml |
|------------------|--|
| 10 | 0,81 b ¹ |
| 15 | 2,59 a |
| 20 | 1,65 a |
| 25 | 1,06 b |
| 30 | 0,08 b |

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

2.4.4 Sensibilidade de isolados de *M. fructicola* e *M. laxa* à molécula iminoctadina *in vitro*

Todos os cinco isolados testados mostraram-se sensíveis à molécula iminoctadina, embora a sensibilidade tenha variado conforme a concentração do fungicida presente no meio de cultura.

A maior concentração testada, 1000 ppm, apresentou total controle para todos os isolados. A menor concentração testada, 1 ppm, não mostrou controle sobre nenhum dos isolados. A 10 ppm o crescimento dos isolados de ambas as espécies foi retardado.

A diferença encontrada entre as espécies foi a 100 ppm, onde o controle foi satisfatório para *M. fructicola*, reduzindo o crescimento de todos os seus isolados. Porém, esta concentração foi suficiente para inibir completamente o crescimento micelial de *M. laxa* (Figuras 10 e 11).

O modelo exponencial negativo ajustou-se bem aos dados, porém as curvas não foram representadas na Figura 10 devido à escala do eixo x, logarítmica, que não permite boa visualização do ajuste. Os parâmetros analisados mostraram algumas diferenças pelo teste “t”, entre as espécies e entre os isolados de *M. fructicola* (Tabela 5).

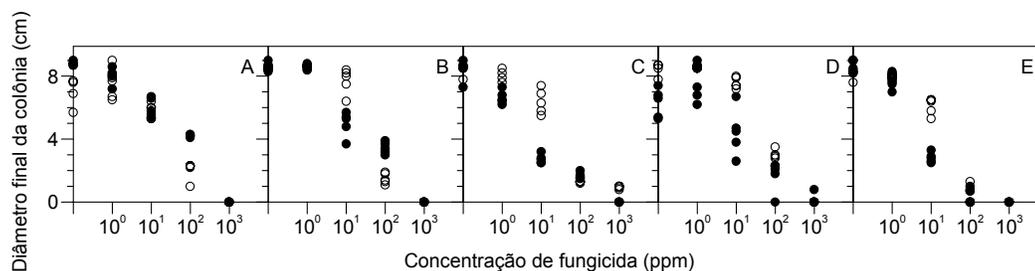


Figura 10 - Crescimento micelial de *M. fructicola* (A – D) e *M. laxa* (E) em diferentes concentrações (ppm) do fungicida iminoctadina. Símbolos brancos representam os dados do primeiro experimento e símbolos pretos representam os dados do segundo experimento

Tabela 5 – Parâmetros e erros (entre parênteses) do modelo exponencial negativo ajustados aos dados de crescimento micelial *in vitro* de *M. fructicola* (A – D) e *M. laxa* (E) e coeficientes de determinação do ajuste em diferentes concentrações de fungicida. Dados representam a média de dois experimentos

| | A | B | C | D | E |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| b_1 | 7,52 (0,193) | 8,27 (0,196) | 8,06 (0,308) | 7,45 (0,246) | 8,34 (0,190) |
| b_2 | 0,01 (0,001) | 0,01 (0,001) | 0,06 (0,009) | 0,11 (0,002) | 0,05 (0,006) |
| R^2 | 0,91 | 0,92 | 0,87 | 0,87 | 0,96 |

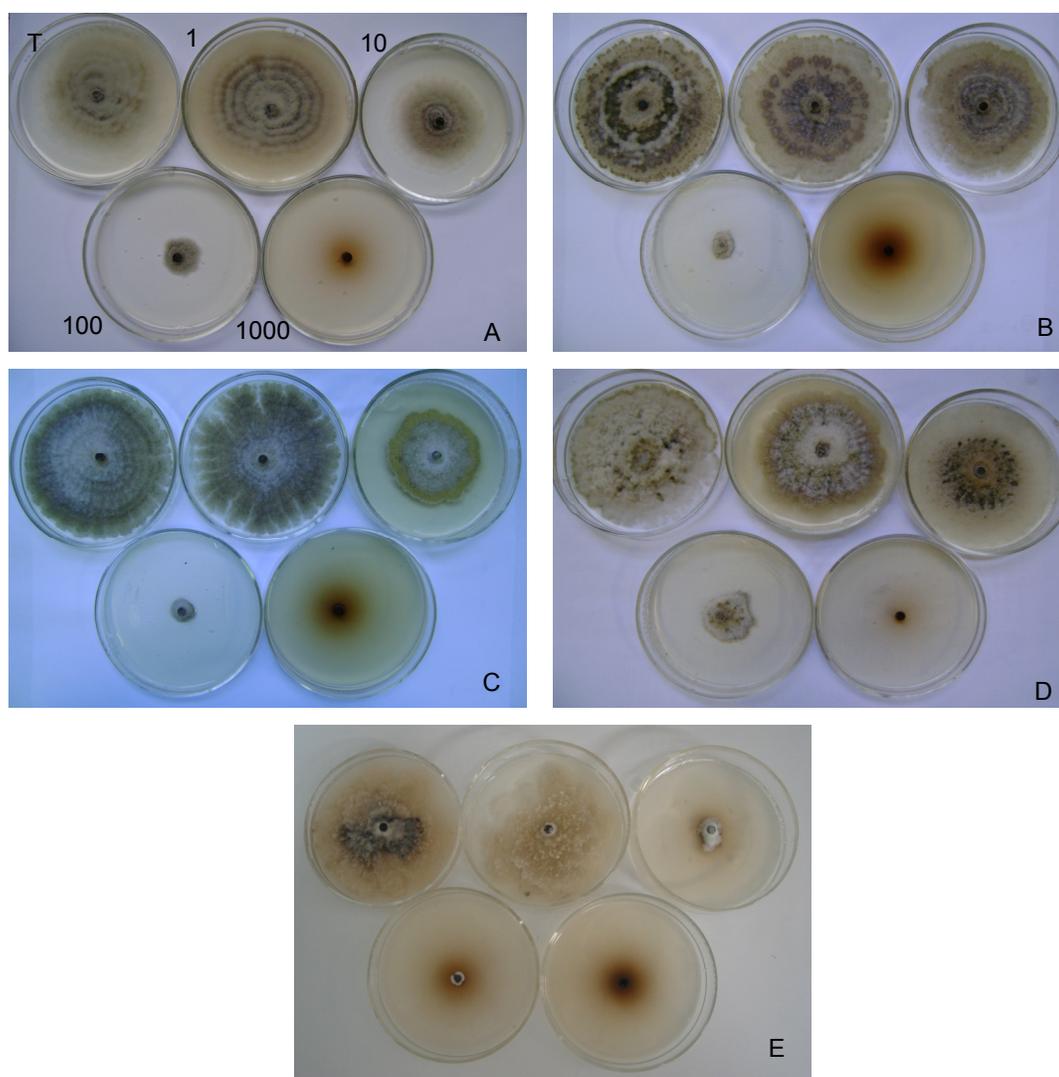


Figura 11 - Aspectos das colônias de *M. fructicola* (A - D) e *M. laxa* (E) na presença de fungicida. Os tratamentos foram: testemunha (sem fungicida), 1, 10, 100 e 1000 ppm

A esporulação dos isolados não apresentou relação com a concentração do fungicida (Tabela 6).

Tabela 6 - Produção média de conídios ($\times 10^4$ /mL) nas diferentes concentrações de fungicida testadas (ppm) para os isolados de *M. fructicola* (A - D) e *M. laxa* (E)

| | A | B | C | D | E |
|--------------|-----|-----|------|------|---|
| Test. | 1,3 | 2,7 | 0,4 | 0,9 | 0 |
| 1 | 1,5 | 1,7 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 2 | 0,3 | 0,37 | 0,3 | 0 |
| 100 | 0 | 0 | 0 | 0,33 | 0 |
| 1000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

2.5 Discussão

De modo geral, o comportamento das duas espécies quanto à germinação dos conídios *in vitro* foi similar, com porcentagens de germinação acima de 70% no intervalo de temperatura de 10 a 30°C. Mesmo o menor molhamento testado (6 horas) foi suficiente para proporcionar taxas de germinação superiores a 50% a 10 e 30°C, o que é muito relevante para o desenvolvimento da doença em condições de campo, uma vez que este período de molhamento é facilmente alcançado em noites com orvalho. A rapidez com que ocorre o processo de germinação nessas espécies na presença de água livre é responsável pela não influência do período de molhamento a que os conídios foram submetidos (TAMM; FLÜCKIGER, 1993).

Estudos de germinação realizados com *M. fructicola* isolada de ameixa relatam 99% de germinação após 5 horas de incubação a 23°C, embora os conídios tenham sido depositados em placas com BDA acidificado (MICHAILIDES; MORGAN, 1997). Estudos semelhantes com *M. laxa* isolada de cerejas e nectarinas relatam a germinação de conídios após 2 horas de incubação, com taxas de até 98% no intervalo de temperatura de 15 a 25°C e de 90% após 6 horas de incubação a 20°C, embora os estudos tenham sido realizados em placas com ágar-nutriente (TAMM; FLÜCKIGER, 1993; TIAN; BERTOLINI, 1999). É possível que os nutrientes do meio de cultura favoreçam de alguma forma a germinação, tornando-a mais rápida do que aconteceria na ausência dos mesmos. Essa hipótese foi testada em estudos recentes (LEE; BOSTOCK, 2006) que indicam que porcentagem de germinação de conídios de *M. fructicola* é menor que 1% quando os conídios são colocados em água destilada. A adição de sacarose à suspensão de conídios aumenta a germinação para valores maiores que 95%. Este fato não foi verificado na realização deste estudo, onde o uso de água estéril não se mostrou limitante à germinação dos conídios.

A ampla faixa de germinação dos conídios mostra a boa adaptabilidade dos dois patógenos ao clima subtropical, onde a faixa de temperatura predominante a campo dificilmente sai do intervalo de 10 a 30°C, na época da safra.

Diferenças significativas, no entanto, foram observadas para a temperatura mínima de germinação, na comparação entre as duas espécies estudadas. Enquanto *M. fructicola* foi limitada na sua capacidade germinativa a 5°C, até mesmo nos maiores molhamentos, *M. laxa* não mostrou dificuldade em germinar em

qualquer temperatura, exceto a 35°C, a partir de 12 horas de molhamento, demonstrando sua habilidade em crescer em baixas temperaturas. Em países temperados, essa espécie está apta para sobreviver, crescer e até reproduzir-se em temperaturas inferiores a 5°C (TAMM; FLÜCKIGER, 1993; TIAN; BERTOLINI, 1999).

A formação de apressórios por *M. fructicola* já foi previamente relatada em folhas de *Gingko biloba*, em abricó, em superfícies artificiais e em nectarinas (ADAMS et al., 1962; WADE; NICOLLS, 1968; CRUICKSHANK; WADE, 1992; LEE; BOSTOCK, 2006). Similarmente ao comportamento de isolados de abricó estudados, conídios de um isolado de *M. fructicola* formaram apressórios simples em todas as temperaturas estudadas, porém, sem a necessidade de alterar o pH da suspensão ou de se adicionar aditivos, como feito em abricó e em placas de poliestireno (CRUICKSHANK; WADE, 1992; LEE; BOSTOCK, 2006). Os apressórios formados pelo isolado B de *M. fructicola* foram semelhantes aos relatados em abricó e em nectarina, ovais ou em formato de gancho e formados imediatamente após a germinação dos conídios (CRUICKSHANK; WADE, 1992; LEE; BOSTOCK, 2006). Diferentemente deste trabalho, no qual a formação de apressórios de *M. fructicola* ocorreu em conídios suspensos em água e imediatamente após depositados nas placas de poliestireno, a formação de apressórios pelo isolados de abricó e de nectarina foi dependente de pré-lavagem na suspensão de conídios em água e da adição de sacarose à suspensão.

A ampla faixa de temperatura que promove o crescimento micelial de *M. laxa* observada neste estudo, de 10 a 30°C, corrobora com relatos que descrevem a capacidade deste patógeno isolado de cereja e nectarina, em crescer em temperaturas até mesmo inferiores a 0°C (TAMM; FLÜCKIGER, 1993; TIAN; BERTOLINI, 1999), muito embora quando isso ocorre, a taxa de crescimento é bem mais lenta. Acima de 0°C a taxa de crescimento aumenta até atingir 25°C, quando começa a declinar novamente, como observado no presente estudo. Observou-se ainda neste trabalho, mudança no formato e na coloração da colônia de *M. laxa* incubada a 30°C, fato não reportado na literatura.

Dentro da faixa de temperatura de crescimento micelial de *M. laxa*, houve preferência do patógeno por temperaturas mais baixas para sua reprodução, mostrando uma relação inversa entre número de esporos produzidos e temperatura. Esse aspecto do monociclo coincidiu com o observado em outros trabalhos (TAMM; FLÜCKIGER, 1993; TIAN; BERTOLINI, 1999). Isto pode ser considerado um

problema na cadeia da pós-colheita, pois a refrigeração dos frutos antes da comercialização não evitará a frutificação do fungo, que poderá dispersar-se e ocasionar novas infecções.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o patógeno recém-detectado em território brasileiro pode se tornar um sério problema aos produtores de pêssego, devido às suas características inerentes. A presença de um único isolado em território brasileiro não deve ser realidade, embora testes de PCR com uma amostra de 20 isolados do Paraná resultaram somente na detecção de *M. fructicola* (dados não publicados). Como a temperatura não se mostrou um fator limitante ao seu desenvolvimento, *M. laxa* pode vir a ser um patógeno importante nos estados produtores de pêssego do Sul do país, quiçá predominando sobre *M. fructicola*.

2.6 Conclusões

- Tanto a germinação de conídios quanto o crescimento micelial dos isolados de *M. fructicola* e do isolado de *M. laxa* do Estado de São Paulo utilizados neste trabalho ocorreram sob ampla faixa de temperatura, sendo maior para *M. laxa*, que suporta temperaturas mais baixas que *M. fructicola*.

- A esporulação de *M. laxa* é inversamente proporcional à temperatura de incubação, diferentemente da espécie *M. fructicola*, para a qual não há relação entre número de esporos produzidos e temperatura.

- A molécula iminocadina controla satisfatoriamente ambos os patógenos *in vitro*, sendo *M. laxa* mais sensível ao princípio ativo que *M. fructicola*.

Referências

ADAMS, P.B.; SPROSTON, T.; TIETZ, H.; MAJOR, R.T. Studies on disease resistance of *Gingko biloba*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 32, p. 233-236, 1962.

AGROFIT. Disponível em:
<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 03 nov. 2008.

- BOEHM, E.W.A.; MA, Z; MICHAILIDES, T.J. Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 428-439, 2001.
- BYRDE, R.J.W.; WILLETTS, H.J. **The brown rot fungi of fruit: their biology and control**. Oxford: Pergamum Press, 1977. 171 p.
- CÔTÉ, M.-J.; TARDIF, M.-C.; MELDRUM, A.J. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1219-1225, 2004.
- CRUICKSHANK, R.H.; WADE, G.C. Production of apleria by *Monilinia fructicola*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 6, p. 425-428, 1992.
- HARADA, Y.; NAKAO, S.; SASAKI, M.; SASAKI, Y.; ICHIHASHI, Y.; SANO, T. *Monilia mumecola*, a new brown rot fungus on *Prunus mume* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 70, n. 6, p. 297-307, 2004.
- HAU, B.; KRANZ, J. Mathematics and statistics for analyses in epidemiology. In: KRANZ, J. (Ed.). **Epidemics of plant disease: mathematics analyses and modeling**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 12-52.
- LANE, C.R. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. **OEPP/EPPO Bulletin**, v. 32, p. 489-493, 2002.
- LEE, M.-H.; BOSTOCK, R.M. Induction, regulation, and role in pathogenesis of apleria in *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 1072-1080, 2006.
- LEEUWEN, G.C.M. VAN; BAAYEN, R.P.; HOLB, I.J.; JEGER, M.J. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 444-451, 2002.
- MARTINS, M.C.; BETTI, J.A.; LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JUNIOR, R.P.; AMORIM, L. Doenças das rosáceas de caroço. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap. 62, p. 545-557.
- MASRI, S.S. An improved technique for studying spore germination of *Sclerotinia laxa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, p. 997, 1967.
- MICHAILIDES, T.J.; MORGAN, D.P. Influence of fruit-to-fruit contact on the susceptibility of French prune to infection by *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 1416-1424, 1997.
- MOREIRA, L.M.; MAY-DE-MIO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; LIMA, M.L.R.Z.; POSSAMAI, J.C. Controle em pós-colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 395-398, 2002.

OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIGGS, A.R. Brown rot. In: OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIRD, G.W.; RITCHIE, D.F.; URIU, K.; UEYMOTO, J.K. (Ed.). **Compendium of stone fruit diseases**. Saint Paul: APS, 1995. cap 1, p. 7-10.

SOUZA, D.C.; FAZZA, A.C.; CAMARGO, L.A.; MIO, L.M.; ANGELI, S.S.; AMORIM, L. First report of *Monilinia laxa* causing brown rot on peaches in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 6, p. S148-S149, 2008.

TAMM, L.; FLÜCKIGER, W. Influence of temperature and moisture on growth, spore production, and conidial germination of *Monilinia laxa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1321-1326, 1993.

TIAN, S.P.; BERTOLINI, P. Effect of temperature during conidial formation of *Monilinia laxa* on conidial size, germination and infection of stored nectarines. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 635-641, 1999.

WADE, G.C.; NICOLLS, J.M. The infection of apricot fruit at different stages of maturity with *Sclerotinia fructicola*. In: REPORT OF THE RESEARCH WORK ON BROWN ROT OF STONE FRUIT CONDUCTED UNDER THE AUSPICES OF THE BROWN ROT RESEARCH COMMITTEE: 1957-1962. Melbourne, 1968. p. 110-115.

WEAVER, L.O. Effect of temperature and relative humidity on occurrence of blossom blight of stone fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 1136-1153, 1950.

XU, X.-M.; GUERIN, L.; ROBINSON, J.D. Effects of temperature and relative humidity on conidial germination and viability, colonization and sporulation of *Monilinia fructigena*. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 50, p. 561-568, 2001.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall International, 1999. 663 p.

3 EFEITO DA TEMPERATURA E DA DURAÇÃO DO MOLHAMENTO NA INFECÇÃO DE CONÍDIOS DE AGENTES CAUSAIS DA PODRIDÃO PARDA DO PESSEGUIRO

Resumo

A grande quantidade de insumos usados na produção de frutas está sendo cada vez mais questionada pela sociedade. Para reduzir a aplicação de fungicidas, programas como A Produção Integrada de Frutas (PIF) vêm sendo implantados, levando a várias mudanças de manejo das culturas. A base da aplicação de fungicidas nestes programas é feita pelas condições ambientais favoráveis à infecção do patógeno. Este trabalho teve por objetivos determinar as condições de temperatura e molhamento para a infecção de pêssegos pelos agentes causais da podridão parda relatados no Brasil. Frutos de pessegueiro em maturação plena foram comprados na CEASA de Campinas, desinfestados superficialmente, acomodados em recipientes plásticos, feridos e inoculados com suspensões, ajustadas para 10^4 conídios/mL, de *M. fructicola* e *M. laxa*. Os recipientes foram colocados em sacos plásticos com algodão umedecido e incubados em câmaras de crescimento a 10, 15, 20, 25 e 30°C. Os sacos plásticos foram retirados após 6, 12 ou 24 horas da inoculação. Os frutos foram avaliados diariamente para incidência, severidade, período de incubação, período de latência e esporulação das lesões. Todas as variáveis analisadas sofreram influência da temperatura. Os períodos de câmara úmida não exerceram efeito em nenhuma das variáveis. Maiores incidências foram observadas a 15 e 20°C. A 10°C os períodos de incubação e latência foram menores para *M. laxa* que para *M. fructicola*. A 30°C o período de latência de *M. laxa* foi maior que o de *M. fructicola*. Foi observada esporulação de *M. fructicola* a 30°C, mas não a 10°C. O oposto foi verificado para *M. laxa*, porém nenhuma relação entre temperatura e esporulação foi encontrada, para ambas. As maiores lesões foram encontradas a 20 e 25°C para ambas as espécies. Além disso, diferenças visuais foram observadas nos sintomas ocasionados por essas espécies.

Palavras-chave: Incubação; Latência; Severidade; *M. fructicola*, *M. laxa*

Abstract

The amount of chemicals used in the production of fruit is being questioned more and more by society. To reduce fungicide sprays, programs such as Fruit Integrated Production (PIF) have been adopted, resulting in many changes in orchard management. These programs include fungicide sprays based on environmental conditions favorable to pathogen infection. This study aimed to determine the temperatures and wetting periods to the infection of peaches by the causal agents of brown rot in peaches reported in Brazil. Fully ripe peaches were bought at a wholesale market, surface sterilized, placed in plastic recipients,

wounded with a needle and inoculated with 10^4 conidia suspension of *M. fructicola* or *M. laxa*. The plastic recipients were put into plastic bags and wet cotton balls and incubated in growth chambers at 10, 15, 20, 25 and 30°C. The plastic bags were removed after 6, 12 and 24 hours from inoculation. Incidence, severity and sporulation were evaluated daily and incubation and latency periods were estimated. The temperature was a key factor that influenced all variables studied. Higher incidence levels were observed at 15 and 20°C. At 10°C incubation and latency periods were shorter for *M. laxa* than for *M. fructicola*. Sporulation of *M. fructicola* was observed at 30°C but not at 10°C. The opposite was observed for *M. laxa*. However, no relationship between temperature and sporulation was found in both species. The greatest lesions were observed at 20 and 25°C for both species. Visual differences were also observed in symptoms caused by these species.

Keywords: Incubation; Latency; Severity; *M. fructicola*, *M. laxa*

3.1 Introdução

O cultivo de pêsegos e nectarinas no Brasil, que atingiu uma produção de quase 240 mil toneladas em 2007, está restrito aos estados do Sul e ao Estado de São Paulo, onde as condições climáticas são favoráveis ao seu cultivo. São Paulo é o segundo maior produtor nacional de pêsegos e todas as variedades plantadas no estado são prejudicadas pela ocorrência da podridão parda, assim como em todas as regiões produtoras do mundo. A doença em questão é responsável por perdas significativas tanto no campo como na pós-colheita, pois inviabiliza a comercialização do fruto. Levantamentos realizados recentemente na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), na capital do estado paulista, mostraram que *M. fructicola* é um dos patógenos mais frequentes durante a armazenagem e comercialização de pêsegos (ABREU, 2006; GUTIERREZ, 2005; MARTINS et al., 2006).

No campo, flores, ramos e frutos podem ser atacados pelos patógenos, em qualquer fase do desenvolvimento da planta, desde a floração até a maturação dos frutos. Quanto mais cedo ocorrem as primeiras infecções, na época da floração, maior a fonte de inóculo para a infecção dos frutos, durante a safra. No entanto, nem sempre a infecção por este patógenos é seguida pela colonização dos tecidos e exteriorização de sintomas. Em condições não favoráveis ao seu desenvolvimento, o patógeno pode entrar em latência, manter-se dormente, tornando-se ativo

novamente apenas na presença de estímulos ocasionados por condições favoráveis. Portanto, para patógenos com essa característica de quiescência, o momento da infecção não pode ser determinado a partir da época de expressão dos sintomas, fazendo com que o seu controle seja dificultado.

A principal estratégia de controle da podridão parda no campo é a aplicação de fungicidas de forma preventiva, iniciada na época da floração. Calendários fixos de aplicação são normalmente, adotados por produtores. Porém, com as novas exigências do mercado consumidor, preocupações quanto à proteção do ambiente, segurança do aplicador e ausência de resíduos nos alimentos, mudanças nas práticas culturais vêm sendo estabelecidas. Programas como a Produção Integrada de Frutas, cujos objetivos são concentrados na aplicação racional de fungicidas, têm ganhado credibilidade e reconhecimento ao redor do mundo.

No entanto, para a aplicação de fungicidas sem a adoção de calendários fixos, a necessidade de conhecer as condições ambientais que permitem o desenvolvimento da doença se faz evidente. A tomada de decisão para a pulverização dos pomares deve ser influenciada pela ocorrência de condições climáticas que predisponham à infecção e colonização dos patógenos alvo. Nesse contexto, o estabelecimento de tais condições climáticas é primordial.

O presente trabalho teve por objetivos determinar as melhores condições de temperatura e duração do molhamento para a infecção e colonização de frutos de pessegueiro pelos agentes causais da podridão parda do pessegueiro encontrados no Brasil.

3.2 Revisão bibliográfica

O pessegueiro (*Prunus persica*) é uma espécie arbórea da família *Rosaceae*, nativa da China, onde se encontra a maior diversidade dessa espécie. O nome, entretanto, é originário da Pérsia, região tomada inicial e erroneamente como de sua origem. Embora seja uma cultura típica de clima temperado, hoje é produzida em várias partes do mundo. A cultura está presente no Brasil desde 1532, quando foi introduzida por Martim Afonso de Souza, na chegada das primeiras expedições portuguesas (TODA FRUTA, 2008).

A produção mundial de pêssegos e nectarinas foi de cerca de 17,46 milhões de toneladas em 2007. Os maiores produtores no cenário mundial são China, Itália, Estados Unidos e Espanha. Na América do Sul, as maiores produções são provenientes do Chile, da Argentina e do Brasil, que ocupa a 3ª posição no ranking do continente, com 238.500 toneladas produzidas em 2007 (FAO, 2008).

No Brasil, as principais regiões produtoras de pêssego estão localizadas nos Estados do Sul e em partes do Sudeste, onde as condições ambientais, sobretudo os climas temperado e subtropical, favorecem a exploração comercial da cultura. O melhoramento das variedades comerciais, mais adaptadas ao clima mais quente, tem proporcionado a expansão do plantio nos Estados de São Paulo e Paraná desde os anos 70 (GUTIERREZ, 2005).

É no Estado de São Paulo que se encontra a maior produtividade de pêssegos do País, embora este seja o segundo maior produtor nacional da fruta, perdendo apenas para o Estado do Rio Grande do Sul (SATO, 2001). A comercialização dos frutos nacionais é feita anualmente, de setembro a fevereiro, sendo que pêssegos produzidos em São Paulo predominam no período de setembro a dezembro. O escoamento da produção paulista, que figura em torno de 32 mil toneladas, é em grande parte realizado através da CEAGESP, localizada na capital do Estado (GUTIERREZ, 2005).

O pessegueiro é explorado tanto com finalidade ao mercado de consumo *in natura*, quanto ao de processamento industrial, principalmente de pêssego em calda. No caso paulista, o destino principal da produção é o mercado *in natura* (MAIA et al., 1996), pois pêssego e nectarina são frutas muito apreciadas pelo sabor, pela aparência e pelo seu valor econômico.

No entanto, sendo um fruto climatérico e de alta perecibilidade, várias desordens de natureza biótica e abiótica são responsáveis pela diminuição da produção e/ou qualidade dos pêssegos no campo e após a colheita. Os distúrbios pós-colheita, podendo ser de natureza física, fisiológica e patológica, são importantes causas de desvalorização do produto durante a comercialização e têm motivado a realização de vários trabalhos sobre a quantificação de danos em pêssegos comercializados na CEAGESP (ABREU, 2006; GUTIERREZ, 2005; MARTINS et al., 2006). Levantamentos realizados nas safras 2001 e 2002 mostraram que entre 4,9 e 44,5% dos pêssegos apresentavam algum tipo de dano pós-colheita, e que frutos doentes eram a segunda maior causa da desvalorização

do produto, perdendo apenas para a ocorrência de injúrias mecânicas. Embora a frequência de injúrias mecânicas fosse maior que a de frutos doentes, houve correlação positiva entre essas duas variáveis (MARTINS et al., 2006). Resultados similares foram encontrados em levantamentos realizados nas safras 2003 e 2004, mostrando que as doenças pós-colheita são responsáveis por 2,4 a 15,2% dos danos ocasionados em frutos após a saída do campo (ABREU, 2006). A podridão parda do pessegueiro, causada pelo fungo *Monilinia fructicola*, aparece como uma das principais doenças que atacam a cultura nesta fase da cadeia produtiva (ABREU, 2006; MARTINS et al., 2006; AMORIM et al., 2008).

Embora não se possam desprezar os prejuízos causados por estes patógenos na cadeia pós-colheita de pêssegos, a doença em questão é uma das principais responsáveis por perdas durante a fase de produção a campo, devido ao apodrecimento dos frutos. Em infecções severas, 50 a 75% dos frutos podem apodrecer no pomar, e os restantes podem ser infectados antes da comercialização (AGRIOS, 2005; SOUZA, 2006). A ocorrência da doença é endêmica em todas as regiões produtoras de fruteiras de caroço do mundo, onde os patógenos a ela relacionados estão distribuídos.

Os agentes causais da podridão parda podem ocasionar queima de flores, seca de ramos e podridão em frutos. Os primeiros sintomas da doença podem ser observados em flores e ramos. Flores infectadas apresentam lesões pardas, que podem ser totalmente revestidas por conídios dos fungos. Os prejuízos por esta forma de ataque são devido à diminuição do número de flores e à formação de novas fontes de inóculo para os frutos (LANDGRAF; ZEHR, 1982). A infecção de ramos leva à formação de cancrs, que podem colonizar todo o diâmetro destes, ocasionando a morte da sua parte terminal. Se os ramos não forem circundados pelos cancrs, os tecidos sadios vizinhos produzem calos na região (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995). Em frutos, os sintomas iniciais, normalmente manifestados durante o amadurecimento, são manchas de cor parda e aspecto encharcado, que podem ficar recobertos de esporos acinzentados e, em poucos dias, tomam o fruto por completo, desidratando-o e mumificando-o (BYRDE; WILLETTS, 1977; MARTINS et al., 2005). A infecção em flores está mais associada a *M. laxa* e a podridão de frutos está mais associada a *M. fructicola* (BYRDE; WILLETTS, 1977), embora em condições favoráveis, os dois patógenos possam infectar qualquer tecido disponível do hospedeiro.

As infecções têm início na época da florada, mas podem ocorrer até a maturação dos frutos. O inóculo disponível para infectar flores em estágio de abertura (infecção primária) inclui ascósporos, liberados de apotécios que se desenvolvem sobre frutos mumificados pela ação do fungo, infectados na safra anterior e ao chão, e conídios que se formam em cancrios, pedúnculos ou frutos mumificados que permaneceram na árvore (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995) e podem infectar os tecidos hospedeiros através de ferimentos ou diretamente. No Brasil, a principal fonte de inóculo, tanto primário quanto secundário, é constituída por conídios formados em frutos mumificados ou cancrios nos ramos (MARTINS et al., 2005), uma vez que temperaturas baixas, entre 0 e 15°C, são requeridas por meses durante o processo de formação de apotécios (WILLETTS; HARADA, 1984) e para a liberação de ascósporos (HONG; MICHAILIDES, 1998).

A disseminação dos conídios ocorre pelo vento, pela chuva ou por insetos e a esporulação do patógeno a campo foi observada durante toda a safra em pomares com o histórico da doença e no florescimento naqueles onde a doença é bem controlada. A irrigação do pomar também favoreceu a liberação de esporos de *M. fructicola* no ar, pois a prática em questão é responsável pelo aumento da umidade no solo, que ocasiona a esporulação dos frutos infectados que caíram no chão por ocasião do raleio (LUO et al., 2005).

A infecção de flores pode induzir a ocorrência da queima quando certos fatores estiverem presentes, incluindo as condições microclimáticas favoráveis, a suscetibilidade dos tecidos, dependente do estágio fenológico da flor, como demonstrado em estudos com cerejeiras, onde a infecção ocorre mais facilmente durante o florescimento pleno (LUO; MORGAN; MICHAILIDES, 2001). O mesmo estudo relata que o maior sucesso da infecção em frutos ocorre duas semanas antes da colheita.

Em frutos maduros a infecção pode ocorrer por penetração direta, através da cutícula, por aberturas naturais, como estômatos, ou através de ferimentos ocasionados na superfície dos frutos (MARTINS et al., 2005; OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995). Em condições ótimas para os patógenos, sintomas de podridão em pêssegos podem ser observados após 48 horas da infecção (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995).

A incidência da queima de flores e da podridão em frutos está diretamente relacionada às condições ambientais, principalmente temperatura e duração do

molhamento. A severidade da queima de flores de cerejeira causada por *M. fructicola* aumentou com umidades maiores durante a incubação (KOBALL; WILCOX; SUM, 2005). Também para cerejeira, a incidência da queima de flores por *M. laxa* foi relacionada com a temperatura e a duração do molhamento (TAMM; MINDER; FLÜCKIGER, 1995). Relatos antigos já demonstravam que a incidência da queima de flores de pessegueiro causada por *M. fructicola* é muito influenciada pela umidade relativa e pela temperatura (WEAVER, 1950), embora resultados contraditórios pudessem ser encontrados nessa época, uma vez que a manutenção de temperaturas e umidade relativa acuradas seja duvidosa, dada a falta de equipamentos específicos para este fim (BYRDE; WILLETTS, 1977).

Temperatura e duração do molhamento também se mostraram fatores importantes na esporulação de cancos infectados por *M. fructicola* e mantidos em laboratório. Independentemente da temperatura de incubação, de 5, 11, 15 ou 23°C, o mínimo de 12 horas de molhamento foi necessário para a observação de conídios, embora a esporulação tenha sido significativamente maior nos cancos a 15 e 23°C (WATSON; ZEHR; GRIMES, 2002).

A infecção de frutos também é influenciada pelo ambiente. A faixa ótima de temperatura para infecção por *M. fructicola* em pêssegos e cerejas varia de 20 a 25°C (BIGGS; NORTHOVER, 1988; CORBIN, 1963). Maiores períodos de molhamento também podem resultar em maior porcentagem de frutos infectados, além de menor período de incubação da doença (BIGGS; NORTHOVER, 1988). O estágio fenológico dos frutos também influencia a infecção, como observado para ameixas, onde a latência da doença é maior quanto mais imaturo o fruto durante a infecção (LUO et al., 2005).

Além de temperatura e período de molhamento, o estágio de desenvolvimento da flor também interfere na infecção dos patógenos, como demonstrado para flores de ameixeira, onde os cinco estádios fenológicos testados – botão floral, florescimento pleno, florescimento pleno tardio, queda de pétalas e estabelecimento do fruto – apresentaram diferenças quanto à porcentagem de flores infectadas (LUO; MORGAN; MICHAILIDES, 2001).

A suscetibilidade dos frutos ao ataque por *M. fructicola* ou *M. laxa* também varia durante a estação de cultivo. Para ameixas, o pico suscetibilidade ocorre em frutos no estágio de desenvolvimento do caroço “pit hardening”. Há, então, um

declínio rápido até a formação do embrião, quando a suscetibilidade aumenta novamente, até a colheita (MICHAILIDES et al., 2007).

Em variedades nacionais, adaptadas ao clima subtropical, a maior suscetibilidade de pêssegos das variedades Aurora I e Aurora II foi observada em frutos com maiores diâmetros e teor de sólidos solúveis, onde o processo de amadurecimento foi relacionado positivamente com a incidência de podridão parda (infecções quiescentes e podridões visíveis) (SOUZA, 2006).

Os patógenos penetram os tecidos do hospedeiro em condições favoráveis de ambiente, porém, algumas vezes, o órgão atacado não permite a infecção e/ou colonização por parte do agente patogênico por apresentar características químicas, como compostos fenólicos ou baixo teor de açúcar (BOSTOCK et al., 1999) ou ainda características estruturais, como tecidos mais resistentes à infecção (WADE; CRUICKSHANK, 1992) que desfavorecem o patógeno. Nestes casos, o patógeno entra em estado de latência, à espera que as condições internas se tornem propícias ao seu desenvolvimento, permitindo que frutos verdes que tenham o patógeno se desenvolvam normalmente, sem a ocorrência de sintomas visíveis. Entretanto, na presença de condições favoráveis, os sintomas da podridão parda podem se manifestar, durante a maturação dos frutos ou após a colheita destes (MARTINS et al., 2005; BIGGS; NORTHOVER, 1988).

Este fenômeno torna a podridão parda um típico exemplo de doença com infecção quiescente, permanecendo invisível por um longo período após os estádios iniciais de infecção (PRUSKY, 1996). Portanto, o momento da infecção não pode ser inferido a partir da visualização dos sintomas.

As doenças quiescentes são muito problemáticas do ponto de vista de controle, pois como os sintomas exteriorizam-se muito tempo depois da penetração do fungo e como não há produto com capacidade curativa, o controle químico deve ser preventivo. Pulverizações preventivas, para serem feitas, devem ser realizadas na época provável de infecção. Caso não se conheça a época de infecção, as pulverizações devem ser realizadas continuamente, durante todo o período de suscetibilidade do fruto. É dessa forma que o controle tem sido feito atualmente. No entanto, o mercado, principalmente de exportação, tem se tornado mais exigente quanto à segurança alimentar dos produtos agrícolas e a aspectos ligados à proteção do ambiente, além da segurança do produtor (GONZALEZ-MORO, 2003 apud TIBOLA, 2005). Essas novas tendências contrastam com o sistema de

produção praticado nos últimos tempos, com excesso no uso de insumos e sem preocupação com o ambiente (MARTINS et al., 2001).

Para atender ao mercado mais preocupado, surgiu o sistema de Produção Integrada de Frutas (PIF), para os quais a redução no emprego de defensivos agrícolas é uma premissa básica. Sistemas similares a esse já são amplamente empregados em vários países e tornaram-se pré-requisito para a importação/exportação de frutas (SANHUEZA, 2000). No Brasil, a implementação do PIF teve início em 1997, no cultivo da maçã, e em 1999 foi ampliado para frutas de caroço, uva de mesa e manga, abrangendo atualmente mais de 15 espécies frutíferas, entre as quais o pessegueiro.

Para conseguir diminuir o uso de agroquímicos, não é recomendado no PIF o uso do calendário fixo de aplicações para o controle de pragas e doenças da cultura. A alternativa ao calendário fixo seriam pulverizações feitas de acordo com os critérios de incidência de pragas e doenças, baseados no monitoramento, no estágio fenológico da cultura, no histórico de ocorrência da doença na área e nas condições climáticas para aplicação (FACCHINELLO et al., 2003). Esses critérios já têm proporcionado diminuição na aplicação de agroquímicos em pomares de PIF, quando comparados com pomares de cultivo tradicional, sem que a produção fosse alterada (FARIAS et al., 2003; TIBOLA et al., 2005). Porém a incidência de podridão parda ainda é grande nos pomares dos dois sistemas de cultivo, pois as condições ótimas para a infecção dos patógenos não está sendo considerada nos critérios do PIF. Dessa forma, a determinação das condições ambientais favoráveis à infecção dos frutos é fundamental para o estabelecimento de um programa de pulverizações direcionadas.

Para a sarna da maçã, uma das principais doenças da cultura, as condições ambientais favoráveis ao ciclo de vida do patógeno, *Venturia inaequalis*, já estão bem estabelecidas. Sistemas de previsão da doença, baseados nas condições climáticas, já foram desenvolvidos e estão sendo utilizados em vários países, ajudando na tomada de decisão para o uso racional de fungicidas e controlando a doença com eficiência.

Alguns sistemas de previsão para *M. fructicola* já foram propostos, notadamente para infecções florais. Luo, Morgan e Michailides (2001) avaliaram o risco da ocorrência da queima das flores em ameixeiras sob a influência da temperatura, do estágio fenológico, da concentração do inóculo e do período de

molhamento. Uma tabela de risco da doença foi proposta no estudo, baseada nas quatro variáveis estudadas. Altos riscos de infecção foram associados a 24 horas de molhamento a 15 ou 20°C, em qualquer estágio fenológico das flores, em alta ou baixa concentração de inóculo. De modo geral, riscos maiores estão presentes até o florescimento pleno, embora somente acima de 12 horas de molhamento.

Não há sistema de previsão para a ocorrência de podridão parda em frutos de pessegueiro. Como nessa cultura o maior número de aplicações de fungicidas realizadas durante a safra visa o controle de *M. fructicola*, os fatores ambientais que predispõem a cultura ao ataque deste patógeno devem ser melhor esclarecidos, principalmente para as variedades cultivadas e os patógenos isolados no Brasil, que podem possuir diferentes exigências climáticas das variedades e isolados do hemisfério norte. Assim, este estudo teve por objetivo determinar a influência da temperatura e da duração do molhamento na infecção e colonização de pêssegos cultivados no Estado de São Paulo por *M. fructicola* e *M. laxa*.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Avaliação do efeito da temperatura e da duração do molhamento na infecção de pêssegos por conídios de *M. fructicola* e *M. laxa*

Nos estudos *in vivo*, foram utilizados frutos de pessegueiro, no ponto de colheita, da variedade 'Dourado', a mais comercializada no Estado de São Paulo, comprados na CEASA de Campinas/SP e todos provenientes da mesma propriedade localizada em Jundiaí - SP.

Os frutos foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, durante 5 minutos, lavados com água corrente e colocados para secar durante 24 horas (Figura 1). Antes da inoculação, os frutos foram dispostos em recipientes plásticos, cada um com 6 frutos, constituindo uma repetição. Em seguida, foram realizados ferimentos na superfície dos frutos com auxílio de agulha hipodérmica, em região previamente demarcada para facilitar a inoculação e posterior avaliação. A suspensão de conídios de um isolado de *M. fructicola* e do isolado de *M. laxa*, foi obtida pela deposição de 10 mL de água destilada esterilizada na colônia e

raspagem da placa, com concentração final ajustada para 10^5 conídios/ mL. De cada suspensão foram retiradas alíquotas de 30 μ L, sendo cada uma depositada sobre o ferimento realizado com agulha, a 0,3 mm de profundidade (Figura 2). Os frutos foram então colocados em sacos plásticos com algodão umedecido (câmara úmida) e distribuídos de forma aleatória nas câmaras de crescimento ajustadas nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30°C, sob fotoperíodo de 12 horas (Figura 3). Cada tratamento continha 3 repetições, totalizando 18 frutos. O mesmo procedimento foi adotado para as testemunhas, exceto pela inoculação dos frutos, realizada com água destilada esterilizada, e câmara úmida por 12 e 24 horas.

Após 6, 12 ou 24 horas, findos os respectivos períodos de permanência sob câmara úmida, os sacos plásticos foram retirados e os frutos permaneceram na mesma temperatura de infecção até que apresentassem sintomas típicos da lesão com esporulação do patógeno – visualizada pelo aparecimento de estruturas do patógeno, de aspecto cottonoso.



Figura 1 - Frutos na desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (A) e colocados a secar (B)

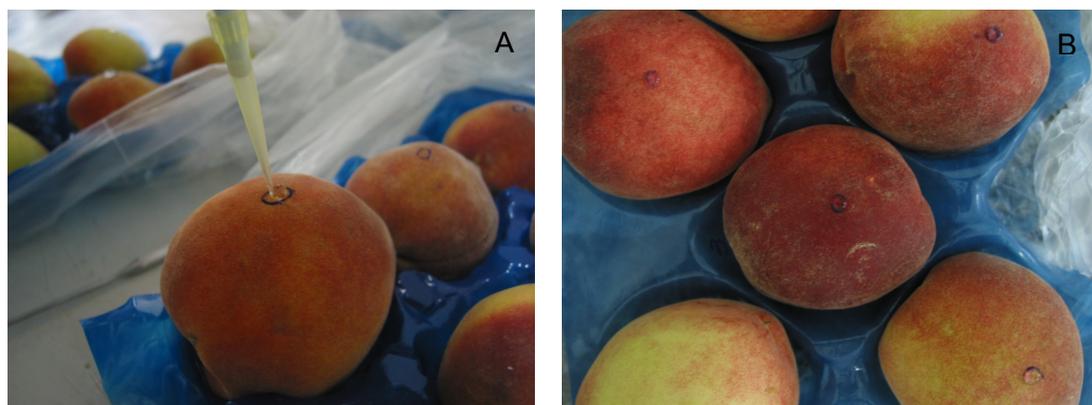


Figura 2 - Inoculação por meio da deposição de suspensão do patógeno (A) em frutos previamente feridos (B)

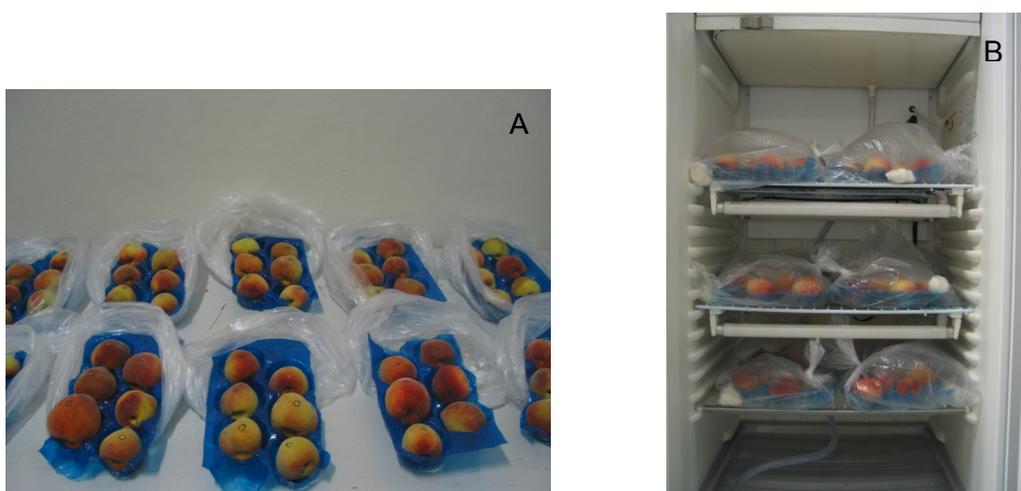


Figura 3 - Instalação da câmara úmida (A) e frutos em uma câmara de crescimento (B)

Diariamente foram avaliadas a incidência (número de frutos doentes) e a severidade (tamanho da lesão) da doença, esta última, obtida por meio de 2 medidas perpendiculares do diâmetro da lesão. O período de incubação, definido como o tempo compreendido entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas em 50% dos frutos, e o período de latência, definido como o período de tempo compreendido entre a inoculação e a esporulação em 50% dos frutos, foram estimados. O experimento foi realizado duas vezes.

3.3.2 Análise dos dados

O experimento teve delineamento inteiramente casualizado. Como os dados de incidência são oriundos de contagem e não seguem a distribuição normal, antes da análise eles foram transformados pela equação $Y = \arcsen \sqrt{p}$, onde Y representa os dados transformados e p representa a proporção de frutos doentes por repetição (recipiente plástico). Os dados transformados foram submetidos à análise de variância em delineamento fatorial, no programa STATISTICA 6.0 (Statsoft, Tulsa).

Os dados dos períodos de incubação e latência foram transformados pela equação: $Y = \sqrt{x}$, onde Y representa os dados transformados e x representa os dados não transformados. Após transformação, os dados foram submetidos à análise de variância, do tipo fatorial.

A análise dos dados de severidade da doença foi realizada por meio de regressão não-linear seguindo o modelo beta (HAU; KRANZ, 1990), descrito pela equação: $Y = b_1 * ((T - b_2)^{b_3}) * ((b_4 - T)^{b_5})$, onde Y representa o diâmetro final das lesões (cm) – obtido pela média dos diâmetros das lesões dos frutos de cada repetição, T é a temperatura (°C) em que os frutos foram mantidos, b_2 e b_4 correspondem, respectivamente, às temperaturas mínima e máxima previstas para a ocorrência de lesões (°C), b_5 representa a amplitude do patamar da curva e b_1 e b_3 são parâmetros do modelo. Os dados foram analisados no programa STATISTICA.

A escolha do modelo que melhor se ajustou aos dados foi verificada através dos coeficientes de determinação (R^2), obtidos das próprias regressões não-lineares e pela ausência de padrões nos resíduos. Os dados das duas repetições de cada experimento foram analisados de forma conjunta, devido à alta reprodutibilidade dos

resultados. A comparação entre as espécies foi feita pelo “t” aplicado aos parâmetros descritivos da equação.

A esporulação foi analisada por análise de variância do tipo fatorial, da mesma forma descrita para incubação e latência.

3.4 Resultados

Ambas as espécies apresentaram ampla faixa de temperatura para infecção e colonização dos frutos, abrangendo todas as temperaturas testadas.

A incidência de doença observada no estudo foi superior a 70% para ambos os patógenos, em todas as combinações. Os períodos de câmara úmida e a espécie patogênica não influenciaram a incidência da doença de forma significativa pela análise fatorial a 5% de probabilidade (Tabela 1). A temperatura, porém, influenciou significativamente a incidência, evidenciando que a menor porcentagem de infecção ocorre a 30°C e as maiores ocorrem a 15 e 20°C (Tabela 2), para ambas as espécies. As interações entre temperatura e espécies ou período de câmara úmida não foram significativas pelos parâmetros da análise de variância.

Tabela 1 – Análise de variância de espécies, temperatura e períodos de câmara úmida na incidência da podridão parda do pessegueiro, causada por *M. fructicola* e *M. laxa* a partir de dados médios de dois experimentos

| Variável | SS ¹ | DF ² | MS ³ | F ⁴ | P ⁵ |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Espécies | 0,094 | 1 | 0,094 | 1,427 | 0,234 |
| Temperatura | 1,632 | 4 | 0,408 | 6,170 | 0,000* |
| Câmara úmida | 0,081 | 2 | 0,040 | 0,611 | 0,544 |
| Espécie x Temperatura | 0,353 | 4 | 0,088 | 1,333 | 0,260 |
| Espécie x Câmara úmida | 0,076 | 2 | 0,038 | 0,571 | 0,566 |
| Temperatura x Câm. úmida | 0,431 | 8 | 0,054 | 0,815 | 0,591 |
| Esp. x Tem. X Câm. Úmida | 0,514 | 8 | 0,064 | 0,972 | 0,460 |

¹ Soma dos quadrados médios.

² Graus de liberdade.

³ Quadrados médios.

⁴ Valor de F.

⁵ Nível de probabilidade da análise, de 5%.

* Variável ou interação significativa, a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Incidência média (porcentagem) da podridão parda em frutos de pessegueiro causada por *M. fructicola* e *M. laxa* em diferentes temperaturas. Dados representam a média de dois experimentos

| Temperatura (°C) | Incidência (%) |
|------------------|----------------------|
| 10 | 89,3 ab ¹ |
| 15 | 95,3 a |
| 20 | 93,8 a |
| 25 | 89,8 ab |
| 30 | 80,5 b |

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pela análise de variância a 0,05.

O período de incubação de ambas as espécies foi influenciado pela temperatura, pela interação temperatura e espécies e pela interação temperatura e períodos de câmara úmida (Tabela 3), porém a interação entre temperatura e períodos de câmara úmida só foi significativa devido ao efeito proporcionado pela temperatura, uma vez que os períodos de câmara úmida (6, 12 e 24 horas) não diferem entre si na mesma temperatura de incubação.

Na interação entre as espécies, *M. fructicola* apresentou maior demora que *M. laxa* para incitar os sintomas da doença a 10°C. Nas demais temperaturas não houve diferença na incubação entre as espécies. Para *M. fructicola*, os menores períodos de incubação foram observados a 20 e 25°C, e o maior foi observado a 10°C, embora este não seja estatisticamente diferente de 30°C. Para *M. laxa*, somente a 10°C a doença teve um período de incubação maior; no intervalo de 15 a 30°C não foi observada diferença significativa no período de incubação da doença (Tabela 4). O curto período de incubação mostra a agressividade do ataque destes patógenos, que levaram cerca de 2 dias para causar sintomas em 50% dos frutos nas temperaturas ótimas.

Tabela 3 - Análise de variância de espécies, temperatura e períodos de câmara úmida no período de incubação da podridão parda do pessegueiro, causada por *M. fructicola* e *M. laxa* a partir de dados médios de dois experimentos

| Variável | SS ¹ | DF ² | MS ³ | F ⁴ | P ⁵ |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Espécies | 0,03 | 1 | 0,030 | 0,75 | 0,389 |
| Temperatura | 11,62 | 4 | 2,905 | 71,79 | 0,000* |
| Câmara úmida | 0,15 | 2 | 0,076 | 1,87 | 0,158 |
| Espécie x Temperatura | 1,46 | 4 | 0,365 | 9,02 | 0,000* |
| Espécie x Câmara úmida | 0,06 | 2 | 0,030 | 0,75 | 0,475 |
| Temperatura x Câm. úmida | 1,21 | 8 | 0,151 | 3,74 | 0,001* |
| Esp. x Tem. X Câm. úmida | 0,32 | 8 | 0,040 | 1,00 | 0,439 |

¹ Soma dos quadrados médios.

² Graus de liberdade.

³ Quadrados médios.

⁴ Valor de F.

⁵ Nível de probabilidade da análise, de 5%.

* Variável ou interação significativa, a 5% de probabilidade.

Tabela 4 - Período médio de incubação (dias) da podridão parda, causada por *M. fructicola* e *M. laxa*, em frutos de pessegueiro. Médias de dois experimentos

| Temperatura (°C) | <i>M. fructicola</i> | <i>M. laxa</i> |
|------------------|-----------------------------------|----------------|
| 10 | 5,7 B ¹ a ² | 4,3 A a |
| 15 | 3,2 A b | 3,3 A b |
| 20 | 2,2 A c | 2,5 A b |
| 25 | 2 A c | 2,5 A b |
| 30 | 2,7 A ab | 2,7 A b |

¹ Médias em cada linha seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pela análise de variância a 0,05.

² Médias em cada coluna seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pela análise de variância a 0,05.

Foram constatadas diferenças estatísticas significativas no período de latência da doença entre as duas espécies, nas diferentes temperaturas e na interação entre os fatores. Os períodos de câmara úmida não influenciaram a latência de ambos os patógenos (Tabela 5).

Na interação entre as espécies, as diferenças são evidenciadas nas temperaturas de 10 e 30°C. *M. fructicola* tem maior período de latência que *M. laxa* a 10°C. A 30°C o período de latência de *M. laxa* é significativamente maior que de *M. fructicola*. Tanto que a 10°C a esporulação de *M. fructicola* não foi observada durante o experimento, e a 30°C a esporulação de *M. laxa* não foi observada.

Para *M. fructicola*, o maior período de latência foi observado na temperatura de 10°C, seguido da temperatura de 30°C. O menor período de latência foi observado nas temperaturas de 20 e 25°C. Para *M. laxa*, os maiores períodos de latência foram observados igualmente a 10 e 30°C e os menores foram observados, também, a 20 e 25°C (Tabela 6).

Tabela 5 - Análise de variância de espécies, temperatura e períodos de câmara úmida no período de latência da podridão parda do pessegueiro, causada por *M. fructicola* e *M. laxa* a partir de dados médios de dois experimentos

| Variável | SS ¹ | DF ² | MS ³ | F ⁴ | P ⁵ |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Espécies | 0,16 | 1 | 0,159 | 8,1 | 0,005* |
| Temperatura | 28,44 | 4 | 7,111 | 363,1 | 0,000* |
| Câmara úmida | 0,02 | 2 | 0,008 | 0,4 | 0,660 |
| Espécie x Temperatura | 1,57 | 4 | 0,392 | 20,0 | 0,000* |
| Espécie x Câmara úmida | 0,03 | 2 | 0,015 | 0,8 | 0,458 |
| Temperatura x Câm. Úmida | 0,10 | 8 | 0,013 | 0,6 | 0,744 |
| Esp. x Tem. X Câm. Úmida | 0,29 | 8 | 0,36 | 1,9 | 0,070 |

¹ Soma dos quadrados médios.

² Graus de liberdade.

³ Quadrados médios.

⁴ Valor de F.

⁵ Nível de probabilidade da análise, de 5%.

* Variável ou interação significativa, a 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Períodos médios de latência (em dias) da podridão parda, causada por *M. fructicola* e *M. laxa*, em frutos de pessegueiro. Médias de dois experimentos

| Temperatura (°C) | <i>M. fructicola</i> | <i>M. laxa</i> |
|------------------|----------------------------------|----------------|
| 10 | >9 A ¹ a ² | 8,5 B a |
| 15 | 5,7 A c | 5,3 A b |
| 20 | 4 A d | 4,3 A c |
| 25 | 3,7 A d | 4,7 A c |
| 30 | 5,8 B b | >7 A a |

¹ Médias em cada linha seguidas da mesma letra não diferem entre si pela análise de variância a 0,05.

² Médias em cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pela análise de variância a 0,05.

Na avaliação da severidade, mais uma vez, a temperatura foi a variável responsável pelas diferenças na colonização dos patógenos. O molhamento, assim como nos testes *in vitro*, não mostrou influência na colonização dos patógenos.

A temperatura próxima a 25°C ficou na inflexão da curva ajustada ao período de 6 horas de câmara úmida para *M. fructicola*. Nos períodos de 12 e 24 horas, a inflexão das curvas ocorreu na temperatura de 20°C (Figura 4). A temperatura mínima estimada pelo modelo beta ficou entre 8,5 e 9°C para os três períodos de câmara úmida. Visualmente, *M. fructicola* teve maior dificuldade que *M. laxa* para colonizar frutos mantidos em baixas temperaturas (10°C), causando lesões com menor diâmetro final, embora a temperatura mínima não tenha sido significativamente diferente de *M. laxa*. A temperatura máxima prevista pelo modelo para *M. fructicola* foi 33°C em todos os períodos de câmara úmida (Tabela 7).

Da mesma forma, a colonização por *M. laxa* ocorreu com sucesso no intervalo de temperatura estudado. As curvas obtidas mostram o intervalo de 15 a 25°C como o mais favorável aos três períodos de câmara úmida. A temperatura mínima prevista pelo modelo, 8°C, foi a mesma para 6, 12 e 24 horas e não diferiu estatisticamente da espécie anterior, embora esta espécie, visualmente, colonize frutos armazenados em baixas temperaturas com maior eficiência que *M. fructicola*, mesmo que as lesões demorem mais para aumentar quando comparadas com o crescimento das lesões em frutos incubados nas temperaturas ótimas (Figura 5). Ao contrário de *M. fructicola*, altas temperaturas são significativamente mais limitantes ao desenvolvimento de lesões por *M. laxa*. A temperatura máxima prevista pelo modelo foi 30°C para 6 e 12 horas de câmara úmida, o que resultou em diferença significativa em comparação com *M. fructicola*, cuja temperatura máxima estimada foi 33°C (Tabela 7). Com 24 horas de câmara úmida a temperatura máxima prevista foi de 32°C, sendo estatisticamente igual à de *M. fructicola* (33°C).

Além da temperatura mínima estimada para cada condição, o parâmetro b_5 do modelo beta, relacionado à amplitude do patamar da curva, também não apresentou diferença estatística entre as espécies, pelo teste “t”.

Tabela 7 – Parâmetros e erros (entre parênteses) das curvas geradas pelo modelo beta ajustadas aos dados de severidade para *M. fructicola* e *M. laxa*. Dados provenientes da média de dois experimentos

| Temp. (°C) | <i>M. fructicola</i> | | | <i>M. laxa</i> | | |
|------------|----------------------|--------------|--------------|----------------|--------------|--------------|
| | Molhamento (h) | | | Molhamento (h) | | |
| | 6 | 12 | 24 | 6 | 12 | 24 |
| b_1 | 0,77 (0,541) | 0,60 (0,608) | 0,69 (0,505) | 0,90 (0,697) | 1,06 (0,646) | 0,91 (1,314) |
| b_2 | 8,94 (0,857) | 8,55 (0,956) | 8,83 (0,988) | 7,99 (0,010) | 8,00 (0,001) | 8,00 (0,007) |
| b_3 | 0,58 (0,183) | 0,57 (0,206) | 0,53 (0,190) | 0,49 (0,115) | 0,46 (0,094) | 0,46 (0,175) |
| b_4 | 33,0 (0,001) | 33,0 (0,001) | 33,0 (0,001) | 30,84 (1,05) | 30,6 (0,764) | 32,0 (3,580) |
| b_5 | 0,30 (0,094) | 0,40 (0,106) | 0,42 (0,100) | 0,42 (0,208) | 0,38 (0,164) | 0,41 (0,386) |

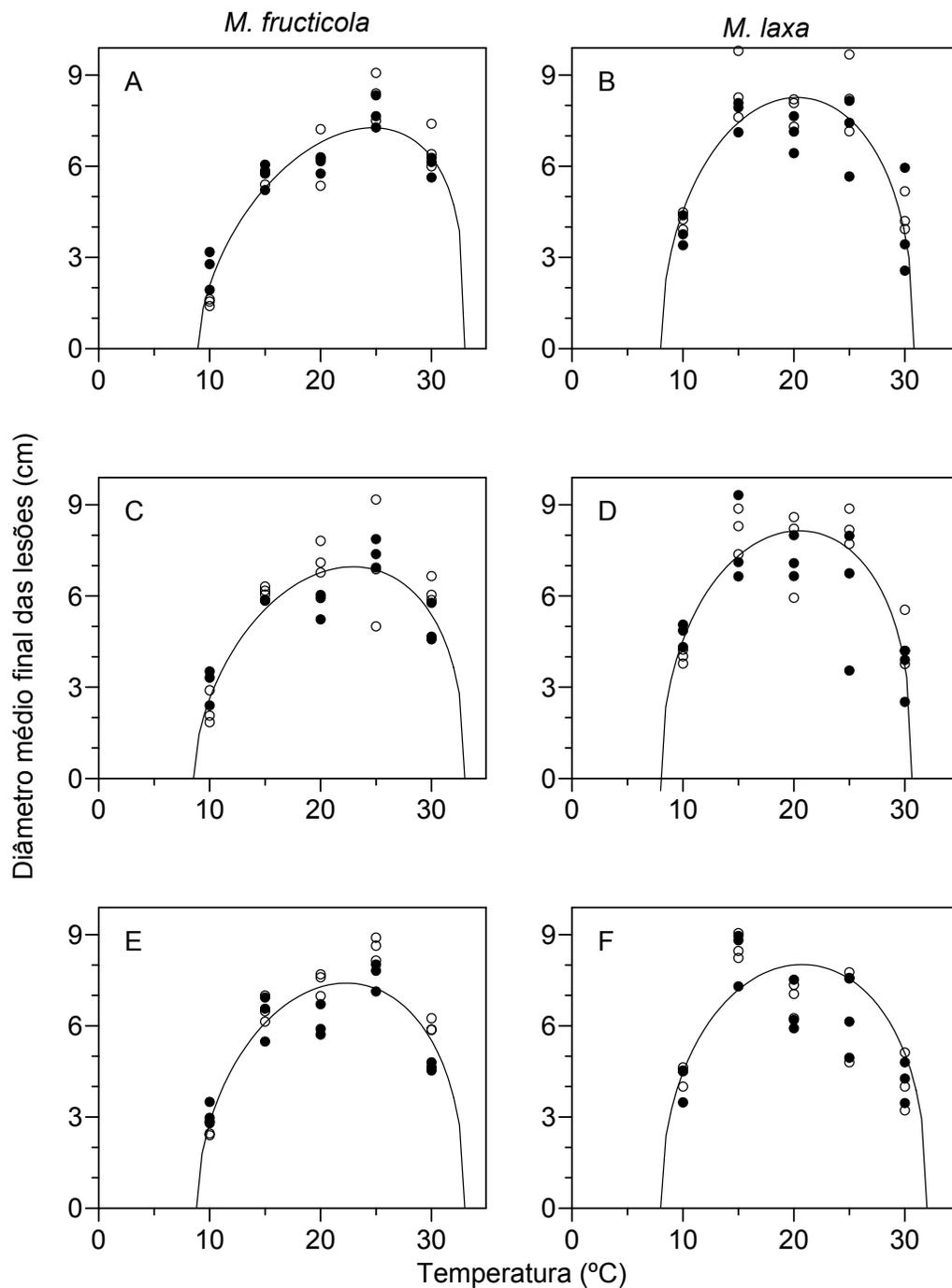


Figura 4 - Diâmetro final médio das lesões causadas em pêsegos colonizados por *M. fructicola* (A, C e E) e *M. laxa* (B, D e F) em função de diferentes temperaturas sob o período de 6 horas (A e B), 12 horas (C e D) e 24 horas (E e F) de câmara úmida. Símbolos brancos representam os dados do primeiro experimento e símbolos pretos representam os dados do segundo experimento

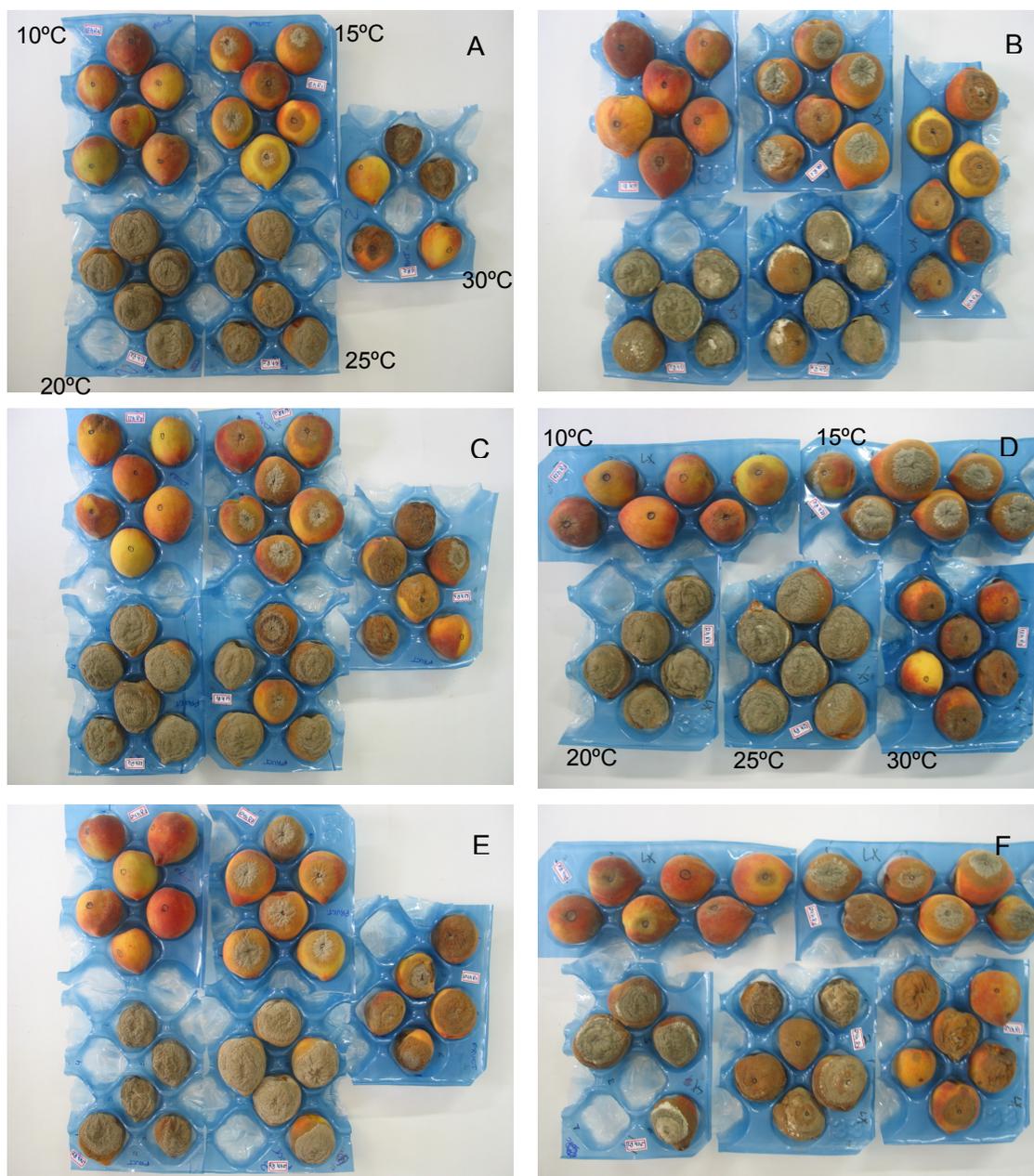


Figura 5 - Aspecto de frutos de pessegueiro, durante o experimento, com sintomas de podridão parda causada por *M. fructicola* (A, C e E) e *M. laxa* (B, D e F) com 6 horas (A, B), 12 horas (C, D) e 24 horas (E, F) de câmara úmida, incubados em diferentes temperaturas

A esporulação foi independente da temperatura, haja vista que não foi encontrada relação entre temperatura e número de conídios produzidos por *M. fructicola* e/ou por *M. laxa* (Figura 6). Na análise de variância com delineamento fatorial, o fator temperatura e a interação temperatura e espécies mostraram influência significativa na produção de conídios (Tabela 8). Entre espécies, *M. laxa* produz mais conídios que *M. fructicola* a 10°C e menos conídios que *M. fructicola* a

30°C. Nas demais temperaturas não há diferença da produção de conídios entre as espécies. A melhor temperatura para a produção de conídios por *M. fructicola* foi 15°C e a temperatura menos favorável à esporulação do patógeno foi 10°C. Para *M. laxa*, a melhor temperatura para esporulação também foi 15°C, porém, a menos favorável foi 30°C (Tabela 9). Os resultados foram confirmados na repetição do experimento.

Tabela 8 – Análise de variância de espécies, temperatura e período de câmara úmida na esporulação de lesões de podridão parda do pessegueiro causadas por *M. fructicola* e *M. laxa*, realizada a partir de dados médios de dois experimentos

| Variável | SS ¹ | DF ² | MS ³ | F ⁴ | P ⁵ |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Espécies | 1,0 | 1 | 0,8 | 0,3 | 0,562 |
| Temperatura | 1577,0 | 4 | 394,4 | 164,1 | 0,000* |
| Câmara úmida | 2,0 | 2 | 1,1 | 0,4 | 0,644 |
| Espécie x Temperatura | 110,0 | 4 | 27,6 | 11,5 | 0,000* |
| Espécie x Câmara úmida | 2,0 | 2 | 1,0 | 0,4 | 0,656 |
| Temperatura x Câm. úmida | 10,0 | 8 | 1,3 | 0,5 | 0,839 |
| Esp. x Temp. X Câm. úmida | 34,0 | 8 | 4,3 | 1,8 | 0,076 |

¹ Soma dos quadrados médios.

² Graus de liberdade.

³ Quadrados médios.

⁴ Valor de F.

⁵ Nível de probabilidade da análise, de 5%.

* Variável ou interação significativa, a 5% de probabilidade.

Tabela 9 – Número de conídios produzidos ($\times 10^4$) / mL por *M. fructicola* e *M. laxa* em frutos, em resposta à temperatura. Dados mostram a média de dois experimentos

| Temperatura (°C) | <i>M. fructicola</i> | <i>M. laxa</i> |
|------------------|-----------------------------------|----------------|
| 10 | 2,8 B ¹ d ² | 14,6 A c |
| 15 | 22,9 A a | 22,5 A a |
| 20 | 15,9 A b | 20,2 A b |
| 25 | 19,5 A b | 19,8 A b |
| 30 | 5,1 A c | 2,6 B d |

¹ Médias em cada linha seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pela análise de variância a 0,05.

² Médias em cada coluna seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pela análise de variância a 0,05.

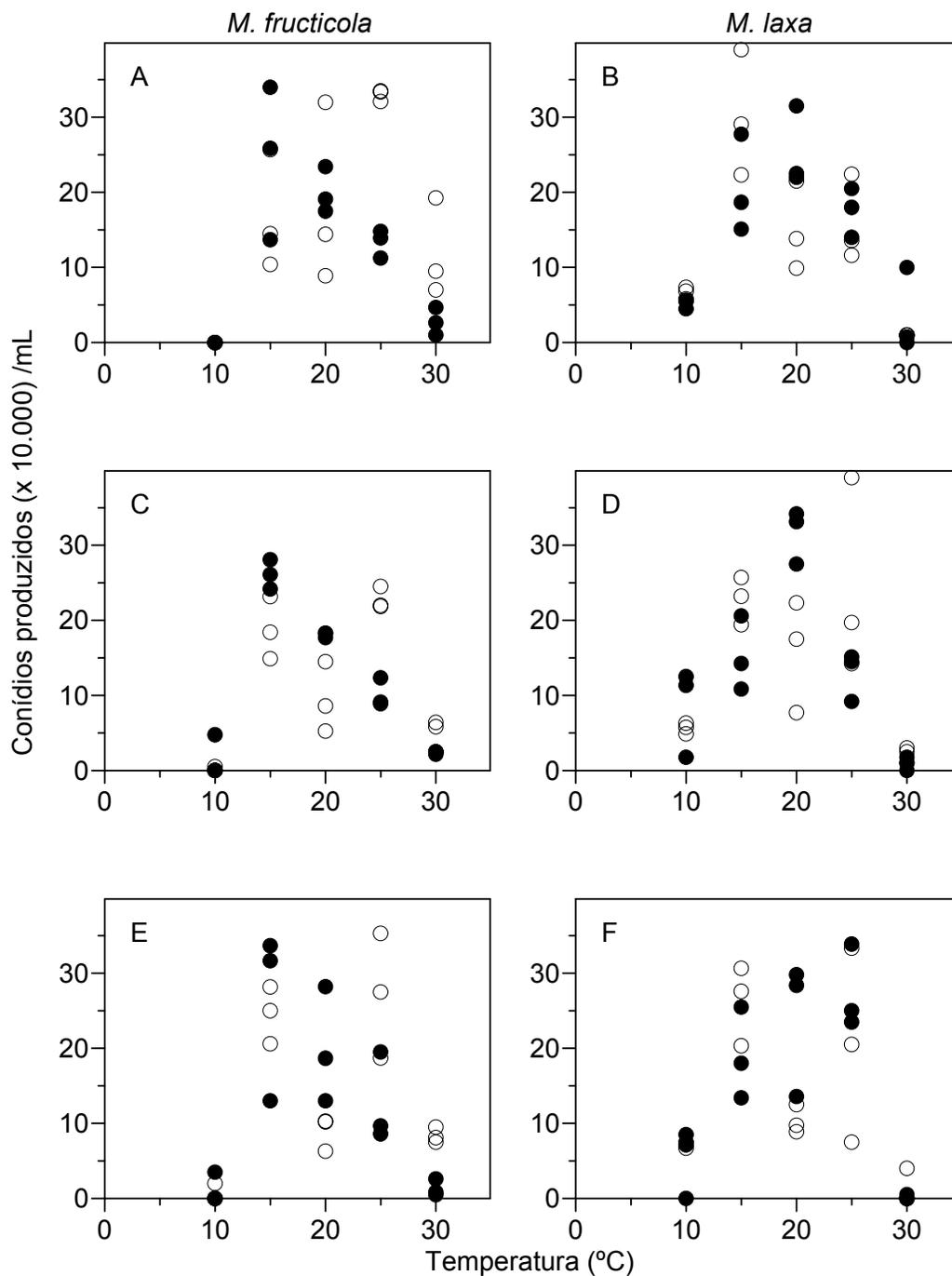


Figura 6 - Esporulação de *M. fructicola* (A, C e E) e *M. laxa* (B, D e F) verificada em pêssegos sintomáticos em função da temperatura no período de 6 horas (A e B), 12 horas (C e D) e 24 horas (E e F) de câmara úmida. Símbolos brancos representam os dados do primeiro experimento e símbolos pretos representam os dados do segundo experimento

Além dos resultados obtidos, observou-se uma diferença visual no aspecto da esporulação dos dois fungos. Enquanto *M. fructicola* apresenta esporulação com coloração acinzentada homogênea, *M. laxa* apresenta uma esporulação bicolor:

acinzentada no centro e branca na periferia. O aspecto cotonoso é evidente apenas em *M. fructicola*. No início da esporulação de *M. laxa* o micélio é formado por hifas esparsas, semelhante a fibras, que se adensam com a evolução dos sintomas, tornando-se uma massa compacta, sem o aspecto de flocos de algodão. Essa diferença pode auxiliar na diferenciação inicial das espécies (Figura 7).



Figura 7 - Visualização da esporulação de *M. fructicola* (à esquerda) e *M. laxa* (à direita), em pêssegos inoculados artificialmente e mantidos a 20°C

3.5 Discussão

De forma análoga aos resultados obtidos *in vitro*, o comportamento dos patógenos também foi similar em vários aspectos.

A alta incidência de doença incitada por ambas as espécies foi influenciada somente pela temperatura. Incidências de 100% já foram relatadas tanto para *M. laxa* como para *M. fructicola* em ameixas, quando os frutos foram mantidos em câmara úmida por 24 horas e incubados por 10 dias a 23°C ou após 5 dias de incubação a 24°C, respectivamente (TIAN; BERTOLINI, 1999; MICHAILIDES; MORGAN, 1997).

Incidências médias de 89% para *M. fructicola* e 91% para *M. laxa* a 10°C descartam o uso da refrigeração dos frutos como método de controle da podridão parda durante a fase de transporte e armazenamento pós-colheita, uma vez que essa temperatura não é suficiente para evitar o processo de infecção dos conídios desses patógenos. Para *M. laxa*, nem mesmo o armazenamento de frutos a 0°C foi suficiente para evitar a incidência da podridão parda, pois os sintomas da doença

apareceram em 100% das nectarinas armazenadas nessa temperatura após 4 dias de incubação (FOURIE; HOLZ, 2003a).

A baixa influência dos períodos de câmara úmida na infecção dos frutos pelas duas espécies patogênicas reflete os resultados obtidos *in vitro*, que demonstram a rapidez com que o processo de germinação dos conídios ocorre. Cerejas inoculadas com *M. laxa* também não apresentaram diferença na incidência da podridão parda quando mantidas de 3 a 24 horas sob câmara úmida (XU; BERTONE; BERRIE, 2007). A incidência sofre maior influência da presença de água livre junto aos conídios que da umidade relativa alta, demonstrada em estudos com *M. laxa* em ameixas e nectarinas (FOURIE; HOLZ, 2003a, 2003b).

Resultados diferentes foram obtidos para pêssegos inoculados com *M. fructicola*, onde uma relação linear entre período de câmara úmida e a incidência da podridão foi notada. Neste estudo, porém, os frutos não sofreram fermentos na superfície (BIGGS; NORTHOVER, 1988). Este mesmo estudo relatou o intervalo ótimo para a infecção dos frutos por *M. fructicola* variando de 22,5 a 25°C; intervalo este que está um pouco acima das melhores temperaturas para infecção dos dois patógenos, que não diferiram entre si, observadas no presente trabalho.

Os períodos de incubação e latência observados para as duas espécies patogênicas foram curtos, principalmente nas temperaturas ótimas, onde os sintomas em 50% dos frutos foram exteriorizados após 2 a 2,5 dias e a reprodução dos patógenos em 50% dos frutos foi observada após 3,7 a 4,3 dias, demonstrando a agressividade das duas espécies patogênicas no ataque a frutos maduros, não importando o período de câmara úmida. A influência do molhamento foi observada, porém, em cerejas não feridas inoculadas com *M. fructicola*, onde o período de molhamento foi inversamente proporcional ao período de incubação da doença (KOBALL et al., 1997).

No entanto, os mesmos dados de incubação e latência permitem alguma diferenciação entre as espécies: a temperatura de 10°C consegue retardar o crescimento das lesões causadas por *M. fructicola* e inibir a produção de conídios pelo patógeno em pelo menos 9 dias de incubação. Esta observação viabiliza o uso da refrigeração para armazenagem dos frutos em fase de comercialização sem que ocorram novas infecções e a disseminação do patógeno, por no mínimo 9 dias, pois o fungo está impossibilitado de se reproduzir nessas condições.

Na presença de frutos infectados por *M. laxa*, por outro lado, o armazenamento em câmaras frias não irá conter nem o avanço da colonização dos tecidos nem a frutificação do patógeno, com a possibilidade da infecção de novos frutos. Este fato mostra o perigo potencial desta espécie, devido à maior dificuldade de controle na pós-colheita dos frutos. Somente temperaturas altas, acima de 30°C, são capazes de retardar o crescimento das lesões e inibir a reprodução de *M. laxa*; temperaturas desse porte podem ser atingidas no campo, somente durante o dia, na época de safra.

Os diâmetros das lesões causadas pelas duas espécies, nas temperaturas ótimas, atingiram, praticamente, o mesmo diâmetro dos frutos. Essa agressividade dos patógenos foi devido ao estágio fenológico dos frutos, inoculados na maturação plena - estágio mais suscetível à infecção e colonização pelos agentes causais da podridão parda, relatado em cerejas inoculadas com *M. laxa* (XU; BERTONE; BERRIE, 2007), além de ter sido facilitada pela presença de ferimentos na superfície dos frutos, feitos logo antes da inoculação, como demonstrado por Fourie e Holz (2006), em estudo realizado com *M. laxa* em frutos de ameixeira no ponto de colheita. A maior influência da temperatura que da umidade relativa na colonização de frutos também foi observada para maçãs inoculadas com *M. fructigena* incubadas a 10 e 20°C, onde a colonização a 20°C foi melhor que a 10°C (XU; GUERIN; ROBINSON, 2001).

A esporulação das lesões nos frutos não apresentou relação com a temperatura ou com o período de câmara úmida. Resultados semelhantes foram observados *in vitro* para *M. fructicola*, porém *M. laxa* apresentou correlação entre produção de conídios e temperatura de incubação *in vitro*. Estudos com cancos de pessegueiro ocasionados por *M. fructicola* mostraram respostas altamente significativas da esporulação com relação à temperatura e ao molhamento, sendo necessárias no mínimo 12 horas de molhamento para ocorrer esporulação (WATSON; ZEHR; GRIMES, 2002).

A diferença visual observada com a esporulação dos patógenos nos frutos pode auxiliar o produtor e os técnicos a diferenciar o patógeno a campo, pois a identificação do organismo patogênico é pré-requisito para que as estratégias de controle mais apropriadas sejam abordadas.

O conhecimento dos processos de infecção e colonização destes patógenos, assim como das variáveis que interferem nesses processos, também é de

fundamental importância para a adoção de métodos de controle adequados. Os resultados dos estudos *in vivo* demonstram a dificuldade de obter um método de controle pós-colheita que seja eficiente para combater as perdas ocasionadas por estes agentes patogênicos. No entanto, o controle da doença em questão é de fundamental importância, devido ao grande prejuízo ocasionado por estes patógenos no campo e na comercialização no mercado atacadista (AMORIM et al., 2007). Dessa forma, faz-se necessário o uso de fungicidas no campo. Porém, o uso de agroquímicos de forma racional tem sido exigido cada vez mais, e por isso, sistemas de previsão baseados nas condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença têm sido desenvolvidos.

Luo et al. (2001) desenvolveram um sistema de previsão para a queima de flores em ameixeiras, causada por *M. fructicola*. Neste sistema a presença de menos de 4 horas de molhamento em temperaturas abaixo de 10°C não causa risco de ocorrência da queima das flores em nenhum estágio floral, 8 horas de molhamento são suficientes para um baixo risco da ocorrência da doença se a temperatura estiver entre 10 e 25°C em qualquer estágio floral e somente mais de 24 horas de molhamento a 20°C são responsáveis por altos riscos de ocorrência da doença. Para frutos de pessegueiro, no entanto, apenas 6 horas de molhamento já são suficientes para causar incidências próximas a 80% na temperatura menos favorável, para as duas espécies estudadas. Portanto, este sistema não pode ser usado para a tomada de decisão na pulverização de frutos. Outros estudos relatam a esporadicidade com que a queima de flores é encontrada em pomares de pêssigo e sua não relação com a incidência da podridão parda causada por *M. fructicola* na colheita (EMERY; MICHAILIDES; SCHERM, 2000). Mesmo em pomares de ameixa, a incidência natural da queima de flores não foi relacionada com a infecção latente em frutos nem com a presença de sintomas visíveis ocasionados por *M. fructicola* (LUO et al., 2005).

3.6 Conclusões

- Maiores períodos de incubação e latência são observados em temperaturas mais baixas para *M. fructicola* e em temperaturas mais altas para *M. laxa*.

- O período de câmara úmida não influencia a incidência, a incubação, a latência e a severidade da podridão parda causada por *M. fructicola* e *M. laxa* e a esporulação destes patógenos em pêssegos, porém todas as variáveis são influenciadas pela temperatura de incubação dos frutos.

- A refrigeração não pode ser usada como método de controle da podridão parda do pessegueiro.

Referências

AMORIM, L.; MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; GUTIERREZ, A.S.D.; ABREU, F.M.; GONÇALVES, F.P. Stone fruit injuries and damage at te wholesale market of São Paulo, Brazil. **Postharvest Biology and Technology** Amsterdam, v. 47, p. 353-357, 2008.

ABREU, F.M. **Quantificação de danos e controle pós-colheita de podridão parda (*Monilinia fructicola*) e podridão mole (*Rhizopus spp.*) em pêssegos**. 2006. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. Burlington: Elsevier, 2005. 948 p.

BIGGS, A.R.; NORTHOVER, J. Influence of temperature and wetness duration on infection of peach and sweet cherry fruits by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 1352-1356, 1988.

BOSTOCK, R.M.; WILCOX, S.M.; WANG, G.; ADASKAVEG, J.E. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 54, p. 37-50, 1999.

BYRDE, R.J.W.; WILLETTS, H.J. **The brown rot fungi of fruit: their biology and control**. Oxford: Pergamun Press, 1977. 171 p.

CORBIN, J.B. Factors determining the length of the incubation period of *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey in fruits of *Prunus* spp. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 14, n. 1, p. 51-60, 1963.

EMERY, K.M.; MICHAILIDES, T.J.; SCHERM, H. Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 853-857, 2000.

FACCHINELLO, J.C.; COUTINHO, E.F.; MARONDIN, G.A.B.; BOTTON, M.; MIO, D.L.M. **Normas técnicas e documentos de acompanhamento da produção integrada de pêssego**. Pelotas: Universidade federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2003. 95 p.

FAO. **Faostat**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 29 out. 2008.

FARIAS, R.M.; NUNES, J.L.S.; MARTINS, C.R.; GUERRA, D.S.; ZANINI, C.; MARONDIN, G.A.B. Produção convencional x integrada em pessegueiro cv. Marli na depressão central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 253-255, 2003.

FOURIE, P.H.; HOLZ, G. Germination of dry, airborne conidia of *Monilinia laxa* and disease expression on plum fruit. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 32, p. 19-35, 2003a.

_____. Germination of dry, airborne conidia of *Monilinia laxa* and disease expression on nectarine fruit. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 32, p. 9-18, 2003b.

_____. Wound infection of plum fruit by airborne conidia of *Monilinia laxa*. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 35, p. 435-439, 2006.

GUTIERREZ, A.S.D. **Danos mecânicos pós-colheita em pêsego fresco**. 2005. 123 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

KOBALL, D.C.; WILCOX, W.F.; SEEN, R.C. Influence of incubation-period humidity on the development of brown rot blossom blight of sour cherry. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 42-49, 1997.

HONG, C.; MICHAILIDES, T.J. Effect of temperature on the discharge and germination of ascospores by apothecia of *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 195-202, 1998.

LANDGRAF, F.A.; ZEHR, E.I. Inoculum sources for *Monilinia fructicola* in south California peach orchards. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 185-190, 1982.

LUO, Y.; MORGAN, D.P.; MICHAILIDES, T.J. Risk analysis of brown rot blossom blight of prune caused by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 759-768, 2001.

LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J.; MORGAN, D.P.; KRUEGER, W.H.; BUCHNER, R.P. Inoculum dynamics, fruit infection, and development of brown rot in prune orchards in California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 1132-1136, 2005.

MAIA, M.L.; AMARO, A.A.; GONÇALVES, J.S.; SOUZA, S.A. Produção e mercado de pêra e pêsego no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 33-48, 1996.

MARTINS, C.R.; CANTILLANO, R.F.F.; TREPTOW, R.; FONSECA, R.M.; ROMBALDI, C.V. Manejo da cobertura vegetal na conservação e qualidade pós-colheita de pêssegos (*Prunus persica* (L.) Batsch) cv. Chimarrita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 1, p. 55-58, 2001.

MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; GUTIERREZ, A.S.D.; JACOMINO, A.P.; AMORIM, L. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado atacadista de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 5-10, 2006.

MARTINS, M.C.; BETTI, J.A.; LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JUNIOR, R.P.; AMORIM, L. Doenças das rosáceas de caroço. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap. 62, p. 545-557.

MICHAILIDES, T.J.; MORGAN, D.P. Influence of fruit-to-fruit contact on the susceptibility of French prune to infection by *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 1416-1424, 1997.

MICHAILIDES, T.J.; LUO, Y.; MA, Z.; MORGAN, D.P. **Brown rot of dried plum in California: new insights on an old disease**. 2007. Disponível em <<http://www.apsnet.org/online/feature/prune/>>. Acesso em; 17 nov. 2008.

OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIGGS, A.R. Brown rot. In: OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIRD, G.W.; RITCHIE, D.F.; URIU, K.; UEYMOTO, J.K. (Ed.). **Compendium of stone fruit diseases**. Saint Paul: APS, 1995. chap. 1, p. 7-10.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 13-34, 1996.

SANHUEZA, R.M.V. Outras estratégias de pesquisa e desenvolvimento na produção integrada de frutas. In: SEMINÁRIO SOBRE PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS, 2., 2000, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2000. p. 60-63.

SATO, G.S. Produção de pêssegos de mesa e para a indústria no Brasil **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 61-63, 2001.

SOUZA, D.C. **Progresso temporal e espacial de epidemias da podridão parda do pessegueiro**. 2006. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

TAMM, L.; MINDER C.E.; FLÜCKIGER, W. Phenological analysis of brown rot blossom blight of sweet cherry caused by *Monilinia laxa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 401-408, 1995.

TIAN, S.P.; BERTOLINI, P. Effect of temperature during conidial formation of *Monilinia laxa* on conidial size, germination and infection of stored nectarines. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 635-641, 1999.

TIBOLA, C.S.; FACHINELLO, J.C.; GRÜTZMACHER, A.D.; PICOLOTTO, L.; KRÜGER, L. Manejo de pragas e doenças na produção integrada e convencional de pêssegos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 215-218, 2005.

TODA fruta. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br/>>. Acesso em: 11 nov. 2008.

WADE, G.C.; CRUICKSHANK, R.H. The establishment and structure of latent infections with *Monilinia fructicola* on apricots. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, p. 95-106, 1992.

WATSON, W.A.; ZEHR, E.I.; GRIMES, L.W. Influence of temperature and wetting period on inoculum production by *Monilinia fructicola* in peach twig cankers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 666-668, 2002.

WEAVER, L.O. Effect of temperature and relative humidity on occurrence of blossom blight of stone fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 1136-1153, 1950.

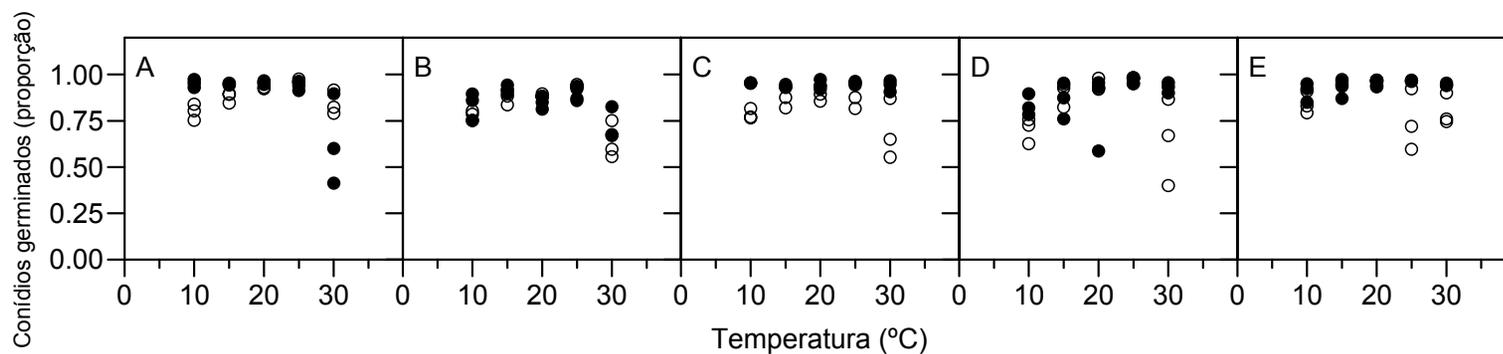
WILLETTS, H.J.; HARADA, Y. A review of apothecial production by *Monilinia* fungi in Japan. **Mycologia**, New York, v. 76, p. 314-325, 1984.

XU, X.-M.; BERTONE, C.; BERRIE, A. Effects of wounding, fruit age and wetness duration on the development of cherry brown rot in the UK. **Plant Pathology**, Burlington, v. 56, p. 114-119, 2007.

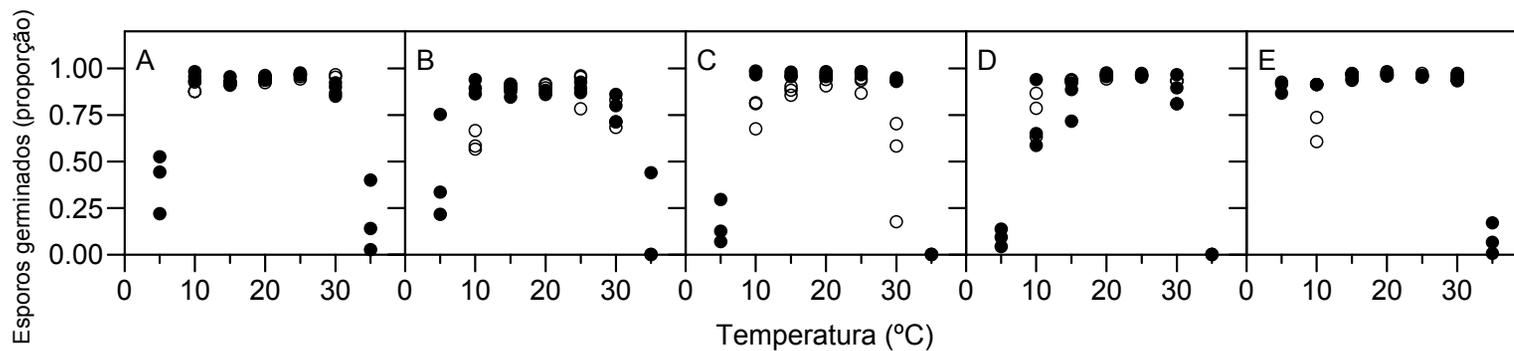
XU, X.-M.; GUERIN, L.; ROBINSON, J.D. Effects of temperature and relative humidity on conidial germination and viability, colonization and sporulation of *Monilinia fructigena*. **Plant Pathology**, Burlington, v. 50, p. 561-568, 2001.

ANEXOS

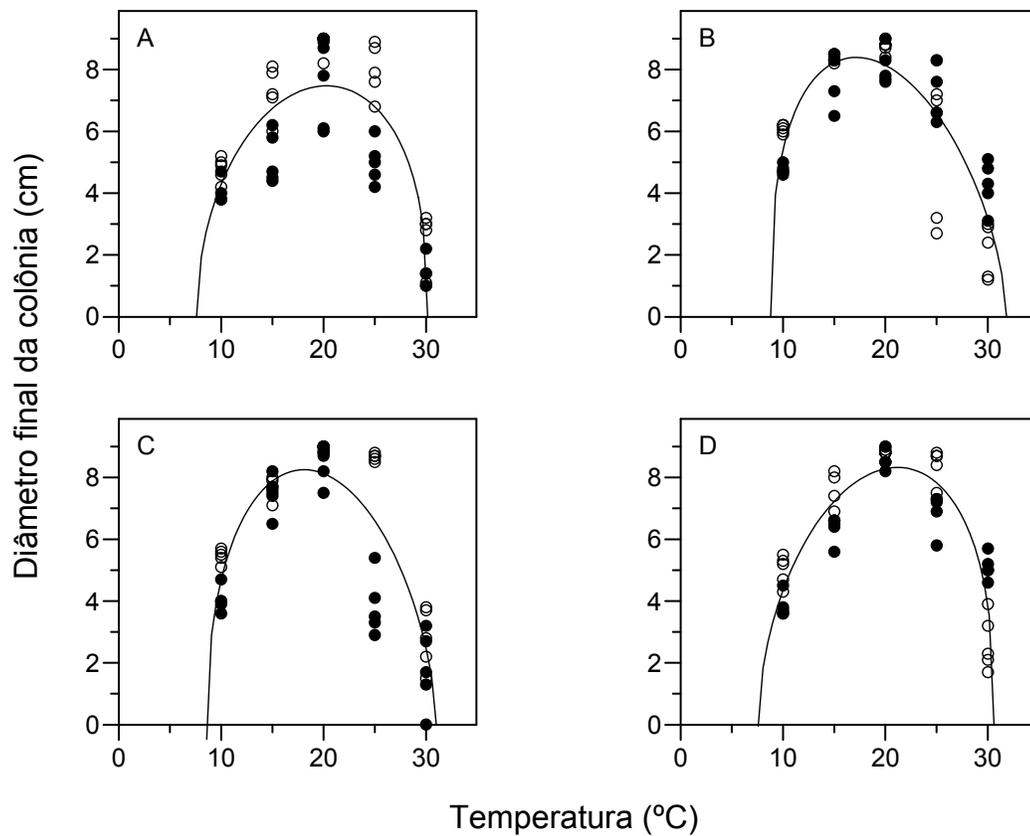
ANEXO A - Proporção de esporos germinados sob 36 horas de molhamento em diversas temperaturas. As figuras A – D representam os isolados de *fruticola* e a figura E representa o de *M. laxa*. Símbolos brancos representam dados do primeiro experimento e símbolos pretos representam dados do segundo experimento.



ANEXO B - Proporção de esporos germinados sob 48 horas de molhamento em diversas temperaturas. As figuras A – D representam os isolados de *M. fruticola* e a figura E representa o de *M. laxa*. Símbolos brancos representam dados do primeiro experimento e símbolos pretos representam dados do segundo experimento.



Anexo C - Curvas geradas pelo modelo beta para o crescimento micelial dos isolados A, B, C e D de *M. fructicola* sob influência da temperatura. Símbolos brancos representam os diâmetros finais das colônias (cm) no primeiro experimento e símbolos pretos representam os diâmetros no segundo experimento



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](#)