

Caracterização e controle das doenças de verão



Rosa Maria Valdebenito Sanhueza¹
Amauri Bogo³
Rufino Fernando Flores Cantillano⁵
Marciel Stadnik⁷
Vinícius Adão Bartnicki⁹
Leonardo Araújo¹¹

Walter Ferreira Becker²
Luis Antonio Suíta de Castro⁴
Yoshinori Katsurayama⁶
Emerson Del Ponte⁸
Carla Cassol Comparin¹⁰
Piérri Spolti¹²

1. INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus x domestica* Borkh) destaca-se no cenário nacional pelo volume e área comercializada. Atualmente, a produção de maçãs é uma atividade consolidada no Brasil com grande importância sócio-econômica no país. Dentre os estados produtores no Brasil, destacam-se Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo (MELLO, 2006). Um dos fatores que mais compromete o aumento da produção desta cultura são as chamadas doenças de verão que causam podridão de frutos, entre elas a podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*, sin. *B. berengeriana*), a podridão amarga (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C.*

¹ Eng. Agrônoma, Pesquisadora da PROTERRA, BR 116, nº 7320 – Sala 02, CEP 95200-000, Vacaria, RS. E-mail: rosamaria@proterra.agr.br

² Eng. Agrônomo, Pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/EPAGRI/SC, Caixa Postal 591, CEP 89500-000, Caçador, SC. E-mail: wbecker@epagri.sc.gov.br

³ Eng. Agrônomo, Professor da Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, Avenida Luis de Camões, 2090, CEP 88520-000, Lages, SC. E-mail: 2974509@udesc.br

⁴ Eng. Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas, RS. E-mail: suita@cpact.embrapa.br

⁵ Eng. Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas, RS. E-mail: fcantill@cpact.embrapa.br

⁶ Eng. Agrônomo, Pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/EPAGRI/SC, Caixa Postal 81, CEP 88600-000, São Joaquim, SC. E-mail: katsuray@epagri.sc.gov.br

⁷ Eng. Agrônomo, Professor da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, CP 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC. Email: stadnik@cca.ufsc.br

⁸ Eng. Agrônomo, Professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de de Fitossanidade, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS. Email: emerson.delponte@ufrgs.br

⁹ Tecnólogo em Agropecuária, Aluno de Doutorado da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Avenida Luis de Camões, 2090, CEP 88520-000, Lages, SC. E-mail: vinibart@hotmail.com

¹⁰ Bióloga, Aluna de Doutorado da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Avenida Luis de Camões, 2090, CEP 88520-000, Lages, SC. E-mail: carlacomparin@yahoo.com.br

¹¹ Eng. Agrônomo, Aluno de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, UFSC, CP 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC. Email: leoara02@yahoo.com.br

¹² Eng. Agrônomo, Aluno de Doutorado do Departamento de Fitossanidade - Faculdade de Agronomia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS. E-mail: pierrispolti@gmail.com

acutatum), e a podridão “olho-de-boi” (*Cryptosporiopsis perennans*) (VALDEBENITO SANHUEZA, 2001).

A Mancha Foliar da Glomerela (MFG; sinonímia Mancha Foliar da Gala), foi observada pela primeira vez em 1983 em pomares de macieira no estado do Paraná 1983 (LEITE JÚNIOR et al., 1988) e posteriormente se disseminou na região sul do Brasil atingindo, inclusive, altitudes acima de 1.400 metros (KATSURAYAMA; BONETI et al., 1999). A MFG é causada principalmente por *Colletotricum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, porém outras espécies do gênero, entre elas *C. acutatum* J.H. Simmonds e *Colletotrichum* sp., podem estar associadas à doença, sendo, contudo, pouco frequentes (BONETI et al., 2002). Longos períodos de molhamento foliar, alta umidade relativa do ar e temperaturas elevadas são as principais condições predisponentes à doença (CRUSIUS et al., 2002; HAMADA, 2005). Desde então, a frequência da doença vem aumentando, sendo que atualmente ocorre em praticamente todas as regiões. Devido ao intenso desfolhamento que provoca, a MFG causa sérios prejuízos e, atualmente representa uma das principais doenças de macieira (BONETI et al., 2002). Os sintomas iniciais da doença são manchas vermelho-arroxeadas, já visíveis 48h após o início da infecção, que evoluem para manchas necróticas com formato irregular. As folhas lesionadas amarelecem e caem precocemente, entre oito a dez dias após o aparecimento dos primeiros sintomas em temperaturas acima de 20°C (CRUSIUS et al., 2002).

Nas doenças que se manifestam em pós-colheita e causam maiores perdas de maçãs no Brasil se inclui a podridão olho-de-boi cujo agente causal foi identificado como *Cryptosporiopsis perennans*/*Pezicula malicorticis*) (VALDEBENITO SANHUEZA et al., 2004). A presença deste patógeno foi documentada somente em 1996. Entretanto, supõe-se que o fungo tenha se estabelecido no país com antecedência à constatação visto que ele tem sido isolado de cancores antigos de macieiras com mais de 20 anos. Contudo, é provável que de igual forma que outras regiões do mundo que registraram a presença desta doença em pomáceas, outras espécies de *Cryptosporiopsis* ocorram no país. Isto somente poderá ser definido em levantamentos mais abrangentes que os feitos até o presente. A podridão olho-de-boi nas maçãs é marrom-clara com o centro amarelo-pálido, de forma mais ou menos circular, às vezes com margens marrom-escuras ou avermelhadas, deprimida, de textura firme e desenvolvimento lento. Internamente, os tecidos são de cor marrom amarelado e firme. Sintomas da doença são observados ao redor de lenticelas e ferimentos, na cavidade peduncular e calicinar e ao redor dos carpelos.

Esta doença foi relatada em maçãs nos USA em 1890 e ocorre em USA Europa e Ásia e no Chile. O nome comum deste sintoma tem sido modificado com o tempo e local de detecção da moléstia. Assim, inicialmente, foi conhecida como “podridão amarga” e a seguir como podridão do tipo “alvo de tiro”, “podridão por `Gloeosporium` e, no presente, como podridão olho-de-boi, pela semelhança do alvo com o olho do boi. A etiologia da podridão olho-de-boi tem sido bastante discutida e, nos anamorfos citados se encontram espécies dos gêneros *Gloeosporium* e *Cryptosporiopsis* e nos teleomorfos, inicialmente as espécies foram

incluídas no gênero *Neofabraea*, posteriormente no gênero *Pezizula* e mais recentemente, novamente colocadas no gênero *Neofabraea*. Ao analisar os dados taxonômicos publicados, Ogawa e English (1991), concluíram que *C. perennans* seria o anamorfo de *P. malicorticis*. Posteriormente, estudos morfológicos e fisiológicos de *Cryptosporiopsis* publicados por Dugan et al. (1993) concluíram que as duas espécies de *Cryptosporiopsis* descritas na literatura, *C. curvispora* e *C. perennans*, não tinham diferenças consistentes, e deveriam ser consideradas sinônimos. Este critério foi adotado para a descrição do patógeno no Brasil

A primeira constatação da podridão “olho-de-boi” no Brasil ocorreu nos ciclos vegetativos de 1995 e 1996 em maçãs das cultivares Fuji e Golden Delicious, colhidas em pomares dos municípios de Tainhas, Caxias do Sul, Vila Oliva e Vacaria no Rio Grande do Sul e em Fraiburgo, Santa Catarina (VALDEBENITO SANHUEZA, 2001). A podridão “olho-de-boi” destaca-se atualmente como uma das principais doenças pós-colheita na cultura da maçã, ocorrendo em todas as regiões produtoras do Brasil, causando perdas que variam entre 13 e 16% do total dos frutos de refugo.

O agente causal da podridão “olho-de-boi” foi identificado em 1996 no Brasil como *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller e Childs) e sua posição taxonômica foi confirmada no Instituto de Micologia da Holanda (CBS), mas supõe-se que o fungo tenha se estabelecido no país com antecedência à constatação, visto que ele tem sido isolado de cancrios antigos de macieira com mais de 20 anos (VALDEBENITO SANHUEZA et al., 2004). É provável que de igual forma que outras regiões do mundo que registraram a presença desta doença em pomáceas, outras espécies de *Cryptosporiopsis* ocorram no Brasil. Esta doença também ocorre na Europa, Ásia, Chile, EUA, porém o nome comum da doença tem sido modificado com o tempo e o local de detecção da moléstia (VERKLEY, 1999).

O tema “Caracterização e controle das doenças de verão”, para a cultura da macieira, neste Projeto, foi tratado em oito experimentos, os quais são apresentados e detalhados a seguir.

Comparação do método Elisa com dois métodos de coleta de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* em Vacaria, RS

Estudos do processo de infecção desta doença mostraram que o período latente é muito curto e os sintomas podem surgir até 48h após o início da infecção. A doença afeta apenas as cultivares de macieiras descendentes da ‘Golden Delicious’. Desta maneira, a ‘Gala’, uma das principais cultivares plantadas no sul do Brasil, apresenta alta suscetibilidade, enquanto a ‘Fuji’, outra cultivar importante, não é afetada (BONETI et al., 2002).

A pulverização das macieiras com fungicidas com ação preventiva, repetida em intervalos de dez dias sempre que houver acúmulo de 30 mm ou mais de chuva, contando a partir da última pulverização, é o método mais utilizado para o controle da MFG, porém, não é muito eficiente quando a pressão de inoculo é muito alta (BONETI et al., 2002). Sistemas de Alerta para a doença estão disponíveis para a região de São Joaquim (SC) e em Vacaria (RS) pelo sistema SISALERT-MAÇÃ, mas

as vantagens destes sistemas são reduzidas pelo fato de não se contar com produtos com ação curativa e pela falta de métodos para detecção do patógeno.

Estudos de detecção de propágulos de patógenos que se disseminam pela água têm sido feitos por diversos autores. Pusey (1989) e Fitzel e Peak (2008) descrevem o uso de coletores de água que chuva que escorre pelos ramos de plantas frutíferas para monitoramento do patógeno. Este experimento teve por objetivo estudar, comparativamente, o sistema Elisa (comercializado para detecção de *Colletotrichum*) e a coleta de água de chuva e lavagem de folhas para monitorar a presença do patógeno nos pomares.

Comparação de modelos de previsão da mancha da gala.

O emprego de táticas de resistência, no controle da doença é ainda inexistente de modo que o uso de fungicidas, a intervalos máximos de 10 dias se faz necessário. Estratégias de controle de doenças dentro da agricultura de precisão são verificadas na adoção de sistemas de alerta, já adotadas em diversas culturas em países desenvolvidos e que recentemente experimenta impulso no Brasil (BERTON; MELZER, 1989; MACHARDY, 1996). Sistemas de previsão auxiliam os agricultores na tomada de decisão, uma vez que indicam os períodos de condições favoráveis ao desenvolvimento das doenças e, assim, os momentos mais apropriados para a realização das pulverizações. Simulações em laboratório e casa-de-vegetação permitem selecionar variáveis meteorológicas simples e de fácil obtenção como temperatura do ar, precipitação, período de molhamento foliar, umidade relativa, insolação, entre outras, na construção de um modelo, este, normalmente uma equação matemática (ZADOCKS; SCHEIN, 1979).

Face à necessidade de um controle racional da Mancha Foliar da Gala, na região do Alto Vale do Rio do Peixe alguns métodos de alerta para a Mancha da Gala foram avaliados (BECKER et al., 2004), necessitando de um estudo mais aprimorado da viabilização destes, com transmissão de dados teletransmitidos de maneira a agilizar o processo de tomada de decisão do momento adequado a proteção da cultura com fungicidas.

Caracterização do efeito dos fosfitos e de indutores de resistência sobre a MFG

A pulverização das macieiras com fungicidas com ação preventiva repetidos em intervalos de dez dias, sempre que houver acúmulo de 30 mm ou mais de chuva, contando a partir da última pulverização é o método mais utilizado para o controle da MFG, porém, não são muito eficientes quando a pressão de inoculo é muito alta (BONETI et al., 2002). Sistemas de Alerta para a doença estão disponíveis para a região de São Joaquim, pela CIDASC, e de Vacaria, pelo sistema Sisalert-maçã, mas as vantagens destes sistemas são restritas pelo fato de não se contar com produtos com ação curativa. Por não se conhecer fungicidas com ação curativa, recomenda-se que os tratamentos sejam efetuados preventivamente, no mais tardar a partir da constatação das primeiras lesões. Dentro do contexto do manejo integrado e baixa pressão de inoculo, fertilizantes à base de fosfitos vêm sendo empregados no controle de doenças de plantas frutíferas como o oídio (GEELLEN,

1999), e a sarna (BONETI; KATSURAYAMA, 2005) em macieira e a podridão do pé em mamoeiro (DIANESE et al., 2007). Segundo Cohen e Coffey (1986), os fosfitos tem acidez característica, já que o íon fosfito (HPO_3^{2-}) é oriundo do ácido fosforoso (H_3PO_3), são compostos não fitotóxicos e apresentam alta atividade fungicida na planta. O fosfito é translocado sistematicamente na planta via floema e xilema, sendo que sua absorção pela planta é via floema através da associação deste com fotoassimilados. Ele é uma forma não metabolizável de fósforo que é absorvida rapidamente pelas folhas, podendo permanecer e acumular na planta por até 150 dias (GUEST; GRANT, 1991; MALUSA; TOSI, 2005).

Existem controvérsias sobre o modo de ação dos fosfitos sobre doenças de plantas. Foi relatado que eles podem atuar diretamente sobre o patógeno (FENN; COFFEY, 1984) e/ou pela indução de resistência (SAINDRENANT et al., 1988). Recentemente em trabalhos com macieira, Araújo et al. (2008) mostraram o efeito curativo de 24 com fosfito de potássio OO-40-20 (3 $\mu\text{L}/\text{mL}$), e reduziram em 90 % na severidade da doença, em relação à testemunha. Já aplicações preventivas do produto aos 6 ou 3 dias antes da inoculação, não diminuíram a severidade da doença. Boneti e Katsurayama (2005) avaliaram fosfitos de potássio no controle da sarna (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter), em condições de casa-de-vegetação, e obtiveram controle dessa doença quando com o produto foi pulverizado 7 dias antes da inoculação. A indução de resistência é um método moderno na proteção de plantas e mostra-se uma alternativa menos agressiva à saúde humana e ao equilíbrio de agroecossistemas. Entre os indutores, polissacarídeos obtidos de algas marinhas, tal como a ulvana tem demonstrado potencial para elicitar respostas de defesa em plantas, em particular à MFG em macieira com pulverizações seis dias antes da inoculação com *C. gloeosporioides* em casa-de-vegetação (ARAUJO et al., 2008).

Há relatos de campo e da literatura (BRACKMAN et al., 2005; DIANESE et al., 2007; SÔNEGO et al., 2003), formulações de fosfitos comercializados podem apresentar eficiência diferente no controle de doenças. Apesar disso e do seu uso intensivo na pomicultura brasileira, inexistente atualmente uma avaliação da eficiência de fosfitos no controle da MFG. Desta forma, o objetivo deste experimento foi avaliar os mecanismos de ação dos fosfitos e do polissacarídeo algal ulvana.

Sobrevivência, fisiologia e variabilidade de isolados de *Cryptosporiopsis* sp. associados a doença olho-de-boi em macieira

A etiologia da podridão “olho-de-boi” tem sido bastante discutida. Nos anamorfos citados, se encontram espécies do gênero *Gloeosporium* e *Cryptosporiopsis* e nos teleomorfos as espécies foram incluídas no gênero *Neofabraea*, posteriormente no gênero *Pezicula*, e mais recentemente colocadas novamente no gênero *Neofabraea* (JONG et al., 2001 apud MAFFIOLETTI, 2007). Quatro espécies do gênero *Neofabraea* são conhecidas como causadoras da podridão “olho-de-boi” em maçãs: *N. malicorticis* (Jacks), *N. perennans* (Kienholz), *N. alba* (Guthrie) e *Neofabraea* sp. nov, esta determinada por Jong et al. (2001 apud HENRIQUEZ et al., 2004).

Neofabraea malicorticis (*Cryptosporiopsis curvispora*) é encontrada principalmente em áreas úmidas do Noroeste do Pacífico e causa o cancro antracnose em macieira. A leste do Pacífico se encontra *Neofabraea perennans* (*Cryptosporiopsis perennans*), causando o cancro perene da macieira. *Neofabraea alba* (*Phlytoma vagabunda*) tem sido documentada na América do Norte, Europa, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia causando podridão “olho-de-boi” em maçãs. Já a nova espécie, *Neofabraea* sp. nov. é representada por isolados da Nova Escócia, Canadá e Portugal (VERKLEY, 1999; HENRIQUEZ et al., 2004; GARIEPY et al., 2005).

N. malicorticis e *N. perennans* são consideradas uma única espécie na Europa, enquanto que na América do Norte são consideradas espécies distintas (HENRIQUEZ et al., 2004). Morfologicamente, *N. malicorticis* produz macroconídios e microconídios curvados ou em forma de vírgula, já *N. perennans* produz macroconídios e microconídios retos ou levemente curvados. Em áreas onde se encontra *N. malicorticis* e *N. perennans* juntas, isolados com conídios de tamanho intermediário e morfologia entre as duas espécies são ocasionalmente encontrados (GARIEPY et al., 2005). Apenas macroconídios curvados são produzidos por *N. alba*. A nova espécie, *Neofabraea* sp. nov. produz microconídios e macroconídios semelhantes aos da *N. perennans* (HENRIQUEZ et al., 2004).

Diferenças morfológicas entre os patógenos que causam a podridão “olho-de-boi” em maçã são sutis e muitas vezes coincidem, dificultando a correta identificação do agente causal (HENRIQUEZ et al., 2004). Porém, espécies causadoras da podridão “olho-de-boi” são tradicionalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e fisiológicos. Características como coloração e aspecto de colônias, dimensões e septação de conídios, formação de cancras e virulência de isolados têm sido usadas para diferenciar espécies morfológicamente próximas como *Neofabraea malicorticis* e *N. perennans* (DUGAN et al., 1993; GARIEPY et al., 2005). Outras características fisiológicas como susceptibilidade a temperaturas e atividade enzimática em substratos sólidos específicos também são usadas no processo de identificação de novas espécies. Em particular, a atividade enzimática demonstra a maior ou menor capacidade de fungos em produzir enzimas como lípases, proteases, amilases, entre outras. Este é um método simples para diferenciar espécies ou caracterizar isolados de uma mesma espécie. A análise da produção enzimática de fungos em meio sólido proposta por Hankin e Anagnostakis (1975) é considerado um método simples e rápido para a identificação de variantes genéticas em uma população, pela presença ou ausência de enzimas específicas, havendo a possibilidade de associação entre a produção de enzimas extracelulares do patógeno e seu grau de virulência com o hospedeiro (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

O objetivo deste experimento foi caracterizar morfo-fisiologicamente onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp através da característica morfológicas das culturas crescidas em diferentes meios, morfologia e dimensões (relação comprimento/largura) dos conídios, sensibilidades a temperaturas (4, 5, 30 e 31°C), atividade enzimática, patogenicidade em frutos sadios e indução da formação de cancras para obtenção da fase sexuada de apotécio do fungo.

Etiologia e caracterização da infecção das maçãs por *Cryptosporiopsis perennans*

Devido ao longo período de incubação da doença, resultante de infecções latentes iniciadas em qualquer fase de desenvolvimento dos frutos (EDNEY et al., 1960), as estratégias de manejo da POB são enfocadas na aplicação de fungicidas no período final de maturação dos frutos (BRYK, 2001; HENRÍQUEZ et al., 2008). Para essa situação, o uso de fungicidas deve visar à redução da densidade de inoculo na superfície dos frutos nos períodos de maior risco de infecções (SPENCER; WILKINSON, 1958). Apesar da proteção com fungicidas, fracassos no controle dessa doença são recorrentes, principalmente em anos com ambiente ou fonte de inoculo favoráveis a epidemia (HENRÍQUEZ et al., 2008). Assim, tratamentos erradicantes na fase de dormência das plantas visando à redução do inoculo podem ser uma prática importante uma vez que a poda seletiva para a eliminação de ramos doentes é de difícil execução devido à grande demanda de mão-de-obra e tempo (LALANCETTE; ROBISON, 2002). Para a POB, os relatos de tratamentos de inverno na literatura limitam-se ao uso de fungicidas mercuriais ou a base de arsênio, não registrados para a cultura da macieira no sul do Brasil, ou em relatos de experimentos com infecções induzidas por inoculação artificial restringindo as análises à produção de esporos, sem a quantificação de danos (EDNEY et al., 1960; HENRÍQUEZ et al., 2006). Apesar do consenso quanto à importância da população epífita na superfície dos frutos no desenvolvimento de podridões, especificamente àquelas com período latente (EMERY et al., 2000), não há, até onde se conhece relatos da quantificação da população de *Cryptosporiopsis sp.* nessas condições e o impacto de sua redução, por tratamentos erradicantes, no controle da doença.

O objetivo deste experimento foi determinar um meio seletivo para *C. perennans*, avaliar estratégias de manejo da POB com base no controle do inoculo inicial utilizando diferentes fungicidas com efeito erradicante que visam a redução do risco e aumento da eficiência do controle da doença em pomares tratados, bem como avaliar o potencial de uso de sais de fosfitos para o controle da podridão olho-de-boi, bem como estudar o seu modo de ação no patógeno e sua influência na atividade enzimática em maçãs inoculadas artificialmente.

Análise por microscopia de varredura do processo de infecção das maçãs por *Cryptosporiopsis perennans*

A utilização da técnica de microscopia de varredura para conhecer e documentar as características da relação patógeno-hospedeiro é uma das demandas para criar novas estratégias de controle dos patógenos. Para análises de frutos colonizados por fungos fitopatogênicos, vários métodos de preparação de amostras são descritos na literatura, os quais apresentam eficiência para visualização de materiais biológicos (HAYAT, 1972; SILVEIRA, 1989). Entretanto, devido à condição natural hidratada, todas as amostras biológicas apresentam relativa complexidade de processamento. O objetivo deste experimento foi caracterizar a colonização da epiderme de maçã por *C. perennans* utilizando microscopia de varredura, presentes na superfície de maçãs inoculadas.

Avaliação do efeito de protetores solares

As frutas mais suscetíveis ao dano de sol são aquelas que se encontram na periferia da planta, localizadas em ramos fracos e muito longos, que logo se curvam devido ao seu próprio peso (YURI et al., 2000a; YURI, 2001). Os frutos que se desenvolvem na sombra ou com luz indireta são mais suscetíveis à queimadura de sol quanto mais tarde são expostos a radiação solar em períodos de alta temperatura, comparados com aqueles que recebem radiação solar durante todo seu crescimento. Estes últimos são capazes de gerar um mecanismo de resistência ao dano relacionado com proteínas do citoplasma (YURI et al., 2000a e b; YURI, 2001; PISKOLCZI et al., 2004). A fruta vai perdendo a capacidade de resistir a altas temperaturas na medida que se aproxima da maturação de colheita, isto pode dever-se a um problema metabólico próprio da mesma ou da menor possibilidade que tem de dissipar calor, dado que a relação superfície/volume da fruta diminui consideravelmente a partir de dezembro (YURI, 2001).

Este experimento teve como objetivos: a) Avaliar durante a temporada de 2007/2008 o efeito das aplicações do produto RAYNOX[®] na pré-colheita, de caráter preventivo, em maçãs das cultivares Fuji e Pink Lady[®] na incidência e severidade do dano de sol, na qualidade da fruta e comportamento pós-colheita; b) Verificar de que forma a radiação que chega ao fruto influencia na queima, e em qual momento ocorre o dano de sol e, se for possível integrar ao Sistema de Alerta (SISALERT); c) Avaliar o efeito do tratamento RAYNOX[®] sobre duas doenças de verão da maçã: *Cryptosporiopsis perennans* e *Botryosphaeria dothidea*.

Avaliação do efeito da temperatura e período de molhamento foliar na severidade da Mancha Foliar da Gala (MFG).

A Mancha Foliar da Gala é uma doença da macieira tipicamente brasileira. Sob temperatura elevada, acima de 20°C, o sintoma nas folhas surge 45 h após a inoculação, na forma de manchas difusas de cor marrom. As folhas infectadas podem ficar inteiramente marrons e cair por desidratação (temperatura elevada), ou amarelecer e cair em seguida (temperatura amena). Nos frutos, as lesões são deprimidas, circulares, de 1 a 2 mm de diâmetro, de cor marrom-clara a marrom-escura. Além disso, o período de incubação é mais longo, de 4 a 5 dias. O sistema de controle da MFG atualmente em uso consiste na aplicação preventiva de fungicidas de contato, a partir do final da floração da macieira (outubro) até o período pós-colheita da maçã (março). Isto resulta em grande número de pulverizações, principalmente de fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos.

Alguns estudos foram realizados visando o desenvolvimento de um modelo de previsão desta doença. O modelo (empírico) descrito por Bleicher et al. (1995) relaciona a epidemia da MFG à ocorrência de temperatura $\geq 18^{\circ}\text{C}$ e período de molhamento foliar (PMF) ≥ 14 horas ou 10 h ou mais de UR $\geq 90\%$ quando, então seria considerado um dia favorável (DF). E o controle seria recomendado quando ocorrerem 4 ou mais DF nos últimos 10 dias. Katsurayama et al. (2000), com os dados meteorológicos coletados nas principais regiões pomícolas de Santa Catarina, desenvolveram um modelo (empírico) de previsão e controle da MG baseado na

ocorrência de 3 ou mais dias consecutivos de chuva, temperatura $\geq 15^{\circ}\text{C}$ e PMF ≥ 10 h. Becker et al. (2004), após 4 anos de ensaios de campo, concluíram que o modelo desenvolvido por Katsurayama et al. (2000) é mais eficiente que o sistema convencional de tratamento fitossanitário, pois permite uma redução significativa no número de pulverizações, sem prejuízo do nível de controle da doença ou da qualidade da maçã. Mais recentemente, Becker (2007) comparando vários modelos de previsão concluiu que o modelo de Fitzell (FITZELL et al., 1984) é mais eficiente que o modelo acima na redução da doença nas folhas e frutos. Entretanto, o modelo de Fitzell aumentou em 50% o número de pulverizações.

Mais tarde, Katsurayama e Boneti (2006) ajustaram o modelo empírico acima para contemplar as temperaturas $< 15^{\circ}\text{C}$, bem como os PMF ≥ 20 h/dia e, com isso, caracterizar mais precisamente os períodos críticos da doença. No novo modelo, o valor diário de severidade (VDS) passou de 0 ou 1 para valores entre 0 e 2, em escala de 0,5 unidade, e a recomendação de controle quando a SVDS dos 3 dias consecutivos atingir 2,5 unidades. Crusius et al. (2002) desenvolveram, em ensaios em condições controladas, um modelo para previsão da MG baseado na interação entre a temperatura e o período de molhamento foliar na severidade da MG (modelo indutivo). Trabalhos subsequentes indicaram a necessidade de ajustar este modelo, tanto para PMF menores que 12 h, quanto para temperaturas inferiores a 14°C .

Este experimento teve como objetivo contribuir para o aperfeiçoamento do modelo de previsão da MG através da quantificação em condições controladas do efeito da temperatura e período de molhamento foliar na severidade da MFG (modelo indutivo).

2. METODOLOGIA

Experimento 1: Comparação do método Elisa com dois métodos de coleta de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* em Vacaria, RS

1.1. Avaliação do Kit Adgen Identikit para *Colletotrichum sp*

Folhas da cultivar Maxi Gala foram inoculadas por aspersão com suspensões de conídios do isolado CNPUV/Va de *C. gloeosporioides*, obtido pela raspagem de uma colônia do fungo cultivada em meio BDA por 20 dias. O fungo foi isolado de uma maçã proveniente de São Joaquim, SC. Na inoculação foi utilizado um volume de 4 ml por folha/planta. Após a inoculação as folhas foram coletadas assim que secas. O tempo de inoculação e coleta das folhas foi de aproximadamente de 45 minutos. Para o teste ELISA, seguiu-se o protocolo proposto pelo fabricante. As amostras foram consideradas positivas quando se observou absorvância duas vezes superior ao controle negativo.

1.2. Detecção de propágulos que colonizam gemas, segmentos de ramos, flores e frutos.

O estudo foi conduzido em uma área de macieiras 'Pink Lady[®]' com histórico de infecção da mancha foliar da Gala. As estruturas foram colocadas em uma solução de água esterilizada (AE) e Tween 80 0,001%, expostas ao ultra-som por 30 segundos e a suspensão agitada e amostras transferidas para placas de Petri contendo o meio BDA Acidificado. As placas foram incubadas por cinco dias a temperatura de 22 °C e fotoperíodo de 12 horas. Na avaliação contou-se o número de colônias de *C. gloeosporioides* em cada placa seguindo da identificação com auxílio de microscopia.

1.3. Determinação do patógeno na água de chuva que escorre nas macieiras

Coletores de água de chuva foram desenvolvidos com garrafas abertas na base e colocadas invertidas abraçando os troncos das macieiras de forma a coletar a água escorrida da parte aérea das plantas. A partir de outubro de 2007, quinzenalmente, foi coletada a água dos coletores. A suspensão foi agitada e amostras transferidas para placas de Petri contendo o meio BDA acidificado e em meio semi-seletivo. Incubaram-se as placas por cinco dias a temperatura de 22 °C e fotoperíodo de 12 horas. Na avaliação, contou-se o número de colônias de *C. gloeosporioides* em cada placa, seguindo da identificação com auxílio de microscopia. A seguir, foram instalados quatro coletores de água de chuva no período de setembro de 2008 a fevereiro de 2009, onde foram feitas coletas quinzenais e preparada cultura de amostras. Nas coletas de água das garrafas foi observada a ocorrência de sintomas nas plantas dos coletores e nas duas plantas vizinhas.

Experimento 2: Comparação de modelos de previsão da Mancha Foliar da Gala

O experimento foi conduzido em pomar de Royal Gala/M9/Maruba (quatro anos), no espaçamento de 1,5m x 3,5m. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições e a parcela formada por nove plantas, com área útil de cinco plantas centrais. A avaliação do progresso da doença foi feita nas cinco plantas e em quatro ramos (opostos) por planta a cada sete dias a partir da brotação das folhas e nos frutos por ocasião da colheita destes. Os seguintes modelos foram avaliados:

- 1) Modelo Australiano (FITZELL et al., 1984): $[Y = -16,114 + 1,120T - 0,0225T^2 + 1,0862 \ln t]$; (PMF)
- 2) Modelo $\Sigma(VSD + cMFG)$ 7 dias, iniciado com chuva $\geq 2\text{mm}$ (BECKER, 2007)
- 3) Modelo EECd (BECKER; MONDARDO, 2004)
 $[Y = 60,92 / 1 + (16,2859 * (\exp(-0,2449 * M))) \times 0,9698 * (((Tm - 15) * -0,00524) * ((34,01 - Tm) * -0,2515))]$; (PMF)

- 4) Modelo VSD=13 (PMF)
- 5) 2 PC iniciado com chuva ≥ 2 mm (modelo padrão); (PMF)
- 6) Testemunha controle padrão 7/7 dias

Observações:

- 1) T; T_m= temperatura média no período de molhamento. t ; M= período de molhamento (horas com pmf)
- 2) Períodos de molhamento separados por tempo < 6 horas com UR >65% serão combinados.
- 3) O fungicida não será reaplicado se o período crítico ocorrer no prazo de sete dias da última pulverização.
- 4) Restabelecer a pulverização se no prazo de 7 dias da ultima pulverização o somatório da precipitação (chuva) for ≥ 30 mm.
- 5) Pulverização, com aparelho costal motorizado, marca Maruyama, com caneta de três bicos modelo Yamaha HV-3.
- 6) Avaliar o início da primeira lesão com 3, 5 e 7 dias após cada PC.
- 7) Pulverização adicional no controle da sarna (dodine) e de insetos (fenitrothion; methidathion) quando necessária e na dosagem recomendada pela CTPIM.

Para a pulverização do ciclo 2007/08 foi utilizado o fungicida metiram 70% (300g pc/hl) de acordo com a ocorrência de períodos críticos para cada um dos cinco sistemas de alerta comparados ao sistema de calendário. O volume de calda/ha foi crescente (500-1000L) conforme o enfolhamento da planta. Para a pulverização do ciclo 2008/09 foi utilizado o fungicida mancozeb 80% (Manzate 240g pc/hl) de acordo com a ocorrência de períodos críticos para cada um dos cinco sistemas de alerta comparados ao sistema de calendário. O volume de calda/ha foi o de ponto de escorrimento conforme o enfolhamento da planta.

No período de dormência das plantas foi executada as atividades de manutenção do pomar como poda de inverno e eliminação de ramos doentes, tratamentos químicos com fungicidas erradicantes (calda sulfocálcica e cúprica, roçadas, aplicação de inseticidas para controle de pulgão lanígero. Na entrada da primavera a condução do pomar foi dada pela fixação de plantas e arqueamento de ramos. A quebra de dormência foi feita com aplicação de dormex e óleo mineral. Na segunda quinzena de setembro a estação agrometeorológica e termo-higro-umectógrafo foram re-instalados no pomar para início da coleta de dados. No terceiro dia, a estação agrometeorológica parou de funcionar e os dados de temperatura, molhamento foliar e umidade relativa foram registrados apenas pelo termo-higro-umectógrafo. A precipitação pluviométrica foi registrada a partir de uma estação agrometeorológica distante 200 m do pomar.

Diariamente os dados climatológicos são anotados e avaliados nos diferentes modelos de alerta. Para cada período crítico relativo ao modelo em questão é feita a pulverização das parcelas que constituem o respectivo tratamento. Avaliações a cada três, cinco e sete dias são conduzidas após cada período crítico para determinar o início dos primeiros sintomas. Após a detecção do primeiro sintoma as avaliações são semanais para determinação do progresso da Mancha Foliar da Gala.

Experimento 3: Caracterização do efeito dos fosfitos e de indutores de resistência sobre a MFG

3.1. Mecanismos de resistência inata e adquirida à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc em macieira (*Malus domestica* Borkh*).

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis SC. Plântulas de macieira suscetíveis foram pulverizadas até o ponto de escorrimento (aproximadamente 4 mL/plântula) com auxílio de uma pistola de pintura acoplada a um compressor de ar aos seis dias antes da inoculação (DAI). Plântulas suscetíveis (testemunha) e resistentes foram pulverizadas com água destilada. As plântulas tratadas permaneceram em bancadas da casa-de-vegetação até serem inoculadas. Seis dias após a pulverização com água ou ulvana as plântulas foram inoculadas com uma suspensão de 3×10^5 conídios/mL do isolado MANE147 de *Colletotrichum gloeosporioides* até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as plântulas permaneceram em câmara úmida no escuro a 100% UR e 20 ± 5 °C por 24h.

A severidade da MFG foi avaliada diariamente de quatro a dez dias pós-inoculação (DPI), baseada na estimativa visual da porcentagem de tecido necrosado de cada folha. Na última avaliação de severidade aos 10 DPI todas as folhas foram destacadas e escaneadas para estimar a área foliar necrosada da MFG usando o Software Quant V.1.01. Com os dados da severidade visual, calculou-se área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). A severidade da MFG foi avaliada separadamente na 1ª e 4ª folha expandida (folhas superiores) e nas 5ª, 6ª, 7ª e 8ª (folhas inferiores).

Retiraram-se dois discos da 2ª e 3ª folhas expandidas, de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes com auxílio de um vazador (8 mm diâmetro) às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI). Os discos foliares coletados foram processados para a realização de análise microscópica, conforme metodologia descrita por Stadnik e Buchenauer (2000) em microscópio óptico, binocular, no aumento de 400X (modelo FWL1500, Feldemann Wild Leite, Brasil). A porcentagem de germinação foi determinada em 100 conídios sobre os discos foliares. Para obtenção do extrato protéico utilizou-se a 2ª e 3ª folha expandida/plântula de acordo com metodologia adaptada de Brisset (2000); Faize (2006) e Hassan e Buchenauer (2007) às 24, 48 e 72 HAI. O teor de proteínas totais foi determinado por meio do método de Bradford (1976).

A atividade da peroxidases (POX) foi medida espectrofotometricamente conforme metodologia adaptada de Stadnik e Buchenauer (2000). Para tal, 100 μ L do extrato protéico foram adicionados em 2,9 mL de tampão acetato de sódio (50 mM; pH 5,5), contendo guaiacol 0,25% (v/v) (Sigma, EUA) e peróxido de hidrogênio 100 mM (Merck, Alemanha). Os valores de absorbância da reação foram registrados a cada 30 s durante 3 min a 30°C por meio de um espectrofotômetro a 470 nm (modelo 700 Plus, Femto, Brasil).

A atividade de glucanases (GLU) foi determinada utilizando-se como substrato o composto 'carboximetilcurdilan-remazol azul brilhante' (CM-curdlan-RBB, Loewe Biochemica, Alemanha), de acordo com metodologia adaptada de Wirth e Wolf (1996) e Brisset et al. (2000). Em microtubos de 2 mL (Axygen, USA) foram adicionados 200 μ L de CM-curdlan-RBB (4,0 mg.mL⁻¹) e 200 μ L de tampão acetato de sódio (200 mM; pH 5,0) que foram agitadas em vórtex na velocidade de 2111 rpm por 5 s (modelo AP56, Phoenix, Brasil) e incubadas à 40°C em banho-maria por 10min. Após a adição de 400 μ L de extrato foliar em cada microtubo a mistura foi agitada novamente em vórtex e então incubada à 40°C em banho-maria por 2 h. As amostras tiveram suas reações interrompidas pela adição de 200 μ L de HCl 2N e mantidas no gelo por 10 min. Findo este procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10.000 g/10min (modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha). As absorbâncias dos sobrenadantes das amostras foram determinadas a 600nm em espectrofotômetro. O delineamento experimental foi completamente casualizado, com 5 repetições/tratamento para às 24, 48 e 72 HAI. Para as análises de variância foi utilizado software Statística 6.0 – Stat Soft®, versão 2001. O teste de regressão foi calculado através do software Sisvar (UFLA), versão 2001.

3.2. Avaliação do efeito dos fosfitos sobre a MFG, através da técnica de TLC e Bioatografia

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis SC. Foi utilizado o fosfito de potássio: Phós-k 0-40-20/Oxiquímica Agrociência, 0%(N)-40%(P₂O₅)-20%(K₂O) na seguinte concentração 150mL/100L. A solução de fosfito de potássio foi pulverizada sete dias antes da inoculação (DAI) em plântulas de macieira até o ponto de escorrimento. Metade das plântulas tratadas com fosfito aos 7 DAI permaneceram sobre bancadas de casa-de-vegetação, enquanto outra parte foram inoculadas com uma suspensão de 3x10⁵ conídios/ml de *C. gloeosporioides* (Isolado MANE147). Após a inoculação, as plântulas permaneceram em câmara úmida no escuro a 100% UR e 24 °C por 24 h.

Para extração dos compostos antifúngicos dos extratos foliares utilizou-se a 2ª e 3ª folha expandida das plântulas, inoculadas ou não com *C. gloeosporioides*. As folhas coletadas foram acondicionadas em papel alumínio e mantidas sob gelo e, em seguida, armazenadas a -20°C até o momento da avaliação. Para extração dos compostos antifúngicos os extratos foram homogeneizados em álcool etílico e concentrados em evaporador rotativo a 40°C, e processados de acordo com a metodologia de Stadnik e Bettiol (2007). Em resumo, para determinar a atividade antifúngica das frações nas cromatofolhas foi utilizado *Alternaria brassicicola*. Para

isto, após sete dias de crescimento, as culturas do fungo foram raspadas e a suspensão de esporos obtida foi filtrada. Esta suspensão foi diluída em meio líquido BDA (1:1; 1/1) a 40°C. Por fim, as cromatofolhas foram pulverizadas com uma suspensão de 10^5 esporos de *A. brassicicola*. Após 48 h de incubação a 25°C, foram observadas zonas de inibição fúngica (halos brancos, visto que o fungo possui coloração escura. O delineamento usado nos experimentos foi o completamente casualizado, com cinco repetições/tratamento.

3.3. Avaliação de formulações de fosfito de potássio no controle pós-infeccional de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira

Os trabalhos foram realizados em laboratório e em casa-de-vegetação, na Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado da Embrapa Uva e Vinho. As plantas foram incubadas com 100% de umidade, para se ter uma maior abertura dos estômatos. Findo este período, as mudas foram inoculadas com uma suspensão de 3×10^5 conídios/mL do isolado CGF1 de *C. gloeosporioides* e mantidas no escuro a 100% UR e 22°C por 48h.

As mudas foram tratadas às 48 horas após a inoculação (HAI): com as doses de registro dos seguintes fosfitos, com suas respectivas marcas e formulações e doses p.c.: (a) 40-20: Bio 40-20/Biosul Fertilizantes, 0%(N)-40%(P₂O₅)-20%(K₂O), 150mL/100L; e (b) 40-20: Phós-k 0-40-20/Oxiquímica Agrôciencia, 0%(N)-40%(P₂O₅)-20%(K₂O), 150mL/100L. Plantas testemunhas foram tratadas com água destilada. Avaliou-se a severidade da MFG conforme Araújo et al. (2008), estimando-se visualmente a porcentagem de tecido necrosado de quinze folhas de um ramo aos cinco, seis, sete, oito e dez dias após a inoculação (DAI). Com estes dados, calculou-se área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). O delineamento usado nos experimentos foi o completamente casualizado, com e três repetições/tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância, seguido do teste de separação de médias SNK ($\alpha \leq 0,05$), com os softwares Statística 6,0 – Stat Soft[®], versão 2001.

Experimento 4: Sobrevivência, fisiologia e variabilidade de isolados de *Cryptosporiopsis* sp. associados a doença olho-de-boi em macieira

4.1. Isolamento e características das colônias e conídios dos isolados em diferentes meio de cultura

A. Isolamento dos isolados de *Cryptosporiopsis* sp

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Uva e Vinho em Vacaria – RS. Os isolados foram obtidos de frutos com sintomas de podridão “olho-de-boi” em maçãs de diferentes pomares da região Sul do Brasil.

Para o isolamento, os frutos foram desinfetados superficialmente com álcool etílico hidratado 92° e lavados com água destilada esterilizada. Fragmentos de tecidos com a podridão olho-de-boi foram retirados das margens das lesões e colocados em meio de cultura BDA contido em placas de Petri. As placas foram

mantidas a 21 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento das colônias, culturas monospóricas de cada isolado foram transferidas para tubos de vidro com BDA e preservadas a 4°C. As colônias dos isolados foram inicialmente cultivados em BDA e incubadas durante 14 dias com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 21°C. Nas placas de Petri com os diferentes meios de cultura foi substituído um disco central com 5 mm de diâmetro por outro com o mesmo diâmetro com o micélio de cada isolado. As placas foram mantidas a 21 °C com fotoperíodo de 12 horas. Os isolados utilizados neste experimento fazem parte da coleção monospórica de *Cryptosporiopsis* sp da Embrapa Uva e Vinho (Tabela 1). Em todos os experimentos utilizou-se isolados monospóricos com 15 dias (Figura 1).

Tabela 1. Origem dos isolados de *Cryptosporiopsis* spp

| Código dos isolados | Local de origem | Ano de coleta |
|---------------------|-----------------------------|---------------|
| Cp 1 | São Francisco de Paula / RS | 2002 |
| Cp 2 | São Francisco de Paula / RS | 2002 |
| Cp 3 | São Francisco de Paula / RS | 2002 |
| Cp 4 | Vacaria / RS | 2002 |
| Cp 5 | Fraiburgo / SC | 2003 |
| Cp 6 | Vacaria / RS | 2002 |
| Cp 7 | Vacaria / RS | 2003 |
| Cp 8 | Vacaria / RS | 2003 |
| Cp 9 | Fraiburgo / SC | 2002 |
| Cp 10 | Fraiburgo / SC | 2002 |
| Cp 11 | Vacaria / RS | 2002 |



Figura 1. Isolado monospórico de *Cryptosporiopsis* sp. em meio BDA.

B. Aspecto e coloração de colônias em três meio de cultura

Os meios de cultura testados formam: a) BDA acidificado - Batata-Dextrose-Ágar (10 g de dextrose, 18 g de ágar, 300 mL de caldo de batata e 700 mL de água destilada) acidificado com ácido láctico a pH 4,5 antes de verter; c) V8 - meio de ágar com suco V8 (200 mL de V8 (Campbel Soup Company), 3 g de CaCO_3 , 17 g de ágar e 800 mL de água destilada) e, c) extrato de malte ágar (25 g de extrato de malte, 17 g de ágar e 1000 mL de água destilada)

As avaliações finais do diâmetro das colônias foram feitas aos 13º dias de incubação com registro de dois diâmetros perpendiculares feitos com paquímetro digital (Mitutoyo) bem como aspecto e coloração de colônias (Figura 2). As avaliações de forma, dimensão (comprimento e largura média de 50 esporos por isolado e meio de cultura) e produção de conídios foram determinadas em um disco de 1,5 cm de diâmetro retirado da região central de cada colônia ao 13º dia de incubação. Os conídios foram retirados dos discos de cada meio de cultura com bastão de vidro e água, e suspensos em água destilada esterilizada com Tween-80, 0,001%, e a contagem de conídios em câmara de Neubauer.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. Os dados foram analisados como experimento fatorial (9 isolados e três meios de cultura). Foi realizado teste F seguido de contraste de médias ($p < 0,05$) para as variáveis diâmetro das colônias e produção de conídios (DEMÉTRIO, 2001). Todas as pressuposições para a análise de variância foram devidamente testadas de acordo com Banzatto e Kronka (2006).

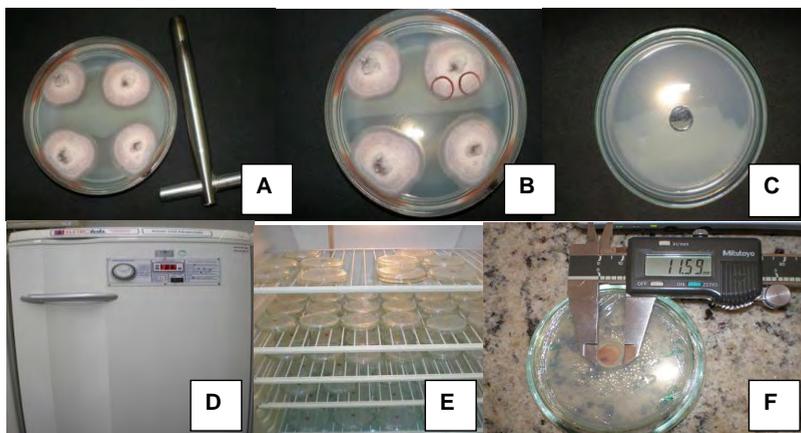


Figura 2. Colônia de *Cryptosporiopsis* sp com 15 dias de idade (A), detalhe dos círculos de 10mm de diâmetro (B), repicagem dos discos para as placas contendo os diferentes meios (C), câmara de crescimento BOD (D), placas no interior da câmara de crescimento BOD (E), mensuração do crescimento micelial com paquímetro digital (F).

C. Caracterização morfológica dos isolados

Utilizando as placas de Petri do teste anterior (crescimento micelial), observou-se a coloração da colônia de cada isolado em cada um dos três meios. Adotou-se a observação da coloração da colônia, da borda e do reverso da colônia (Figura 3). As cores atribuídas às colônias foram através de comparações em um padrão de cores (PANTONE®). Após estas observações agruparam-se os isolado semelhantes.

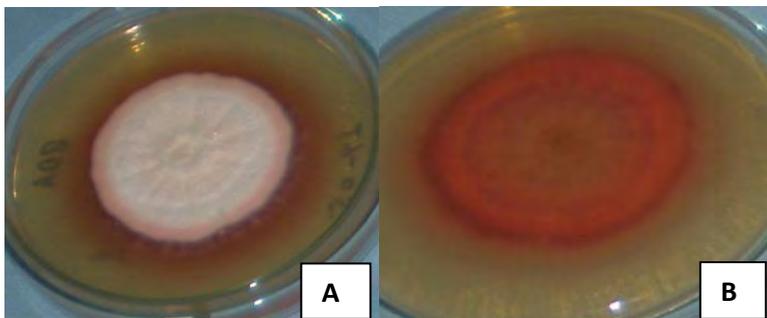


Figura 3. Detalhe da colônia de *Cryptosporiopsis* sp (A) e reverso da colônia (B) em meio BDA

D. Dimensionamento dos conídios dos isolados no meio de cultura BDA

Para a observação dos conídios no microscópio óptico utilizou-se uma régua micrométrica e ocular de 40x (Figura 4). Mediu-se então o diâmetro e a largura de 50 conídios de cada isolado (Cp1 a Cp11), e para fazer a conversão para micra (μ) multiplicou-se o resultado obtido por 2,5. Foi calculada a relação comprimento/largura dos conídios, determinando-se a forma dos conídios segundo Feitosa et al. (1977) modificado: Ccc= cilíndrico muito curto, relação menor que 2.50; Cc= cilíndrico curto, relação entre 2.50 e 3.00; C= cilíndrico, relação entre 3.00 e 3.50; Clf= cilíndrico à levemente fusiforme, com relação entre 3.50 e 4.00 e; Cf= cilíndrico à fusiforme, com relação entre 4.00 e 4.50.



Figura 4. Detalhe da régua micrométrica utilizada para a observação dos conídios de *Cryptosporiopsis* sp.

4.2. Virulência dos isolados em ramos e frutos de macieiras

A. Virulência em ramos de macieiras

Discos de micélio de 10 mm de diâmetro foram retirados das margens das culturas monospóricas com 15 dias de crescimento (3 discos/isolado), os mesmos foram colocados em placas de Petri vazias e esterilizadas e este material foi levado ao campo. Com o auxílio de um bisturi esterilizado, fez-se ferimentos nos ramos de macieira e no local colocou-se o disco de micélio de cada isolado (3 repetições/isolado) os mesmos foram cobertos com algodão umedecido em água destilada e esterilizada e cobertos com algodão e fita adesiva. Quinzenalmente eram feitas observações com auxílio de uma lupa manual, com o objetivo de encontrar a fase sexuada do patógeno já que esta nos auxiliaria na identificação de espécie dos isolados estudados.

B. Virulência dos isolados em maçãs

Desinfestação dos frutos: frutos sadios da cv. Fuji e Pink Lady foram desinfestados com hipoclorito de sódio e álcool e enxaguados com água destilada (AD). Após, secou-se os frutos com papel toalha. Para avaliar a virulência dos isolados foram estabelecidos dois experimentos os que são apresentados a seguir

Ação 1: Inoculação de frutos com ferimentos. Retirou-se com o auxílio de um perfurador, um disco de 10 mm de diâmetro de cada lado do fruto da cv. Fuji e Pink Lady. Discos de micélio de 10 mm foram extraídos das margens das culturas monospóricas de *Cryptosporiopsis* spp e transferidos para os frutos perfurados. Os discos de micélio foram cobertos com algodão umedecido em água destilada e esterilizada (ADE) e fita adesiva. Os frutos foram colocados em câmara úmida dentro de bandejas plásticas revestidas com papel úmido e redes plásticas, cobertas com saco plástico. Os frutos foram mantidos a 22°C sob iluminação contínua. As avaliações foram feitas com 15 e 21 dias após a inoculação onde se mediu o diâmetro das lesões com auxílio de um paquímetro. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições por isolado. Cada repetição foi constituída de um fruto inoculado em dois pontos.

Ação 2: Inoculação de frutos sem ferimentos: Frutos da cv. Pink Lady foram marcados apenas de um lado com auxílio de uma caneta de retroprojeter para destacar o local contendo lenticelas onde seria feito a inoculação. Discos de micélio de 10 mm de diâmetro foram extraídos das margens das culturas monospóricas de *Cryptosporiopsis* spp e transferidos para o local do fruto que continha o círculo de lenticelas marcado. Os discos de micélio foram cobertos com algodão umedecido em água destilada e esterilizada (ADE) e fita adesiva. Os frutos foram colocados em câmara úmida dentro de bandejas plásticas revestidas com papel úmido e redes plásticas, cobertas com saco plástico. Os frutos foram mantidos a 22°C sob iluminação contínua. As avaliações foram feitas com 15 e 21 dias após a inoculação onde se contou o número de lenticelas com lesão. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por isolado. Cada repetição foi constituída por um fruto inoculado em um lado.

4.3. Atividade enzimática dos isolados

Onze isolados foram avaliados quanto às suas atividades pectolítica, lipolítica, amilolítica, proteolítica, RNase e DNase utilizando as técnicas descritas por Grove et al. (1992). Discos de micélio do fungo com 0,5 cm de diâmetro, retirados da borda de colônias com 15 dias foram transferidos para placas de Petri contendo cada um dos meios sólidos citados acima, vedadas e incubadas a 22°C por 15 dias.

- A. **Atividade pectolítica:** utilizou-se o meio contendo extrato de levedura, ágar, pectina e solução salina. Ajusta-se o pH em 7,0 com NaOH para a detecção de liase e para a detecção de poligalacturase se ajusta o pH para 5,0 com HCl. Após o período de 15 dias de incubação do fungo neste meio, foi adicionado sobre o mesmo uma solução de brometo de hexadeciltrimetilâmonio 1%. Esta solução forma halos de degradação ao redor das colônias quando a reação é positiva.
- B. **Atividade lipolítica:** utilizou-se o meio contendo 10g de peptona, 5g de NaCl, 0,01 g de CaCl_2 , 20 g de ágar, 1000 ml de água destilada e pH ajustado para 6,0. O Tween-20 (1 ml para cada 100 ml de meio) foi autoclavado separado e adicionado ao meio momentos antes de vertê-los às placas de Petri. A atividade das enzimas lipolíticas das colônias foi observado devido a formação de cristais de sais de cálcio em torno das mesmas.
- C. **Atividade amilolítica:** a habilidade para degradar amido foi determinada em meio nutriente-ágar, acrescido de 0,6% de amido solúvel e pH 6,0. Após 15 dias de incubação do fungo, foi adicionado em cada placa de Petri solução de iodo. A área amarelada ao redor da colônia, em contraste com o meio azulado, indicou a atividade amilolítica.
- D. **Atividade proteolítica:** o meio é formado por ágar e gelatina (0,4%). O pH do meio deve ser ajustado para 6,0 com HCl. Após 15 dias de incubação do fungo a avaliação deve ser feita adicionando-se solução saturada de sulfato de amônio (10 g/100ml água) sobre as colônias. A reação será positiva se houver a formação de zonas claras ao redor das colônias.
- E. **Atividade de RNase:** o meio é formado por 5 g de glicose, 5 g de KH_2PO_4 , 2 g de NaCl, 0,05 g de FeSO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g de agar, 5 g de caseína hidrolisada e 2 mg/ml de Torula Yeast RNA. O pH do meio deve ser ajustado para 6,0 com NaOH. Após 15 dias de incubação, a avaliação é feita adicionando-se HCl 1N sobre as colônias. O resultado será positivo se houver a formação de zonas claras ao redor das colônias.
- F. **Atividade de DNase:** o meio é formado por 42 g/L de Difco Dnase Ágar. O pH do meio deve ser ajustado para 6,0 com HCl. Após 15 dias de incubação a avaliação deve ser feita adicionando-se HCl 1N sobre as colônias. O resultado será positivo se houver a formação de zonas claras ao redor das colônias.

A avaliação consistiu na medição de dois diâmetros ortogonais da colônia e quando a reação foi positiva mediu-se também o halo de degradação.

4.4. Caracterização fisiológica quanto a susceptibilidade a temperaturas

Discos de micélio de 10 mm de diâmetro foram extraídos das margens das culturas monospóricas crescidas em BDA e transferidas para novas placas contendo BDA. Para cada isolado foram utilizados três repetições. As câmaras de crescimento (BOD) utilizadas foram reguladas com as seguintes temperaturas: 3°C, 4°C, 5°C, 30°C, 31°C. O crescimento micelial foi estimado, com auxílio de paquímetro digital, através da leitura das médias entre os dois diâmetros ortogonais das colônias, no período de 5, 15 e 21 dias após a incubação.

Experimento 5: Etiologia e caracterização da infecção das maçãs por *Cryptosporiopsis perennans*

5.1. Determinação de meio seletivo para *C. perennans*

A necessidade de se obter um meio que fizesse possível a detecção de propágulos do patógeno exigiu o desenvolvimento desta ferramenta não disponível na literatura ainda. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Uva e Vinho, Unidade de Fruticultura Temperada, sendo avaliado o crescimento de *C. perennans* em diferentes meios de cultura. Os meios utilizados foram os seguintes: BDA (0,018% ágar; 0,01% dextrose; caldo de batata 2%); BDA + Tetraciclina 12,5 µg.mL⁻¹ (BDA-T); BDA + Tetraciclina 12,5 µg.mL⁻¹ + Nistatina 25 µg.mL⁻¹ (BDA-TN); BDA + Tetraciclina 12,5 µg.mL⁻¹ + Nistatina 25 µg.mL⁻¹ + Iprodione 1 µg.mL⁻¹ (BDA – TNI1); BDA + Tetraciclina 12,5 µg.mL⁻¹ + Nistatina 25 µg.mL⁻¹ + Iprodione 2 µg.mL⁻¹ (BDA – TNI2); BDA pH 4,5 (ajustado com ácido láctico), BDA pH 4,5 + Tetraciclina 12,5 µg.mL⁻¹ (BDAPh-T); BDA pH 4,5 + Tetraciclina 12,5 µg.mL⁻¹ + Nistatina 25 µg.mL⁻¹ (BDAPh-TN); BDA pH 4,5 + Tetraciclina 12,5 µg.mL⁻¹ + Nistatina 25 µg.mL⁻¹ + Iprodione 1 µg.mL⁻¹ (BDAPh – TNI1); BDA pH 4,5 + Tetraciclina 12,5 µg.mL⁻¹ + Nistatina 25 µg.mL⁻¹ + Iprodione 2 µg.mL⁻¹ (BDAPh – TNI2). Utilizou-se Tetraciclina como inibidor de bactérias, Nistatina de leveduras e Iprodione de fungos epífitos associados aos tecidos de macieira.

O material biológico constou de um isolado do patógeno estudado (CNPUV/Va/Cp5 pertencente à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Uva e Vinho. As suspensões de conídios foram preparadas com o auxílio de um hemacitômetro, sendo que se utilizou uma suspensão com uma concentração de 1×10^2 conídios.mL⁻¹ para cada placa de Petri foi transferida uma alíquota de 100 µL das suspensões de conídios. As placas foram incubadas a 20 °C e fotoperíodo de 12 horas. A seguir maçãs Fuji foram inoculadas e lavadas para detectar o patógeno. A suspensão obtida foi cultivada no meio selecionado. As variáveis analisadas foram número e tamanho das colônias, sendo que o tamanho das colônias foi tomado em duas direções (transversal e perpendicular a um eixo imaginário). As avaliações foram após 7 e 14 dias da inoculação. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. A variável número de colônias foi transformada para log X com base 10 (LITTLE; HILLS, 1972). Para a comparação de médias utilizou-se o Teste de Tukey com 5% de significância. A análise estatística foi feita com auxílio do programa SANEST.

5.2. Controle da podridão 'Olho de Boi', da 'Fuligem' e da 'Sujeira de Mosca' através de tratamentos erradicantes no período de dormência da macieira

Os experimentos foram conduzidos em dois ciclos consecutivos, 2006/2007 e 2007/2008, em um pomar comercial localizado no município de Vacaria (28°29'27"S, 50°56'09"W). O pomar foi implantado no ano de 1997 com a cultivar 'Pink Lady'® enxertada sobre porta-enxerto EM-9. As análises laboratoriais foram feitas no Laboratório de Fitopatologia da Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado da Embrapa Uva e Vinho, Vacaria, RS.

As pulverizações foram feitas durante a fase de repouso das plantas, cerca de 20 dias antes da data prevista para a superação da dormência. As aplicações foram feitas com pulverizador costal manual com vazão de 0,55 L.planta⁻¹, atingindo o ponto de escurrimento, tendo-se um volume de parte aérea copa de 3 m³. Foram avaliados os seguintes fungicidas (p.c., dose p.i.) para o controle erradicante de *Cryptosporiopsis sp.*: 1) calda sulfocálcica 30 °Bé (3,0%); 2) oxicleto de cobre (Cuprocarb, 0,5%); 3) hidróxido de cobre (Garra, 0,3%); 4) óxido cuproso (Cobre Atar, 0,3%) e; 5) testemunha (sem aplicação). Todas as parcelas receberam, durante o ciclo vegetativo, os tratamentos fungicidas aceitos no sistema de Produção Integrada de Maçãs (Produção Integrada de Frutas, Ministério da Agricultura - MAPA) (www.agricultura.gov.br) tendo como base na tomada de decisão, alertas de risco emitidos pela plataforma SISALERT (www.sisalert.com.br) para o controle das doenças. A estação automática da rede SISALERT estava posicionada a 1 km do local do experimento e coleta as variáveis: pluviosidade (mm), temperatura (mínima, máxima e média, °C) e umidade relativa do ar (%).

Amostras de ramos, de um e de dois anos de idade, e de gemas floríferas foram coletadas em dois momentos: imediatamente antes da aplicação e 48 h após a aplicação. Foram amostrados dez segmentos de 1 cm de comprimento de ramos assintomáticos e 25 gemas florais por parcela, que foram acondicionados em sacos de papel e em seguida analisados. Subamostras de 10 g de tecido das gemas e dos ramos foram submetidos à lavagem em solução aquosa com Tween 80 (0,001%) em sonicação por 1 min. Após, alíquotas de 100 µL da suspensão resultante foram semeadas em meio semi-seletivo para *Cryptosporiopsis sp.*. As placas foram incubadas a 22 °C e fotoperíodo de 12 h. Após 15 dias de incubação, foi avaliado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por placa. Para avaliar a capacidade de monitoramento e de estimativas de danos, foi realizada análise de regressão entre o número de UFC de *Cryptosporiopsis sp.* g de tecido vegetal⁻¹ de gemas floríferas com a perda total observada, combinando os dados dos dois ciclos considerados. Para avaliar o efeito dos tratamentos erradicantes sobre o inóculo primário a relação entre UFC.g⁻¹ antes e após as aplicações foi usada para se obter a redução relativa no número de propágulos pelos tratamentos, por meio da fórmula: IC (%) = [(UFC.g⁻¹_{t-1} - UFC.g⁻¹_t) / UFC.g⁻¹_{t-1}] * 100; onde; UFC.g⁻¹_{t-1} corresponde ao número de propágulos recuperados das amostras antes da aplicação e UFC.g⁻¹_t o número de propágulos recuperados das amostras após à aplicação. A avaliação da dinâmica temporal da densidade de inóculo na superfície das maçãs, foi feita em

amostras de lavagem obtidas de intervalos de aproximadamente 15 dias iniciados aos 30 dias após a queda das pétalas e estendendo-se até o momento da colheita. Amostras de oito frutos assintomáticos foram obtidas de cada parcela testemunha. O número de UFC.fruto⁻¹ foi plotado no tempo.

No momento da colheita foram coletados, aleatoriamente, 150 frutos da área útil da parcela para as avaliações de incidência de POB em quatro categorias de frutos: i) coletados aleatoriamente no momento da colheita; ii) assintomáticos incubados a 25 °C por 30 dias após a colheita; iii) assintomáticos armazenados em câmara frigorífica a 3 °C e 95% UR por três meses após a colheita (HENRÍQUEZ et al., 2008); e iv) caídos na superfície do solo na área de projeção da copa. A estimativa das perdas totais foi feita pelo somatório apenas das avaliações de incidência nas categorias i, iii e iv, descritos acima, uma vez que as infecções latentes constituem a fração potencial de perdas. A incidência de POB foi comparada nos dois ciclos e entre cada categoria de fruto avaliado para o ciclo. Para tal, utilizou-se a equação proposta por Lalancette e Robison (2002) considerando a taxa de incidência da podridão entre dois anos consecutivos; onde valores positivos correspondem ao incremento anual na incidência da doença.

A análise de retorno financeiro pelo uso dos tratamentos de inverno para o controle de POB levou em consideração o custo de aplicação (maquinário, mão-de-obra e produto), o valor de mercado do kg de maçã e as perdas ocasionadas pela POB. Com isso, foi obtido o benefício das aplicações (receita - despesa) e a relação entre R\$investido/R\$retorno pelo controle da doença tomando por base a incidência e as perdas da testemunha. Os valores de custo para aquisição de fungicidas e da aplicação foram obtidos junto à equipe técnica responsável pelo manejo do pomar.

Os experimentos foram delineados em blocos casualizados com cinco repetições. Cada unidade experimental foi composta por seis plantas onde as quatro centrais constituíram a parcela útil. Nos estudos *in vitro* cada repetição foi composta por três placas de Petri. Para a análise de variância e separação de médias, quando significativa, foi utilizada a diferença mínima significativa (DMS) ($P < 0,05$) seguindo o modelo linear (PIEPHO, 1999). Para a comparação das incidências entre os ciclos utilizou-se o teste-T (H_0 : taxa= 0; H_a : taxa \neq 0) onde as taxas indicam se os níveis de doença mudaram entre os ciclos; assim, taxas negativas e positivas indicam decréscimo e incremento da intensidade da doença, respectivamente, de um ciclo para o ciclo seguinte (LALANCETTE; ROBISON, 2002). As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS (Versão 9, SAS Institute, Cary, NC) sendo as análises de regressão e a confecção dos gráficos realizados com o programa SigmaPlot (Versão 11).

5.3. Utilização de fosfito de potássio no controle da podridão 'Olho de Boi' em maçãs Pink Lady®

O experimento foi instalado em um pomar comercial de 12 anos da cv. 'Pink Lady®', enxertada sobre MM-9, em uma densidade de 2.857 plantas/ha, localizado no município de Vacaria, RS. Aplicações de fungicidas foram feitas em dois momentos de aplicação: logo antes da colheita (24 h anteriores) com única aplicação de fosfito

de potássio 00-40-20 em mistura com captana (Orthocide 50%) na dose de 1,2 g/L, e uma testemunha sem aplicação; e uma série de pulverizações iniciadas aos 45 dias anteriores à colheita, quando foram testadas as seguintes combinações: 1) Fosfito de potássio 00-40-20 (40% P₂O₄ e 20% K₂O) na dose de 2 mL/L; 2) Fosfito de potássio 00-30-20 na dose de 2 mL/L; 3) Fosfito de potássio 00-40-20 na dose de 2 mL/L em mistura com captana (Orthocide 50%) na dose de 1,2 g p.a/L; 4) Fosfito de potássio 00-30-20 (2 mL/L) em mistura com captana (Orthocide 50%) na dose de 1,2 g/L; 5) captana (Orthocide 50%) na dose de 1,2 g/L e; 6) testemunha, sem aplicação de fungicidas. Os tratamentos foram reaplicados a cada sete dias ou quando a precipitação total no período excedeu 30 mm. As colheitas foram realizadas na primeira semana de junho e na última semana de abril, para as duas épocas, respectivamente.

No momento da colheita, 90 frutos foram amostrados ao acaso nas parcelas experimentais, anotando-se a incidência de POB (%). Os frutos assintomáticos, em número de 30, foram utilizados para a detecção de infecções latentes pela imersão em água por 6 h seguida de incubação a 25 °C. A incidência (%) de POB nos frutos foi avaliada após 15 e 30 dias do início da incubação (DAI). Os demais frutos assintomáticos foram armazenados em câmara frigorífica (3°C e 95% UR do ar) durante três meses para posterior avaliação da incidência de POB (%).

Frutos assintomáticos coletados no momento da colheita foram lavados com água destilada esterilizada (ADE) e Tween 0,001% e submetidos a sonicação por 1 min. Cada amostra foi composta de oito frutos. Para a detecção e quantificação do patógeno, uma alíquota da suspensão resultante foi distribuída em meio semi-seletivo para o desenvolvimento de *Cryptosporiopsis sp.* contendo antibióticos e iprodione (SPOLTI et al., 2010). As placas foram incubadas por 21 dias sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de 22 °C, seguido da avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) do patógeno por placa, e por fruto com sete placas por repetição.

Frutos assintomáticos foram obtidos no momento da colheita (abril) nas parcelas experimentais e refrigerados a 1°C por um mês. Foram utilizadas duas metodologias para avaliar o efeito do residual dos tratamentos de pré-colheita: i) frutos intactos foram submersos em 400 mL de uma suspensão de conídios (1x10⁸ conídios/mL) obtida pela raspagem de colônias do isolado Cp 5 de *Cryptosporiopsis sp.* crescidas em BDA por 14 dias a 22 °C e fotoperíodo de 12 h. Após a imersão os frutos incubados por 48 h em câmara úmida à 20 °C. Em cada fruto, uma região contendo 15 lenticelas foi delimitada para a avaliação do estabelecimento das infecções. Após, as maçãs foram acondicionadas em bandejas plásticas e refrigeradas até o término do experimento. Em intervalos de 14 dias, a partir do armazenamento, os frutos foram avaliados quanto ao desenvolvimento de sintomas da POB. Foram realizadas seis avaliações utilizando-se o número de lenticelas necrosadas ou podridão na área previamente definida para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) por integração trapezoidal. Uma vez que os mesmos não foram submetidos a procedimentos de desinfestação, foi adotado um controle negativo para cada tratamento (frutos imersos em ADE) procedendo da

mesma forma que nas inoculações com o patógeno; ii) maçãs assintomáticas foram inicialmente submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio (1%) e álcool (v/v) em solução aquosa seguido da lavagem dos frutos com ADE e secas em fluxo laminar.

Em cada fruto foram feitos quatro ferimentos circulares com diâmetro igual a 5 mm na região equatorial das maçãs retirando-se a epiderme da mesmas. Sobre os ferimentos, foram colocados discos de BDA, um em cada, contendo micélio de colônias do isolado Cp 5 *Cryptosporiopsis* sp. O local da inoculação foi protegido com algodão umedecido em ADE fixado ao fruto com fita adesiva. Imediatamente após a inoculação, a maçãs foram acondicionadas em bandejas plásticas e armazenadas a 20 °C e fotoperíodo de 12 h. Após sete dias da inoculação mediu-se o tamanho da podridão (mm) com paquímetro digital em duas posições perpendiculares, repetindo As medições a cada três dias até o dia 21. Nos ensaios foram utilizados quatro repetições sendo cada uma composta por três frutos, inclusive o controle negativo com disco de BDA sem o patógeno.

Foi utilizada a metodologia descrita para *C. gloeosporioides* (1), e concentrações de fosfito de potássio 00-40-20 corrigido em pH 2 e pH 7 (0; 0,0625; 0,125; 0,250 e 0,500 µL/mL), suplementado em BDA, anotando-se o diâmetro das colônias (mm) para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), expresso em mm/dia. Adicionalmente, uma alíquota de uma suspensão de conídios (1×10^2 conídios/mL) foi distribuída em placas de Petri com as mesmas concentrações de fosfito de potássio e incubada por sete dias, quando se registrou o número de UFC e o tamanho das colônias.

Após um mês de armazenamento, os frutos foram avaliados quanto ao teor de sólidos solúveis totais (SST - °Brix), firmeza de polpa, teor de amido, pH e acidez titulável. O teor de SST foi obtido através de refratômetro manual a partir da leitura do suco de 10 frutos por repetição. Para a avaliação da firmeza da polpa foi usado um penetrômetro manual com ponteira de 11 mm, realizando-se leituras em dois pontos do fruto; face exposta e não exposta ao sol, após a retirada da casca, em 10 maçãs por repetição. O teor de amido foi determinado pela reação iodo-amido de cinco frutos por repetição. Para a avaliação do pH utilizou-se uma solução ao 10 % de suco de cinco maçãs em água destilada para cada repetição e a leitura feita em peagâmetro (Digimed DMPH 2). Para a quantificação da acidez titulável, realizou-se titulometria com NaOH a 0,1 N até pH 8,1 a partir de uma solução de 10% de suco de cinco maçãs em água destilada para cada repetição.

Para avaliar a atividade da Peroxidase (PO) foi pesado um grama de polpa com a casca, retirada em um corte vertical até o centro da fruta, do lado oposto a inoculação e, imediatamente congelada à -25 °C. As amostras foram homogeneizadas à temperatura máxima de 4°C em 10 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), contendo 1 mg de polivinilpirrolidona-10. O homogeneizado foi filtrado, centrifugado a 4000 g por 20 minutos sob refrigeração, e o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi conservado em gelo e usado para as determinações de peroxidase. A Atividade de Fenilalanina Amônia-Liase (FAL) Foi determinada nos extratos brutos dos frutos preparados de acordo com a versão modificada.

Os experimentos de campo foram conduzidos em blocos casualizados com quatro repetições. Cada parcela experimental foi composta por seis plantas, com quatro plantas centrais úteis. Os experimentos em condições controladas foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Para cada concentração de fosfito de potássio em BDA e combinação de pH foram utilizadas cinco repetições sendo o experimento repetido três vezes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Waller-Duncan k-ratio t, com $K=100$ e $P<0,05$ com auxílio do pacote estatístico SAS (versão 9). O ensaio da atividade enzimática nos frutos teve delineamento em blocos casualizados com três repetições e arranjado em esquema fatorial $6 \times 2 \times 2$ para PO (tratamentos em pré-colheita x inoculação com *Cryptosporiopsis sp.* x data de quantificação) e no esquema 6×2 para FAL, eliminando neste caso o fator data e as médias discriminadas pela diferença mínima significativa (DMS, $P<0,05$).

Experimento 6: Análise por microscopia de varredura do processo de infecção das maçãs por *Cryptosporiopsis perennans*

6.1. Avaliar lesões de *C. perennans* em frutos inoculados utilizando microscopia eletrônica de varredura

Foram utilizadas maçãs 'Maxi Gala' (calibre 198), com quatro meses de armazenamento em atmosfera controlada (AC), e maçãs 'Fuji Kiku' (calibre 198) com 7 meses de armazenamento em AC. Os frutos foram selecionados e inoculados artificialmente em dois locais, com discos de micélio ou com papel filtro contendo suspensão (1×10^6 conídios.mL⁻¹) de *C. perennans*. O local inoculado foi coberto com algodão umedecido, fixado com fita adesiva. Para 'Maxi Gala', a incubação ocorreu em luz fluorescente contínua (luz do dia) a 22°C, durante os períodos de 48 horas e 7 dias, para frutos inoculados com suspensão de conídios e com discos de micélio, respectivamente. As maçãs 'Fuji Kiku' foram incubadas por 13 dias sob luz fluorescente contínua (luz do dia) com discos de micélio do patógeno. Em três frutos homogêneos de cada método de inoculação foram coletadas amostras de tecido contendo lenticelas (2,0 x 2,0mm da na região inoculada), as quais foram estabilizadas por fixação química.

Na formulação do fixador (Karmovisk), foram ajustadas as condições ideais de concentração, pH e molaridade. O fixador foi aplicado à temperatura ambiente, por imersão. O tempo de ação do fixador correspondeu ao período de duas horas. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio (OsO₄) tamponado a 1%, durante uma hora, para garantir a estabilização da forma (CASTRO, 2002). Após a fixação, o material foi desidratado em banhos duplos de etanol a 30, 50, 70, 80, 95 e 100%. Posteriormente o álcool foi substituído por gás carbônico liquefeito, no aparelho de ponto crítico.

Todas as amostras foram colocadas no suporte porta-amostras do microscópio (*stub*), considerando a melhor orientação em relação ao feixe de varredura e do coletor de elétrons secundários. Foram identificadas e metalizadas com ouro, depositado pelo processo de "sputtering" para que os átomos atingissem toda a superfície do material. Para se obter informações da topografia da superfície,

foram utilizados elétrons secundários (baixa energia) para captação das imagens, provenientes da interação do feixe primário com a camada de ouro que recobre o espécime. O material foi avaliado em um microscópio de varredura ZEISS modelo DSM 940A. Foram usadas tensões aceleradoras de 10 KV. As amostras foram visualizadas com ampliações de 200 e 1000 vezes para 'Fuji Kiku' e 'Maxi Gala', respectivamente.

6.2. Avaliar lesões de *C. perennans* em frutos inoculados utilizando microscopia eletrônica de transmissão

O procedimento inicialmente desenvolvido seguiu as etapas descritas no item 6.1. As amostras a serem analisadas foram colocadas em blocos de resina para microscopia de transmissão. Atualmente estão sendo realizados cortes em ultramicrotomo o que permitirá sua avaliação em por microscopia eletrônica de transmissão.

Experimento 7: Avaliação do efeito de protetores solares

7.1. Avaliação do efeito de RAYNOX® no Controle de Queimadura de Sol em maçãs 'Fuji' e 'Pink Lady'

Macieiras da cultivar 'Fuji' com porta-enxerto M.9 uniformes e com boa condição fitossanitária foram usadas para a instalação do experimento 1 em um pomar da empresa RASIP, localizada em Vacaria, RS. O espaçamento entre plantas foi de 4 metros entre filas e 1 metro entre plantas. No experimento 2 foram utilizadas macieiras da cultivar Pink Lady® com porta-enxerto M.9, uniformes e em boas condições fitossanitárias, localizadas em um pomar da empresa AGROPECUÁRIA SCHIO, localizada em Vacaria, RS. O espaçamento entre plantas foi de 4 m entre filas e 1 m entre plantas. A orientação das plantas em ambos os pomares foi Norte/Sul, de modo que os frutos localizados ao leste recebam o sol durante a manhã e os frutos localizados a oeste recebam o sol da tarde.

Foram testados dois tratamentos de protetor solar RAYNOX, 2,5 % e 5,0 %, com 5 aplicações antes da colheita (Tabela 2), usando como padrão para início das aplicações 35 milímetros de diâmetro da fruta e temperaturas acima de 27°C por mais de 5 horas ou acima de 30°C por mais de 3 horas. Os dados de diâmetro da fruta foram registrados semanalmente, pois a frequência de aplicação foi conforme o crescimento do fruto, uma vez que o produto não é lavado pela água da chuva, mas com a mudança na epiderme perde-se a proteção. Deve-se lembrar que o crescimento dos frutos envolve estádios de divisão celular, alongação das células e formação dos espaços intercelulares.

Foi adicionado abrandador na água porque à presença de carbonatos de cálcio provoca a coagulação quando não usado. Antes de cada aplicação foi verificada a dureza da água de aplicação para calcular a quantidade de ablandador necessário. As aplicações respeitaram no mínimo três dias antes ou três dias depois da aplicação de cloreto de cálcio na área, pois este pode causar fitotoxidez. Conway et al. (1995) sugerem que as paredes celulares se saturam de íon cálcio, ou seja, há um limite de sítios de ligação. Desta forma, maiores concentrações de cloreto de

cálcio na solução resultam em aumento no conteúdo total de cálcio livre, porém há um menor aumento de cálcio ligado à parede celular, podendo resultar em injúrias aos frutos, além de fitotoxidez.

Cada planta recebeu 625 mL da calda distribuídos uniformemente na planta com um pulverizador 'costal'. Cada tratamento foi composto de 16 plantas, divididos em 4 parcelas de 4 plantas em cada área. As parcelas foram sorteadas ao acaso, deixando plantas de bordadura no contorno.

Tabela 2. Datas de aplicações, temperatura de polpa e epiderme nas datas de aplicações

| CULTIVAR | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|----------|-------------|
| DATA | PINK LADY® | | DATA | FUJI | |
| | °C polpa | °C ambiente | | °C polpa | °C ambiente |
| 19.12.2007 | 24,0 | 21,0 | 19.12.2007 | 24,0 | 20,0 |
| 28.12.2007 | 26,0 | 27,5 | 28.12.2007 | 28,1 | 27,5 |
| 24.01.2008 | 31,3 | 28,3 | 24.01.2008 | 28,8 | 27,2 |
| 12.02.2008 | 29,2 | 27,7 | 12.02.2008 | 27,5 | 27,3 |
| 07.03.2008 | 36,5 | 33,2 | 07.03.2008 | - | - |

6.2. Exposição controlada das maçãs

Ensacamento de frutos 'Fuji'- pomar RASIP - expostos ao sol - Data: 18/01/2008

Um total de 12 plantas localizadas na mesma área foram utilizadas, mas fora do experimento com RAYNOX. 12 frutos mais expostos ao sol da tarde de cada planta foram ensacados na mesma data, mas foram desensacados em duas datas diferentes. Com previsão de temperaturas acima de 27°C por mais de 5h ou de 30°C por mais de 3h, um terço dos frutos foi desensacado e assim sucessivamente nas datas posteriores.

Desensacamentos:

1. Data: 07/02/2008

- 48 frutos 'Fuji' foram desensacados às 8h45min.
- Data de ensacamento desses frutos: 08/02/2008 na primeira hora da manhã (9h).

2. Data: 15/02/2008

- 48 frutos 'Fuji' foram desensacados às 8h45min.
- Data de ensacamento: 16/02/2008 às 9h.

Experimento 8: Avaliação do efeito da temperatura e período de molhamento foliar na severidade da MFG

Para o ensaio foram utilizadas macieiras da cv. Gala com haste única, mantidas em casa-de-vegetação em vasos de 2 litros. *Colletotrichum gloeosporioides* utilizado no presente ensaio foi o isolado homotático Cg.197, coletado em 1992 em Frei Rogério, SC, da folha de 'Gala' e mantido em meio de BDA. O inóculo foi produzido transferindo-se discos de micélio (6 mm de diâmetro) cultivado em meio de BDA (39 g/L, Merck), para o meio líquido de dextrose (1%) e batata (200 g/L) e mantido sob agitação (mesa agitadora orbital da Tecnal, mod. TE-141 a 60 rpm), no escuro (20°C) durante 4 dias. A suspensão de conídios foi, então, ajustada para 1×10^6 conídios/mL e a face adaxial das folhas inoculada com um pulverizador manual (Tokyo Sansyo Glass Spray SN-60). Após a inoculação, as plantas foram mantidas na câmara de inoculação (Growth Cabinet mod. TDH-1.28, Tokyo Thermo Tec Corp.; UR>98%; no escuro) durante 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 e 72 h à temperatura de 12°, 14°, 16°, 18°, 20°, 22°, 24° e 26°C de acordo com o experimento. Completados os períodos estabelecidos, as plantas (4/tratamento) foram transferidas para um fitotron (NK System Biotron mod. NC-220S; Nippon Medical and Chemical Instruments Co., Ltd.) a 50% de UR, 9.000 lux e mesma temperatura do ensaio, onde foram mantidas durante 30 min para interromper o molhamento e, então, transferidas para a sala de crescimento regulado na mesma temperatura do ensaio ($T \pm 0,5^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e UR ambiente).

A avaliação da severidade da MG foi feita nas 5 folhas apicais da planta, determinando-se a porcentagem de área foliar doente. O intervalo entre a inoculação e a avaliação variou de 4 dias para as temperaturas mais altas (24° e 26°C) até 9 dias para as temperaturas mais baixas (12° e 14°C). Para analisar a confiabilidade dos dados de cada ensaio, estes foram submetidos à análise de regressão linear para cada temperatura estudada utilizando o programa SAEG. Já a interação entre o efeito da temperatura e PMF na severidade da doença foi analisada com o programa SAS (SAS, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Experimento 1: Comparação de método Elisa com dois métodos de coleta de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* em Vacaria, RS

3.1.1. Avaliação do Kit Adgen Identikit para *Colletotrichum sp*

Apenas a amostra da suspensão 1×10^6 conídios/ml, a partir de 5 horas de revelação, foi positiva. A mesma suspensão inoculada não apresentou o mesmo resultado (Tabela 3). Suspensões com concentração inferiores a 1×10^6 conídio/ml,

nas condições deste teste, não foram detectadas pelo kit. Além disto, o controle positivo do kit diluído 10 x apresentou valor semelhante ao não diluído.

O Kit conseguiu detectar com eficiência média os conídios de *C. gloeosporioides* associado à mancha foliar da Gala, suspensos em água, contudo, não foi útil para verificar a presença de propágulos do patógeno nas folhas mesmo nas concentrações maiores.

Tabela 3. Eficiência do Kit Adgen Identikit-*Colletotrichum* sp para monitorar *C. gloeosporioides*, associado à mancha foliar da Gala

| Amostra | Horas de revelação – Absorbância 405 nm | | | | | | | |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 22 | 24 | |
| Controle negativo do Kit | 0,079 | 0,081 | 0,081 | 0,085 | 0,087 | 0,092 | 0,091 | |
| Controle positivo do Kit | 0,176 | 0,266 | 0,365 | 0,462 | 0,537 | 1,418 | 1,428 | |
| Água | 0,080 | 0,077 | 0,079 | 0,091 | 0,090 | 0,081 | 0,082 | |
| Controle positivo do Kit (diluição 10 ⁻¹) | 0,163 | 0,231 | 0,319 | 0,420 | 0,486 | 1,354 | 1,376 | |
| Suspensão <i>C. gloeosporioides</i> 1 x 10 ⁴ | 0,095 | 0,083 | 0,085 | 0,090 | 0,092 | 0,103 | 0,103 | |
| Suspensão <i>C. gloeosporioides</i> 1 x 10 ⁵ | 0,091 | 0,090 | 0,088 | 0,094 | 0,099 | 0,143 | 0,143 | |
| Suspensão <i>C. gloeosporioides</i> 1 x 10 ⁶ | 0,097 | 0,112 | 0,128 | 0,151 | 0,168 | 0,357 | 0,359 | |
| Folha inocula com água | 0,086 | 0,087 | 0,083 | 0,088 | 0,091 | 0,099 | 0,097 | |
| Folha inocula (<i>C. gloeosporioides</i> 1 x 10 ⁴) | 0,081 | 0,083 | 0,082 | 0,086 | 0,089 | 0,097 | 0,092 | |
| Folha inocula (<i>C. gloeosporioides</i> 1 x 10 ⁵) | 0,073 | 0,079 | 0,081 | 0,082 | 0,082 | 0,081 | 0,080 | |
| Folha inocula (<i>C. gloeosporioides</i> 1 x 10 ⁶) | 0,084 | 0,083 | 0,082 | 0,088 | 0,088 | 0,091 | 0,092 | |

3.1.2. Detecção de propágulos que colonizam gemas, segmentos de ramos, flores e frutos

O método foi eficiente para detecção do patógeno nas gemas (12×10^2 ufc/g de gema) e constatou também o patógeno nos ramos do ano, nas flores e frutos de 2 cm ($2,1 \times 10^2$ ufc/g; $2,5 \times 10^2$ ufc/g e $1,8 \times 10^2$ ufc/fruto, respectivamente). Contudo, a pesar de eficiente, este método, provavelmente não seria adequado para uso pelos produtores pelo tempo que levaria a coleta e a incubação das amostras.

3.1.3. Determinação do patógeno na água de chuva que escorre nas macieiras

Na avaliação feita na primavera de 2007 se constatou que o método foi simples de conduzir, efetivo quando associado ao uso de meio semi-seletivo e o patógeno somente se detectou quando surgiram os primeiros sintomas (fevereiro de 2008). No ciclo 2008 / 2009 não se constatou o patógeno ao longo do ciclo e também não foram constatados sintomas.

3.2. Experimento 2: Comparação de modelos de previsão da Mancha Foliar da Gala

Ciclo 2007/08:

Os primeiro sintoma, em plantas não pulverizadas (testemunha absoluta), ocorreu em 29/9/07. A primeira pulverização em todos os tratamentos ocorreu em 26/9, no estágio fisiológico da planta E/E2 e as pulverizações subseqüentes foram determinadas pelos parâmetros de alerta específicos para cada sistema ou modelo (tratamento 1 a 5) em comparação com o sistema padrão, a cada 7 dias (tratamento 6).

O número de pulverizações (Tabela 4) considerando aquela anterior a ultima colheita (11/02/08) e aquelas até o final do ciclo (31/03/08) diferiu entre os tratamentos sendo que nos sistemas de alerta houve redução de pelo menos uma pulverização durante o ciclo. No tratamento 4 (VSD=13) houve redução de 52,6% de pulverizações até a colheita e em 50% até o final do ensaio experimental. Nos demais tratamentos houve redução de pulverização de 5,26% a 36,8% até a colheita e de 3,84% a 30,7% até o final do ciclo.

O maior intervalo entre pulverizações ocorreu no tratamento 4, quando o valor VSD=13 foi atingido no máximo 3 vezes em outubro. Nos tratamentos 1, 2, 3 e 6 houve pulverizações em até 5 vezes mensais e no tratamento T5, no máximo 4 pulverizações. O volume de calda utilizado nas pulverizações foi de 500L/ha até 12/01/08 e após, de 1000 L/ha. Na Tabela 4 se observa que os dados climáticos de precipitação mensal do período de setembro de 2007 a março de 2008 são inferiores em 0,27% até 49,7% à média histórica da precipitação em 47 anos, à exceção de outubro e novembro em que a precipitação foi 20,7% e 35,6% maior, respectivamente. Esta condição climática proporcionou um período seco na maior parte do ciclo perfazendo 55,32% do total de dias do ciclo (17/9/07 a 31/3/08) com umidade relativa mínima inferior a 60% (Figura 5). Foram realizadas 20 avaliações, uma por semana, em cinco plantas com quatro ramos marcados, cada uma, da incidência da Mancha Foliar da Gala (MFG).

A incidência da MFG durante o ciclo foi mensurada pela área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e não houve diferença significativa entre tratamentos para esta variável. Os primeiros sintomas em plantas pulverizadas foram observados a partir de 01/11/2007, com incidência lenta, porém crescente até 03/01/2008. A partir desta observação a progressão assume configuração exponencial (Figura 6) atingindo o nível de 80% em todos os tratamentos, exceto T1 e T6 que mantiveram nível de 72%. A progressão exponencial pode ter sido causada pelas condições de ambiente verificadas entre 24/12 e 04/01 em que todos os dias, exceto dois, ocorreram precipitações.

A queda de folhas provoca pela doença foi mensurada pela porcentagem de folhas remanescentes nos ramos. Para esta variável não foi observada diferença significativa entre tratamentos (Tabela 5). Em relação aos frutos, a incidência da MFG variou de 38,8% a 56,71% entre tratamentos com as menores incidências

observadas em frutos dos tratamentos T6 (38,48%) e T3 (42,28%), entretanto estas diferenças não foram significativas pelo teste F. Os resultados sugerem que a falta de controle da doença mesmo no tratamento padrão a cada 7 dias e entre os demais tratamentos pode ser relacionada mais ao baixo volume de calda (500 L/ha) utilizada durante a primavera e início do verão associada a baixa umidade relativa do ar com consequente menor deposição de partículas do Metiram sobre a planta do que a sua ação fungicida sobre *Colletotrichum* spp.

Tabela 4. Precipitação mensal e média histórica, número de ocorrências de dias favoráveis (DF) e períodos críticos (PC) para a Mancha Foliar da Gala com a respectiva pulverização mensal do fungicida necessária para conter a epidemia durante o ciclo vegetativo (setembro/2007 a março/2008). EECd/portão.

| Variável | Set | Out. | Nov. | Dez. | Jan. | Fev. | Mar. | Total |
|------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Pp. Mens. ¹ | 79,2 | 219,7 | 193,4 | 143,9 | 103,9 | 82,9 | 50,8 | 873,8 |
| Pp Hist. ² | 153,0 | 182,0 | 140,6 | 144,3 | 175,8 | 165,0 | 131,3 | 1092,0 |
| Nº DF ³ mês | 9 | 15 | 11 | 13 | 12 | 13 | 10 | 83 |
| Nº PC ⁴ mês | 7 | 11 | 4 | 9 | 9 | 9 | 7 | 56 |
| Tratamento | Pulverização efetuada mensalmente (nº) | | | | | | | |
| T1 | 1 | 4 | 3 | 4 | 5 | 4 | 4 | 25 |
| T2 | 1 | 5 | 2 | 3 | 3 | 4 | 3 | 21 |
| T3 | 1 | 5 | 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 24 |
| T4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 13 |
| T5 | 1 | 3 | 2 | 2 | 3 | 4 | 3 | 18 |
| T6 | 1 | 5 | 3 | 4 | 5 | 4 | 4 | 26 |

^{1/} Precipitação (mm) mensal.

^{2/} Precipitação (mm) da média mensal histórica de 46-47 anos.

^{3/} Dia favorável à ocorrência de infecção por *Colletotrichum* spp.

^{4/} Período crítico, formado por dois dias favoráveis (DF) consecutivos.

*/ Contados a partir do dia 17/9/2007

**/ Contados até o dia 31/03/2008

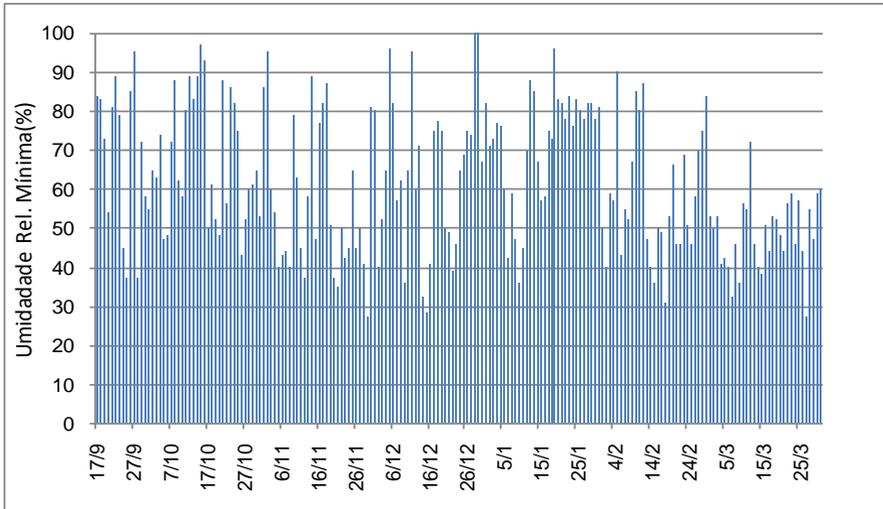


Figura 5. Umidade Relativa Mínima (%) diária durante o ciclo de observação de 17/9/2007 a 31/3/2008 na cultivar Royal Gala. Epagri/Estação Experimental de Caçador, SC.

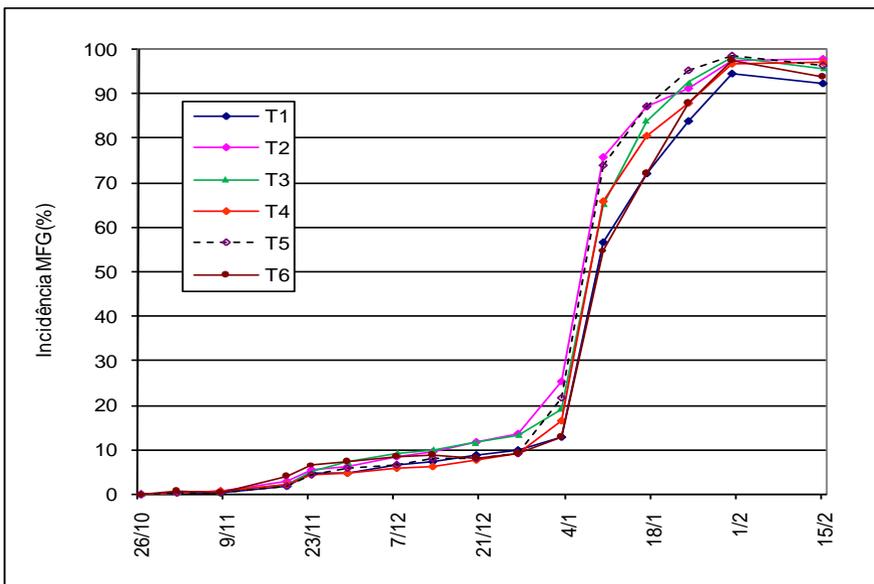


Figura 6. Progresso da Mancha Foliar da Gala em plantas de macieira cv. Royal Gala sob cinco sistemas de alerta (T1, T2, T3, T4 e T5) de pulverização, comparados ao sistema padrão (T6) com pulverização a cada sete dias.

Tabela 5. Número de pulverizações de fungicidas, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), porcentagem de desfolha e incidência da Mancha Foliar da Gala em frutos sob diferentes sistemas de alerta e de calendário fixo em macieira (*Malus domestica*) cv. Royal Gala.

| Tratamento ¹ | Nº Pulverizações ² | AACPD ³ | % Desfolha ⁴ | % MFG Fruto ⁵ |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------|
| T1 | 18(25) | 16,66 | 6,71 | 6,33 |
| T2 | 15(21) | 20,32 | 6,45 | 7,15 |
| T3 | 18(24) | 19,43 | 6,39 | 6,23 |
| T4 | 09(13) | 17,92 | 6,45 | 7,08 |
| T5 | 12(18) | 19,55 | 7,02 | 7,31 |
| T6 | (19)26 | 17,28 | 6,20 | 5,95 |
| CV% | | 14,05 | 20,01 | 15,94 |
| F | | ns | ns | ns |

¹T1=modelo Fitzell; T2= modelo VSD+cMFG; T3=modelo EECd; T4=VDS(13). T5=modelo 2PC;T6= 7/7 dias; ²Número de pulverizações até a colheita; entre parêntesis até o final do experimento. ³AACPD-Área abaixo da curva do progresso da doença até a pós-colheita final de frutos em 15/02;; ⁴Porcentagem de desfolha transformado em raiz quadrada. ⁵ Incidência da doença em frutos, na colheita, transformados em raiz quadrada +1.

Ação 2: Ciclo 2008/09

O primeiro sintoma no pomar ocorreu em 17/10/08 (estádio fenológico G-H) em planta não marcada para avaliação. Nas plantas e ramos marcados os primeiros sintomas foram observados em 03/11/08 (frutificação efetiva) quando a doença se estabeleceu. As pulverizações no pomar foram determinadas pelos parâmetros de alerta específicos para cada sistema ou modelo (tratamento 1 a 5) em comparação com o sistema padrão, a cada 7 dias (tratamento 6).

A primeira pulverização nos tratamentos T1 e T3 ocorreu em 02/10/08 quando o modelo gerou o alerta de pulverização no estágio fisiológico da planta F-G. Para o T2, a primeira pulverização ocorreu em 06/10, no estágio F2-H; Para T6, ocorreu em 08/10 no estágio F2-H; para T4, em 13/10, no estágio G-H e por fim o T5, em 16/10 (Tabela 6). O número de pulverização (Tabela 7) considerada aquela anterior a colheita em 27/01/09 e aquelas até o final do ciclo (07/03/09) variou entre os sistemas. Com sistemas de alerta houve redução de uma a sete pulverizações até a colheita e de uma até nove a nove durante todo ciclo.

O modelo EECd proporcionou uma economia de 10% e o de Fitzell, de 5% se considerado o período de pulverizações até a colheita. Se consideradas todas as pulverizações o modelo EECd possibilitou reduzir em 15,3% e o de Fitzell em 3,8%. Nos demais, apesar da maior redução de pulverização, houve perda de eficiência de controle da doença (Tabela 6). Nos meses de novembro, dezembro e março os valores de precipitação (chuva em mm) mensal do período de 01/09/08 a 31/03/09 são inferiores à média histórica da precipitação em 48 e os demais meses foram superiores, principalmente outubro, janeiro e fevereiro. No mês de setembro, exceto no tratamento padrão, nenhum sistema indicou necessidade de pulverização.

No decorrer do ciclo, o sistema T1, seguido de T3 foram aqueles que indicaram uma maior frequência de pulverização e superaram o método padrão nos meses de outubro e janeiro. (Tabela 7). A condição climática no mês de outubro com um longo período de molhamento foliar e chuvas frequentes proporcionou as condições necessárias ao processo infeccioso do *Colletotrichum* spp e o aparecimento dos primeiros sintomas, entretanto novembro e dezembro não foram favoráveis e o progresso da doença foi lento até janeiro quando a incidência teve projeção logarítmica (Figura 7). A incidência da MFG durante o ciclo foi mensurada pela área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e houve diferença significativa pelo entre tratamentos para esta variável. O modelo EECd (T3) e o de Fitzell (T1) não diferiram do controle padrão (Tabela 8).

O progresso da doença ocorreu em duas fases distintas; na primeira fase, os primeiros sintomas em plantas marcadas foram observados a partir de 03/11/2007, com incidência lenta, porém crescente até próximo a colheita. A partir da colheita, numa segunda fase, a progressão assumiu configuração exponencial (Figura 8). A linearização dos dados destas progressões foi melhor representada pelo modelo logístico com coeficiente de determinação R^{*2} superior a 0,822.

A taxa de progresso da doença representada pelo parâmetro "r" (Tabela 8) variou entre tratamentos tendo o modelo de Fitzell não diferido do padrão. A severidade da MFG foi avaliada por meio de escala diagramática (notas de 0 a 5) em 100 folhas de cada uma das 3 plantas centrais das parcelas. A estes valores foi aplicado a formula de Townsend e Heuberger para obter o índice de severidade (IS). Houve diferença significativa entre os tratamentos. O controle padrão proporcionou a menor severidade e não diferiu do modelo EECd (T3), os demais diferiram daquele. Os modelos Fitzell (T1) e 2PC(T5) não diferiram do T3 (Tabela 5). Os valores da incidência da MFG em frutos foram transformados em raiz quadrada e variou de 4,32 a 6,70. A menor incidência foi observadas em frutos provenientes do tratamento padrão (T6) seguido do modelo EECd (T3) e o modelo de Fitzell que não diferiram entre si.

Tabela 6. Data do início, término e número das pulverizações utilizadas em pomar de macieira (*Malus domestica*) cv. Royal Gala sob diferentes métodos de controle da Mancha-Foliar da Gala.

| Tratamento ¹ | Data início pulverização | Data término pulverização | NºPulverizações ² |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|
| T1 | 02/10/08 | 06/03/09 | 19(25) |
| T2 | 06/10/08 | 06/03/09 | 14(18) |
| T3 | 02/10/08 | 27/02/09 | 18(22) |
| T4 | 13/10/08 | 06/03/09 | 13(17) |
| T5 | 16/10/08 | 27/02/09 | 13(17) |
| T6 | 22/09/08 | 06/03/09 | 20(26) |

¹ T1=modelo Fitzell; T2= modelo VSD+cMFG; T3=modelo EECd; T4=VDS(8). T5=modelo 2PC; T6= 7/7 dias;

² Número de pulverizações até a colheita (entre parênteses até o final do experimento).

Tabela 7. Precipitação mensal e média histórica, número de ocorrências de dias favoráveis (DF) e períodos críticos (PC) para a Mancha Foliar da Gala com a respectiva pulverização mensal do fungicida necessária para conter a epidemia durante o ciclo vegetativo (setembro/2008 a março/2009). EECd/portão.

| Variável | Set [*] | Out. | Nov. | Dez. | Jan. | Fev. | Mar. ^{**} | Total |
|------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------|--------|
| Pp. Mens. ¹ | 159,7 | 289,3 | 136,0 | 103,2 | 195,2 | 172,0 | 32,3 | 1087,7 |
| Pp Hist. ² | 151,5 | 182,8 | 141,8 | 144,3 | 174,7 | 163,3 | 129,6 | 1088,0 |
| Nº DF ³ mês | 1 | 20 | 10 | 16 | 19 | 17 | 7 | 90 |
| Nº PC ⁴ mês | 0 | 15 | 6 | 12 | 17 | 13 | 6 | 69 |
| Tratamento | Pulverização efetuada mensalmente (nº) | | | | | | | |
| T1 | 0 | 6 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 25 |
| T2 | 0 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 1 | 18 |
| T3 | 0 | 6 | 5 | 4 | 3 | 4 | 0 | 22 |
| T4 | 0 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 17 |
| T5 | 0 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 | 0 | 17 |
| T6 | 1 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 0 | 26 |

^{1/} Precipitação (mm) mensal.

^{2/} Precipitação (mm) da média mensal histórica de 47-48 anos.

^{3/} Dia favorável à ocorrência de infecção por *Colletotrichum* spp.

^{4/} Período crítico, formado por dois dias favoráveis (DF) consecutivos.

^{*} Contados a partir do dia 01/9/2008

^{**/} Contados até o dia 16/03/2009

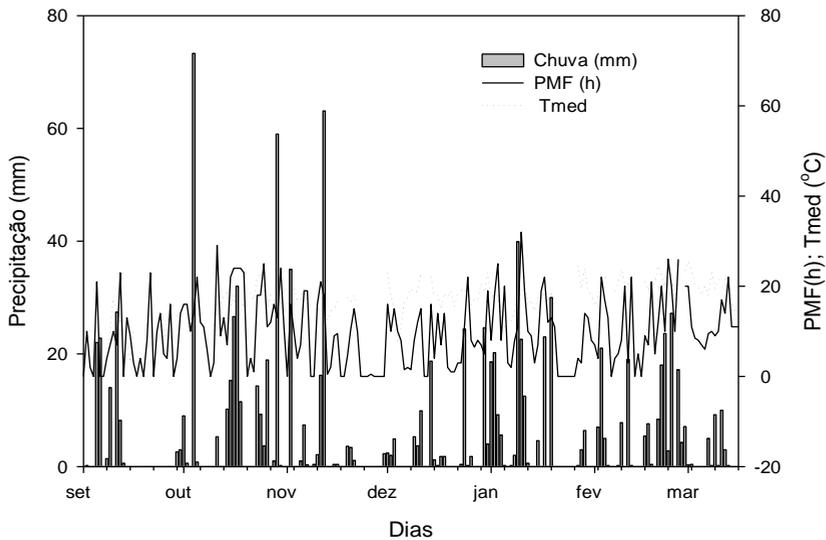


Figura 7. Precipitação diária (mm); período de molhamento foliar (horas) e temperatura média (°C) durante o molhamento, registrados no local do pomar de macieira cv. Royal Gala. Caçador, SC.2008-2009.

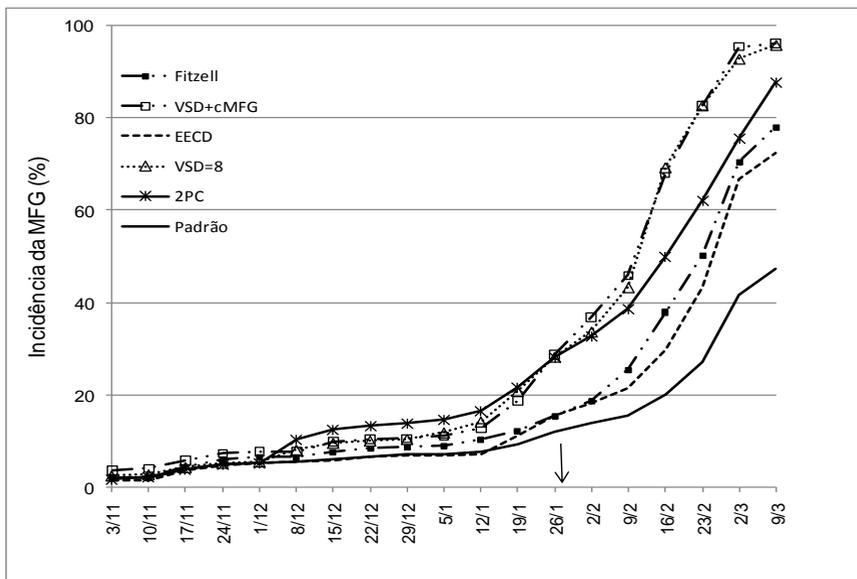


Figura 8. Curva do progresso da incidência da Mancha Foliar da Gala, em folhas de macieira cv. Royal Gala em resposta ao regime de pulverizações determinado pelos sistemas de alerta e comparados ao padrão de pulverização. A seta indica a data de colheita dos frutos para análise de incidência da doença.

Tabela 8. Número de pulverizações da área abaixo da curva de progresso da doença, porcentagem de desfolha e incidência da Mancha Foliar em frutos sob diferentes sistemas de alerta e de calendário fixo em macieira (*Malus domestica*) cv. Royal Gala.

| Tratamento ¹ | AACPD ² | Taxa “r” ³ | IS ⁴ | FMFG |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------|---------|
| T1 | 42,89 BC | 0,0326 BC | 36,71 C | 5,31 BC |
| T2 | 53,68 A | 0,0494 A | 47,35 AB | 6,17 AB |
| T3 | 39,75 C | 0,0376 B | 32,40 CD | 4,95 BC |
| T4 | 53,18 AB | 0,0507 A | 52,08 A | 5,68 AB |
| T5 | 50,57 AB | 0,0367 B | 37,71 BC | 6,70 A |
| T6 | 34,56 C | 0,0259 C | 23,91 D | 4,32 C |
| C.V(%) | 15,65 | 16,52 | 17,19 | 15,91 |
| D.M.S (Fischer) | 10,704 | 0,0096 | 9,852 | 1,314 |

¹T1=modelo Fitzell; T2= modelo VSD+cMFG; T3=modelo EECd; T4=VDS(13). T5=modelo 2PC; T6= 7/7 dias; ²AACPD-Área abaixo da curva do progresso da doença até o final do ensaio em 09/03/09, transformados em raiz quadrada; ³parametro do modelo logístico; ⁴Severidade da doença transformada em índice (IS) pela fórmula de Townsend e Heuberger; ⁵Incidência da doença em frutos, na colheita, transformados em raiz quadrada. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fischer (P=0,05).

3.3. Experimento 3: Caracterização do efeito dos fosfitos e de indutores de resistência sobre a MFG

Efeito da ulvana sobre a severidade da MFG

As folhas superiores foram mais suscetíveis a *C. gloesporioides* do que as inferiores (Figura 9). Pela análise de variância fatorial os fatores posição de folhas e tratamento com ulvana apresentaram efeito significativo. Porém, a interação entre posição de folhas x tratamento não foi significativa a 5% de probabilidade para as variáveis: área foliar necrosada e AACPD. As folhas superiores de plântulas testemunhas apresentaram 6,2% de área foliar necrosada aos 10 DPI e 50,8 de AACPD. Plântulas suscetíveis tratadas 6 DAI com ulvana apresentaram redução significativa de 49% para área foliar necrosada e 38% para AACPD em relação à testemunha (Figura 9). Nas folhas inferiores, a área foliar necrosada da MFG em plântulas testemunhas foi de 2,5% aos 10 DPI e 17,7 de AACPD. A pulverização preventiva com ulvana em folhas inferiores não reduziu a área foliar necrosada (2,1%) e AACPD (13,8), comparado à testemunha pelo teste-t a 5% de probabilidade (Figura 9).

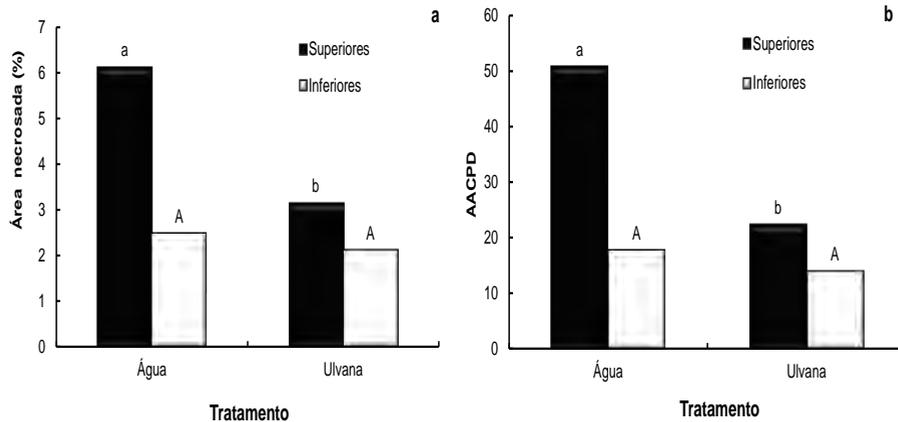


Figura 9. Efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (a) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (b) em folhas superiores e inferiores de plântulas de macieira. Na análise estatística os dados foram transformados para raiz $(x)+1$. Colunas com mesmas letras minúsculas e maiúsculas indicam que não há diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$) quanto ao efeito sobre folhas superiores e inferiores, respectivamente.

Efeito sobre a germinação de conídios

A porcentagem de conídios germinados em plântulas testemunha às 24, 48 e 72 HAI foi de 72, 61 e 85%, respectivamente. A germinação em plântulas tratadas com ulvana foi de 65, 78 e 70%, enquanto que em plântulas resistentes foi de 66, 62 e 41%, às 24, 48 e 72 HAI, respectivamente (Figura 10). Pela análise de regressão não houve diferença estatística para a germinação de conídios entre os diferentes intervalos de tempo analisados (Figura 10). Porém, quando se comparou os tratamentos às 72 HAI, a germinação de conídios em plântulas resistentes foi 62% inferior à testemunha. Às 24 e 48 HAI, não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade (Figura 10).

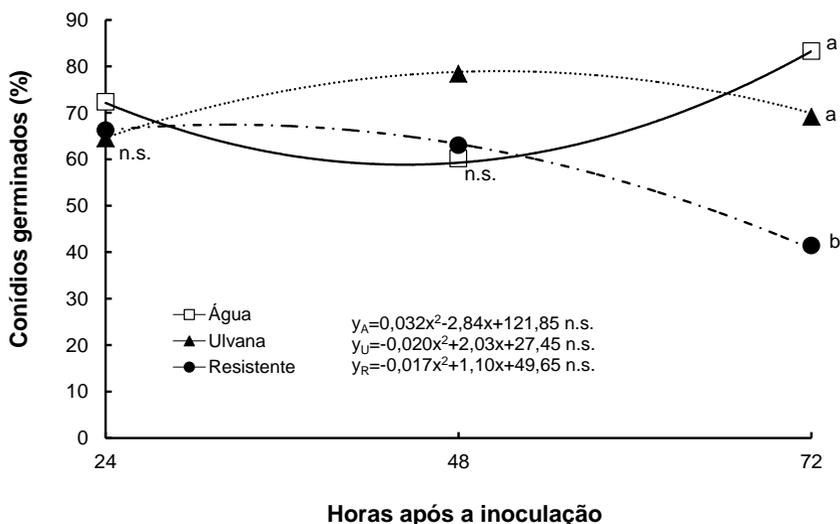


Figura 10. Germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Pontos com mesmas letras minúsculas indicam que não há diferença estatística pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). n.s. = Não significativo. N.S. = indica não significativo pela análise de regressão.

Atividade de peroxidases em plântulas

A atividade de POX em plântulas testemunhas às 24, 48 e 72 HAI foi de 1,54; 4,58 e 1,21 unidades de densidade óptica/mg de proteína/min, respectivamente. A atividade em plântulas tratadas com ulvana foi de 2,44, 5,76 e 4,27, enquanto que em plântulas resistentes foi de 5,84, 4,99 e 4,16 unidades de densidade óptica/mg de proteína/min, às 24, 48 e 72 HAI, respectivamente (Figura 11). A análise de regressão revelou diferença estatística na atividade da POX entre os diferentes intervalos de tempo analisados para plântulas testemunhas e tratadas com ulvana. Entretanto, para plântulas resistentes a análise de regressão não foi significativa (Figura 11).

A atividade de POX em plântulas resistentes 24 HAI foi 279% maior das testemunhas. Plântulas tratadas com ulvana não diferiram das testemunhas. Às 48 HAI não houve diferença estatística entre os tratamentos. A atividade de POX às 72 HAI em plântulas tratadas com ulvana e resistentes foram de 253% e 244%, respectivamente maior em relação às testemunhas (Figura 11).

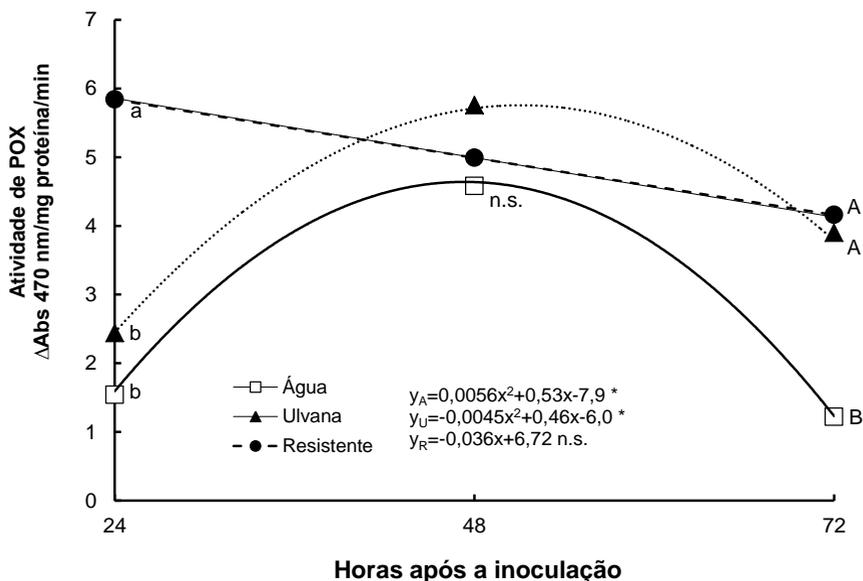


Figura 11. Atividade de peroxidases (POX) em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*. Pontos com mesmas letras minúsculas e maiúsculas indicam que não há diferença estatística pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). n.s. = Não significativo. *Dentro da equação indica diferença significativa, enquanto N.S. (não significativo) pela análise de regressão.

Atividade de glucanases em plântulas

A atividade de GLU em plântulas testemunhas às 24, 48 e 72 HAI foi de 4,01, 2,31 e 2,82 unidades de densidade óptica/mg de proteína/min, respectivamente. A atividade em plântulas tratadas com ulvana foi de 4,32, 3,18 e 3,10, enquanto que em plântulas resistentes foi de 5,71, 2,78 e 3,66 unidades de densidade óptica/mg de proteína/min, às 24, 48 e 72 HAI, respectivamente (Figura 12). A análise de regressão revelou diferença estatística na atividade da GLU entre os diferentes intervalos de tempo analisados para plântulas tratadas com ulvana. Entretanto, para plântulas testemunhas e resistentes a análise de regressão não foi significativa (Figura 12).

A atividade máxima de GLU foi verificada no intervalo 24 HAI. Porém, não houve diferença estatística entre os tratamentos pela análise de variância a 5% de probabilidade às 24, 48 e 72 HAI (Figura 12).

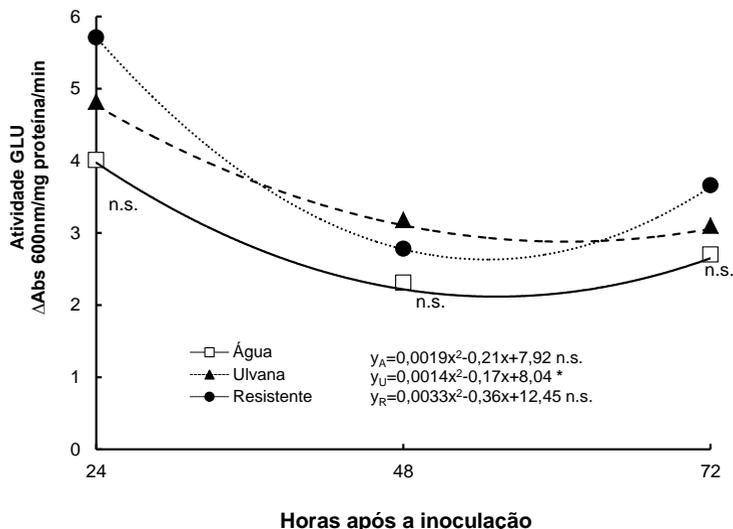


Figura 12. Atividade de glucanases (GLU) em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*. n.s. = Não significativo a 5% de probabilidade. *Dentro da equação indica diferença significativa, enquanto N.S. (não significativo) pela análise de regressão.

Efeito de tratamento preventivo com fosfito

Nenhum composto fungitóxico foi detectado pela técnica de cromatografia de camada fina, a partir de amostras de folhas previamente tratadas com fosfito.

Efeito pós-infeccional dos fosfitos de potássio 0-40-20 (N-P-K)

Mudas testemunhas apresentaram 18% de severidade e 60 de AACPD. Somente o fosfito de potássio (b) 40-20, aplicado curativamente às 48 HAI reduziu significativamente a MFG em relação à testemunha, isto é, em 37% a AACPD e 40% da área foliar necrosada aos dez DAI (Figura 13).

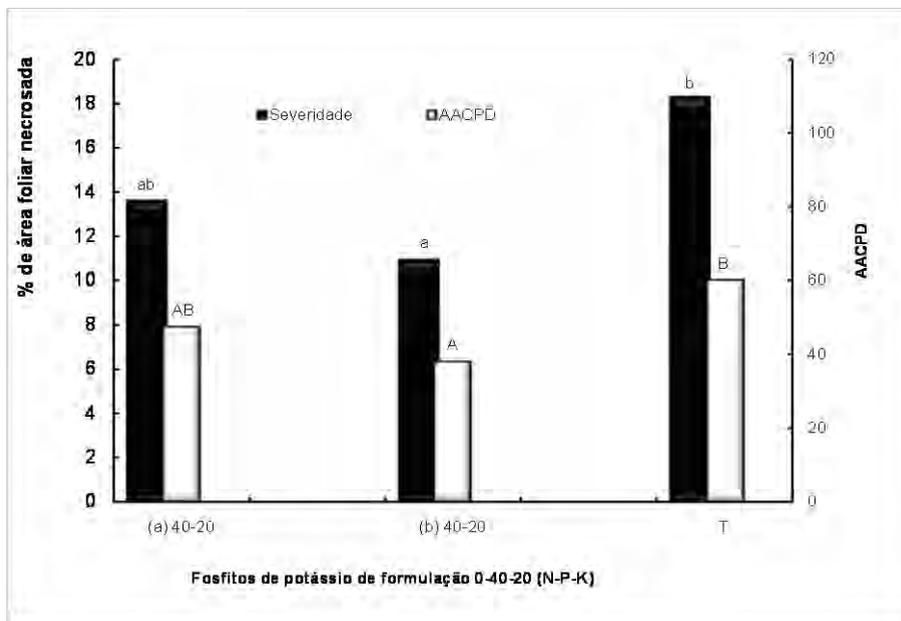


Figura 13. Efeito do tratamento pós-infeccional (48 h após a inoculação), com a formulação 0-40-20 (N-P-K) de fosfitos de potássio sobre a percentagem de área foliar necrosada aos 10 dias após a inoculação (*Colletotrichum gloeosporioides*) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em mudas de macieira. Na análise estatística os dados foram transformados para raiz (x). Colunas com mesmas letras minúsculas e maiúsculas indicam que não há diferença estatística pelo teste de SNK ($\alpha \leq 0,08$). T: Testemunha apenas água. Coeficiente variação para (% área foliar necrosada): 12,6 % e (AACPD): 11,8%.

3.4. Experimento 4: Sobrevivência, fisiologia e variabilidade de isolados de *Cryptosporiopsis* sp. associados a doença olho-de-boi em macieira

3.4.1. Aspecto e coloração das colônias em três deferentes meio de cultura e caracterização dos conídios de *Cryptosporiopsis* sp.

Houve variação quanto a morfologia e coloração das colônias (Figura 14). As colônias nos três meios de cultura apresentavam margem lisa, micélio aéreo bem desenvolvido, medianamente cotonoso a cotonoso. Algumas colônias produziram micélio aéreo denso e floculoso com a presença de zonas concêntricas. A coloração do micélio aéreo variou de cinza-esverdeado a levemente rosado. Em algumas colônias foi observado com micélio central submerso avermelhado e margem

levemente rosada (Figura 14, BDA-A-5). A maior variação de coloração foi observada no lado inverso das colônias. No meio V8, variou de amarelo-avermelhado à vermelho-púrpura, no meio AEM de rosa à variações de laranja-avermelho à púrpura e no meio BDA acidificado de cinza-esverdeado à vermelho alaranjado.

Nos três meios de cultura testados, não houve diferença significativa quando as dimensões médias de macroconídios e microconídios. As colônias produziram nos três meios de cultura macroconídios curvos, hialinos, unicelulares, com extremidades arredondadas à levemente pontiagudo e com dimensões variando de 4-7 x 15-30 μ m e microconídios cilíndricos, retos e alguns, levemente curvados nas pontas com ápice arredondado e dimensões variando de 1-2 x 5-8 μ m.

Houve interação significativa entre os fatores isolados e meio de cultura de modo que foram realizados dois testes de média dentro de cada isolado e meio de cultura (Tabela 9). Houve diferença significativa quanto ao crescimento micelial e produção de microconídios ($p < 0,05$) para os nove isolados de *C. perennans* nos meios de cultura avaliados (Tabela 9). No meio de cultura V8 foi observado o maior crescimento micelial das colônias para todos os isolados, exceto para o isolado 5, que teve o menor valor entre todos. O menor desenvolvimento micelial das colônias foi observado para o isolado 5 no meio de cultura BDA- acid (Tabela 9). Dos nove isolados avaliados somente os isolados 4, 5 e 9 não diferiram significativas no desenvolvimento micelial das colônias nos meios BDA-acid e AEM, e somente o isolado 6 não diferiu no seu crescimento micelial quando comparado nos meios de cultura AEM versus V8.

Houve diferença significativa na quantidade de conídios produzidos pelos diferentes isolados no meio de cultura V8, destacando o isolado 2 com a maior esporulação (Tabela 9). O meio de cultura V8 sob regime de fotoperíodo de 12 hs é o mais eficiente no crescimento micelial e produção do conídios de *C. perennans*.

Meio de cultura contendo alta concentração de carboidratos pode estimular o crescimento micelial, mas não a esporulação (MOORE-LANDECKER, 1972). Já meios com baixo teor de carboidratos, mas com extratos vegetais, normalmente estimulam a esporulação de vários fungos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995), sendo o que foi observado para *C. perennans* em relação ao meio V8 (Tabela 9). A variabilidade do patógeno é confirmada pelos resultados obtidos por Dugan et al. (1993), que mostraram que o estímulo diferencial observado em alguns isolados, por um dos meios de cultura, nem sempre se mantém constante quando da variação de fotoperíodo. O maior estímulo ao desenvolvimento das colônias, bem como a produção de esporos, exercido pelos meios de culturas V8 e AEM, para a maioria dos isolados, justifica a sua escolha isoladamente ou associados, sendo recomendado o seu uso nos estudos futuros deste patógeno no Brasil.

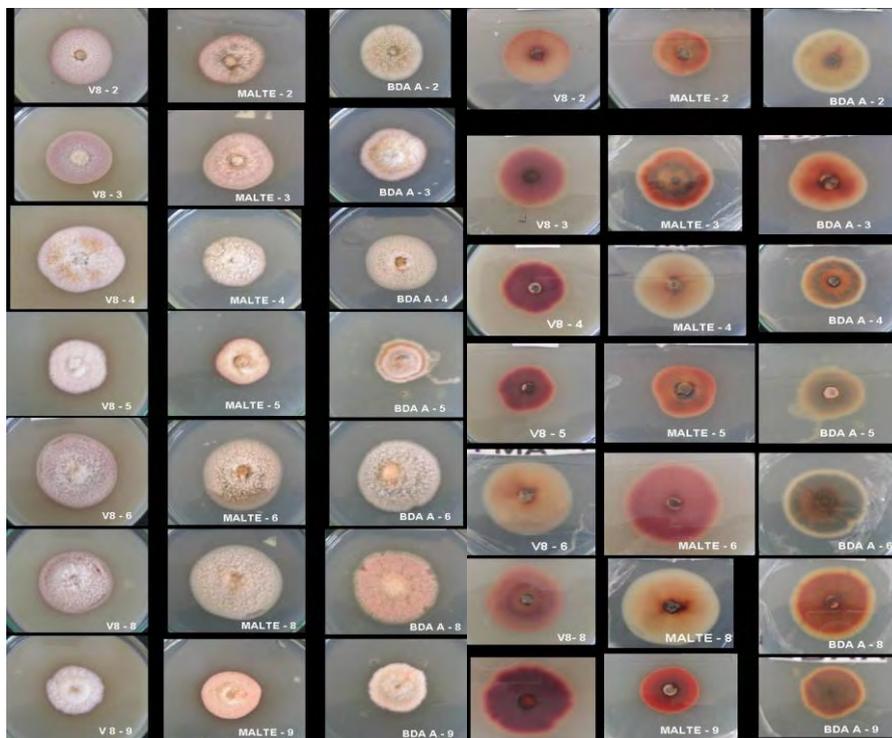


Figura 14. Aspecto e coloração de colônias (esquerda: parte superior das placas; direita: lado inverso das placas) de isolados de *Cryptosporiopsis perennans*, isolados de frutos de macieira, ao 13° de incubação. V8 (meio V8 ágar); MALTE (extrato de malte ágar); BDA A (batata-dextrose-ágar acidificado); 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 (número do isolado).

Tabela 9. Médias de crescimento micelial e produção de microconídios de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meio de cultura aos 13° dias após a inoculação.

| Isolados | Crescimento micelial (mm) | | | Esporulação microconídios x 10 ⁴ / mL | | |
|----------|------------------------------|---------|---------|--|----------|---------|
| | Meio de cultura ¹ | | | | | |
| | BDA-acid | V8 | AEM | BDA | V8 | AEM |
| 1 | 29,0 Bb | 33,4 Ba | 31,6 Ba | 41,1 Cc | 115,2 Ca | 66,0 Cb |
| 2 | 30,9 Bb | 34,5 Ba | 30,0 Bb | 23,7 Dc | 186,0 Aa | 95,7 Ab |
| 3 | 33,9 Aa | 33,0 Ba | 28,8 Bb | 45,1 Cc | 89,7 Da | 77,0 Bb |
| 4 | 30,1 Bb | 31,6 Bb | 37,1 Aa | 16,0 Ec | 100,5 Da | 32,7 Db |
| 5 | 17,1 Dc | 27,8 Ca | 23,5 Cb | 27,0 Dc | 66,2 Eb | 81,7 Ba |
| 6 | 34,1 Ab | 39,6 Aa | 38,3 Aa | 79,0 Ab | 94,2 Da | 38,5 Dc |
| 7 | 25,6 Cb | 33,7 Ba | 32,0 Ba | 47,5 Cc | 126,1 Ca | 64,2 Cb |
| 8 | 37,0 Aa | 38,9 Aa | 39,4 Aa | 66,2 Bd | 124,2 Ca | 55,5 Cc |
| 9 | 20,0 Cc | 28,2 Ba | 24,5 Cb | 30,7 Dc | 145,5 Ba | 81,0 Bb |
| CV % | 6,2 | 4,9 | 4,7 | 11,2 | 9,4 | 7,8 |

¹ BDA-acid= batata dextrose ágar acidificado; V8= V8-ágar; AEM= extrato de malte. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

3.4.2. Suscetibilidade a diferentes temperaturas

Com a temperatura de 3°C não houve crescimento micelial de nenhum dos onze isolados em nenhuma das datas de avaliação (5, 15 e 21 dias) (dados não mostrados). O efeito da temperatura a 5°C foi a variável que mais contribuiu para diferenciar os isolados entre si, sendo que a temperatura de 30°C foi a variável que mais contribuiu para diferenciar o isolado Cp5 dos demais (Tabela 10).

3.4.3. Caracterização enzimática

Os onze isolados de *Cryptosporiopsis* sp mostraram capacidade de produzir as enzimas amilolítica, Rnase, lipolítica e pectolítica pH5. Houve diferenciação dos isolados na produção das enzimas proteolítica, Dnase e pectolítica pH7 (Tabela 11). A maior ou menor capacidade de fungos em produzir enzimas em substratos específicos, permite diferenciar isolados de uma mesma espécie de forma simples (PATERSON; BRIDGE, 1994 apud LIMA et al, 2003). É possível, que a atividade das enzimas lipase, amilase e protease, possa estar diretamente relacionada com o nível de virulência dos isolados. Essa associação entre virulência e atividade enzimática pode desempenhar um importante papel na interação patógeno-hospedeiro (BOCCHESI et al., 2003). Pelos resultados obtidos, sugere-se que *Cryptosporiopsis* sp tem a capacidade de utilizar amido e lipídios como fonte de energia. Admite-se também, que durante o período de incubação no hospedeiro, o fungo libera enzimas (amilases, proteases) que ativamente degradam os componentes presentes no tecido infectado do hospedeiro.

Tabela 10. Crescimento micelial médio (CMM) de onze isolados de *Cryptosporiopsis* sp a diferentes temperaturas – 21 dias após a incubação

| Isolado | CMM 4°C ¹ | Isolado | CMM 5°C ¹ | Isolado | CMM 30°C ¹ | Isolado | CMM 31°C ¹ |
|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|
| 6 | 18,33 A | 6 | 22,59 A | 7 | 26,27 A | 6 | 22,97 A |
| 8 | 17,22 AB | 7 | 21,43 B | 6 | 24,93 B | 8 | 18,77 B |
| 7 | 16,65 AB | 3 | 19,84 C | 8 | 19,02 C | 7 | 18,64 B |
| 4 | 15,66 BC | 4 | 19,77 C | 4 | 18,51 CD | 4 | 15,44 C |
| 3 | 15,62 BC | 8 | 18,85 D | 3 | 17,76 DE | 11 | 15,40 C |
| 1 | 14,50 CD | 2 | 16,72 E | 2 | 17,23 EF | 2 | 15,39 C |
| 9 | 14,00 CDE | 11 | 15,15 F | 9 | 16,79 EF | 9 | 14,92 C |
| 11 | 13,84DE | 5 | 14,72 FG | 11 | 16,62 F | 3 | 13,81 D |
| 10 | 13,73 DE | 9 | 12,27 G | 1 | 15,37 G | 10 | 13,30 DE |
| 2 | 12,55 EF | 10 | 13,17 H | 10 | 14,18 H | 1 | 12,52 E |
| 5 | 11,81 F | 1 | 0,00 I | 5 | 12,47 I | 5 | 12,45 E |
| CV | 3,88 | CV | 1,67 | CV | 1,98 | CV | 1,99 |

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey 5%

Tabela 11. Caracterização enzimática de onze isolados de *Cryptosporiopsis* sp.

| Isolado | Meio enzimático | | | | | | |
|---------|-----------------|-------------|----------|----------|------------|------------|------------|
| | Proteolítica | Amilolítica | Dnase | Rnase | Lipolítica | Pecto pH 5 | Pecto pH 7 |
| Cp 1 | positiva | Positiva | Negativa | positiva | Positiva | Positiva | Positiva |
| Cp 2 | negativa | Positiva | Negativa | positiva | Positiva | Positiva | Positiva |
| Cp 3 | negativa | Positiva | Positiva | positiva | Positiva | Positiva | Positiva |
| Cp 4 | positiva | Positiva | Positiva | positiva | Positiva | Positiva | Positiva |
| Cp 5 | negativa | Positiva | Negativa | positiva | Positiva | Positiva | Positiva |
| Cp 6 | negativa | Positiva | Positiva | positiva | Positiva | Positiva | Positiva |
| Cp 7 | positiva | Positiva | Positiva | positiva | Positiva | Positiva | Positiva |
| Cp 8 | positiva | Positiva | Positiva | positiva | Positiva | Positiva | Positiva |
| Cp 9 | negativa | Positiva | Positiva | positiva | Positiva | Positiva | negativa |
| Cp 10 | negativa | Positiva | Negativa | positiva | Positiva | Positiva | negativa |
| Cp 11 | positiva | Positiva | Positiva | positiva | Positiva | Positiva | Positiva |

3.4.4. Patogenicidade dos isolados

O teste de patogenicidade revelou a suscetibilidade das maçãs cv. Fuji e cv. Pink Lady aos onze isolados (Cp1 a Cp11) de *Cryptosporiopsis* sp., independente da indução de ferimento ou não. Valdebenito Sanhueza et al. (2004), já havia demonstrado não haver diferença na suscetibilidade das cultivares Fuji e Pink Lady a nove isolados (Cp1 a Cp9) de *Cryptosporiopsis* sp. Quinze dias após a inoculação já havia sintomas característicos da podridão “olho-de-boi” nas frutas das duas cultivares testadas. Todos os isolados apresentam a podridão morfolologicamente igual nas duas cultivares testadas, porém, na cultivar Fuji a média do tamanho da podridão é superior do que na cultivar Pink Lady. Resultado semelhante foi relatado por Valdebenito Sanhueza et al. (2004). Nos experimentos onde fez-se ferimentos, o isolado Cp9 foi o que apresentou maior virulência nas cultivares Pink Lady e Fuji (Tabela 12). Já no experimento sem ferimento, feito apenas com a cultivar Pink Lady, não houve diferença estatística significativa entre os isolados (Tabela 13).

Os apotécios não foram encontrados a campo em nenhuma das inoculações feitas, entretanto, todos os isolados apresentaram a formação de cancos. Em outubro de 1956, o apotécio pertencente à *Pezicula malicorticis* foi encontrado em macieiras no Leste da Holanda, estas haviam sido inoculadas com micélio de *Gloeosporium perennans* em outubro de 1955. O diâmetro do apotécio encontrado foi de 0,4-1,6mm, e a sua formação foi favorecida por períodos de umidade antes do verão (BOLAY, 1956).

Tabela 12. Patogenicidade de isolados de *Cryptosporiopsis* sp em frutos com ferimento cv Pink Lady e Fuji.

| Isolado | Pink Lady (mm) ¹ | Isolado | Fuji (mm) ¹ |
|---------|-----------------------------|---------|------------------------|
| 9 | 28,44 A | 9 | 33,20 A |
| 4 | 26,38 AB | 10 | 28,31 B |
| 10 | 25,34 ABC | 5 | 28,27 B |
| 11 | 25,10 ABC | 8 | 27,34 B |
| 8 | 24,11 ABC | 6 | 25,30 BC |
| 6 | 22,68 ABC | 3 | 23,81 BCD |
| 5 | 21,88 BC | 7 | 21,52 CD |
| 3 | 20,33 BCD | 11 | 19,15 DE |
| 7 | 19,68 CD | 4 | 19,15 DE |
| 1 | 15,64 D | 2 | 14,62 EF |
| 2 | 14,66 D | 1 | 13,98 F |
| CV | 9,42 | CV | 7,07 |

¹ Valores seguidos pela mesma letra não diferem na vertical pelo teste de Tukey (5%)

Tabela 13. Patogenicidade de isolados de *Cryptosporiopsis* sp em frutos sem ferimento cv Pink Lady.

| Isolado | lesões/lenticela ¹ |
|---------|-------------------------------|
| Cp 9 | 5,00 a |
| Cp 6 | 4,00 a |
| Cp 5 | 4,00 a |
| Cp 8 | 3,66 a |
| Cp 2 | 3,66 a |
| Cp 11 | 3,33 a |
| Cp 7 | 3,33 a |
| Cp 3 | 3,00 a |
| Cp 10 | 2,66 a |
| Cp 4 | 2,00 a |
| Cp 1 | 1,00 a |
| CV | 48,01 |

¹ Valores seguidos pela mesma letra não diferem na vertical pelo teste de Tukey (5%)

3.5. Experimento 5: Etiologia e caracterização da infecção das maçãs por *Cryptosporiopsis perennans*

3.5.1. Determinação de meio seletivo para *C. perennans*

No ensaio para avaliação dos inibidores de contaminantes, não foi observado crescimento de *C. perennans* nos meios suplementados com nistatina na dose de $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O desenvolvimento de *C. perennans* foi estatisticamente igual ($P>0,05$) ao observado no meio BDA acidificado e nos com meios com tetraciclina em pH neutro (Figura 15A e Figura 15B). Segundo Miller (1932), *C. perennans* apresenta desenvolvimento em BDA, numa faixa de pH entre 2,2 e 11,3. Dessa forma, a ampla faixa de pH para o crescimento de *C. perennans* pode explicar a similaridade no crescimento micelial em BDA e BDA pH 4,5.

O menor tempo necessário para a realização das avaliações foi de sete dias, pelo uso dos meios BDA acidificado e BDA+tetraciclina. A diminuição das doses de nistatina permitiu o crescimento de *C. perennans* apenas na menor concentração ($1\mu\text{g mL}^{-1}$). Após sete dias de incubação, o meio BDA com pH neutro suplementado com tetraciclina, nistatina e iprodiona, nas respectivas doses de $12,5\mu\text{g mL}^{-1}$, $1\mu\text{g mL}^{-1}$ e $1\mu\text{g mL}^{-1}$, não inibiu o desenvolvimento de *C. perennans* quando comparado ao meio BDA pH neutro ou em BDA acidificado ($P>0,05$) (Figura 15C e Figura 15D).

Na validação do meio semiseletivo contendo os dois antibióticos e o fungicida, foi observada uma redução significativa do número de fungos leveduriformes, dematiáceos e de leveduras e, em relação ao meio BDA acidificado, não reduziu a recuperação de colônias de *C. perennans* dos frutos inoculados (Figura 15F) ou não inoculados (Figura 15E) ($P>0,05$). Conforme Spotts (1985), um meio semiseletivo deve ser capaz de recuperar o patógeno de interesse também sob condições de infestação natural para reduzir a probabilidade de falsos negativos, conforme apresentado pelo mesmo autor em isolamentos de patógenos em peras, com a utilização de BDA acidificado.

Apesar de o meio BDA pH 4,5 ter permitido recuperar o mesmo número de colônias de *C. perennans* que o meio semiseletivo proposto, esse último, em atividades de rotina no laboratório, apresenta como vantagem a facilidade nas avaliações pelo menor número total de contaminantes. Tal resultado corrobora as avaliações realizadas por Maffioletti (2007), uma vez que a utilização do meio BDA pH 4,5 permitiu a recuperação de *C. perennans* em números semelhantes, com a utilização do meio BDATNI. Finalmente, o meio semiseletivo permitiu detectar e quantificar o inoculo do patógeno presente na superfície dos frutos nas quatro concentrações de inoculo aspergidas sobre os frutos ($r=0,88$; $P=0,04$), o que não ocorreu pela utilização do BDA acidificado ($r=0,23$; $P=0,47$). A incidência da podridão olho-de-boi nos frutos incubados só foi observada nos tratamentos com aspersão de 10^5 e 10^6 conídios mL^{-1} , com incidência média de 4 e 8%, respectivamente.

O meio semiseletivo proposto no presente trabalho possibilitará estudos de flutuação de inóculo, uma vez que permite detectar com correção o inoculo nos frutos, principalmente, na fase final de formação do fruto, período de maior

suscetibilidade às infecções por *C. perennans* (HENRÍQUEZ et al., 2008). A maior restrição no desenvolvimento dos microorganismos e a adequada quantificação de *C. perennans*, quando comparada à obtida pelo uso de BDA acidificado, em associação com a fácil preparação, qualificam a utilização do meio semiseletivo em trabalhos de rotina do laboratório.

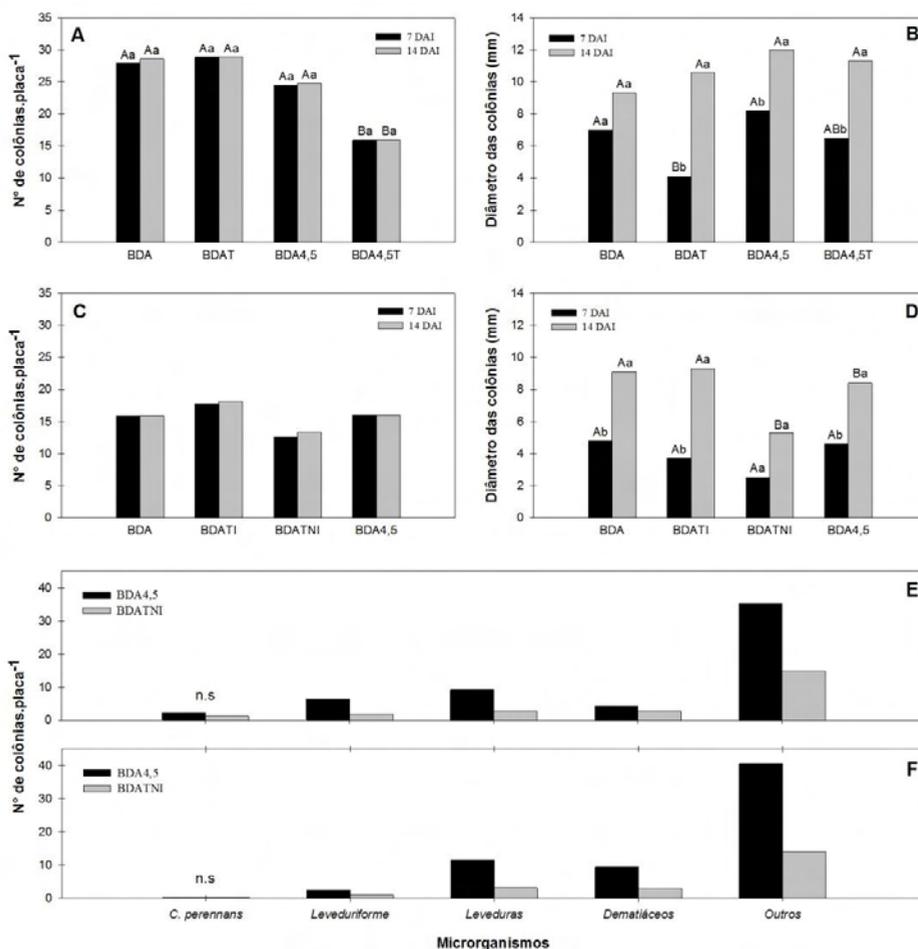


Figura 15. Influência da composição e do pH dos meios no número e tamanho médio de colônias de *Cryptosporidium parvum* aos sete e aos 14 dias após a inoculação (DAI) no primeiro (A, B) e no segundo ensaio (C, D), em que colunas com letras maiúsculas distintas entre os meios e minúsculas entre DAI diferem entre si pelo teste de comparação de médias de Tukey ($P < 0,05$). Número e tipo de microorganismos isolados a partir da lavagem de uma amostra de maçãs da cultivar “Fuji” previamente inoculadas por aspersão com *Cryptosporidium parvum* (E) e não inoculadas (F). Médias em cada par de colunas foram estatisticamente diferentes entre si pelo Teste-t ($P < 0,05$), exceto quando indicado (^{ns} = não significativo).

3.5.2. Controle da podridão olho-de-boi através de tratamentos erradicantes no período de dormência da macieira

No período da floração da macieira (setembro e outubro) no ciclo 2006/07, ocorreram 10 dias de chuva, totalizando 83 mm (Figura 16). No mesmo período do ciclo 2007/08, foram contabilizados 18 dias com chuva acumulando de 237 mm, sendo registrados cinco eventos de chuva de granizo. No estágio final de maturação dos frutos o ciclo 2007/08 apresentou um decréscimo no volume de chuva comparado ao ciclo 2006/07. Nos três meses antecedentes à colheita (fevereiro a abril de 2008), o volume de chuva acumulado foi de 32 mm distribuídos em seis dias de chuva enquanto que, no mesmo período do ano anterior, foram observados 159 mm em 11 dias de chuva. Em ambos os ciclos foi registrada uma queda acentuada na temperatura do ar no mês referente à colheita (Figura 16).

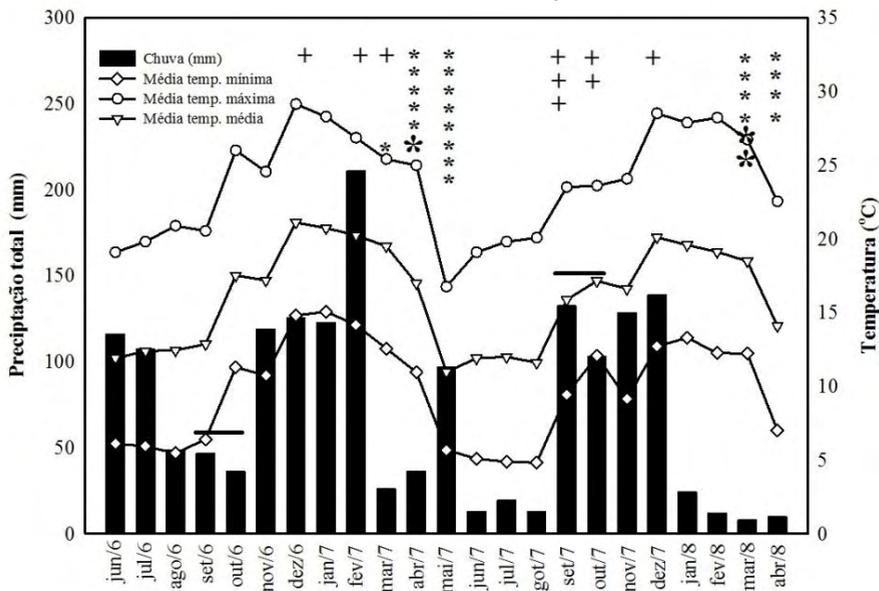


Figura 16. Variáveis ambientais associadas à ocorrência da podridão olho-de-boi. Linha horizontal correspondente ao período da floração. Asteriscos correspondentes a períodos favoráveis às infecções por *Cryptosporiopsis sp.* (risco moderado = *; risco severo = **). Ocorrência de chuva de granizo assinalada por (+).

No momento da aplicação dos tratamentos foram recuperadas colônias de *Cryptosporiopsis sp.* no meio semi-seletivo da lavagem de todos os tipos de tecidos amostrados das macieiras. Antes da aplicação dos tratamentos, o número de UFC variou de 2,0 a 2,8 UFC.g⁻¹ de tecido vegetal em ramos de 1 ano; 1,0 a 1,6 UFC.g⁻¹ em ramos de dois anos e; 1,2 a 1,6 UFC.g⁻¹ em gemas floríferas. Os valores não diferiram entre os tratamentos e ciclo, tanto para amostras de ramos como de gemas, sendo então os dados agrupados na análise comparativa entre ramos de diferentes idades e gema. A maior densidade de inóculo de *Cryptosporiopsis sp.* foi

observada em ramos de 1 ano, seguido de ramos de dois anos e gemas ($P=0,003$) (Figura 17). A aplicação dos fungicidas reduziu em mais de 70% a densidade do inóculo presente na superfície dos ramos antes da aplicação, não havendo diferença entre os tratamentos em ambos os ciclos avaliados (Figura 17).

A redução no número de propágulos nas gemas florais variou em função dos fungicidas utilizados. A calda sulfocálcica foi a que promoveu a maior taxa redução do inóculo entre os tratamentos avaliados, atingindo valores próximos a 100% (Figura 17). A incidência total de POB pode ser explicada em 95% pela população epífita de *Cryptosporiopsis sp.* em gemas florais, havendo relação linear positiva entre tais parâmetros ($P = 0,001$) (Figura 18). Em nenhum dos ciclos foram observados sintomas de fitotoxicidade, mesmo com a proximidade da aplicação dos tratamentos com a data do tratamento para a superação da dormência. Comparando-se os ciclos, a incidência de POB foi 40% superior no ciclo 2007/08, na testemunha (Figura 19).

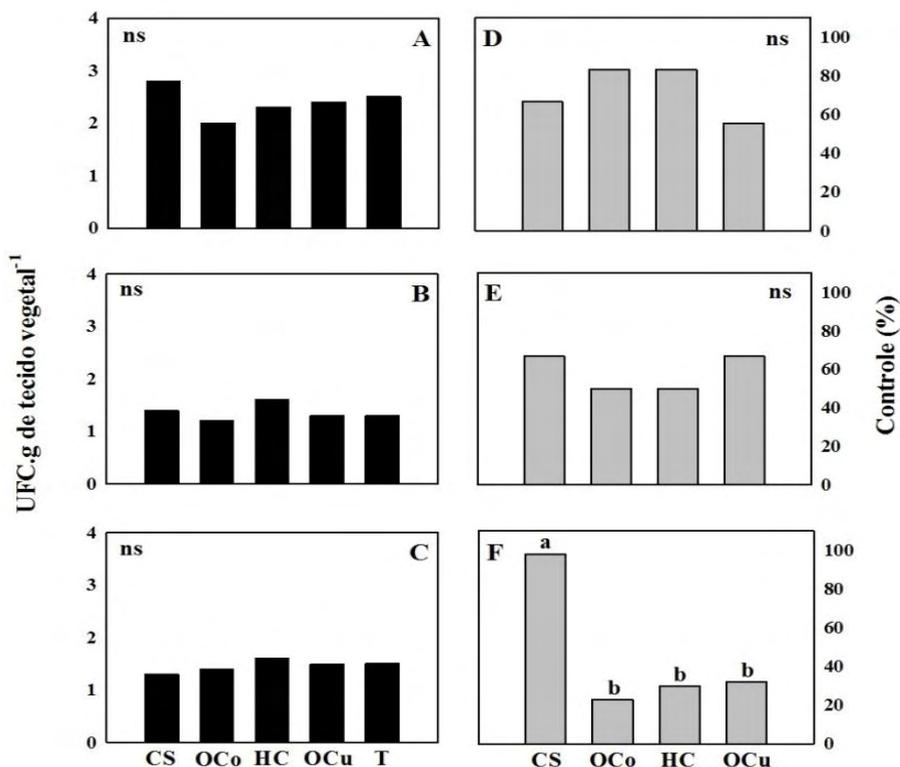


Figura 17. Propágulos de *Cryptosporiopsis sp.* recuperados por lavagem durante os ciclos 2006/07 e 2007/08 (A, B e C) em ramos de 1 ano (A); ramos de dois anos (B) e; gemas floríferas (C). Dados seguidos por letras distintas diferem entre si ($P<0,05$) pela menor diferença significativa (DMS). CS = calda sulfocálcica; OCo = oxicleto de cobre; HC = hidróxido de cobre e; OCu = óxido cuproso. D, E e F controle (redução) no número de propágulo nas respectivas estruturas.

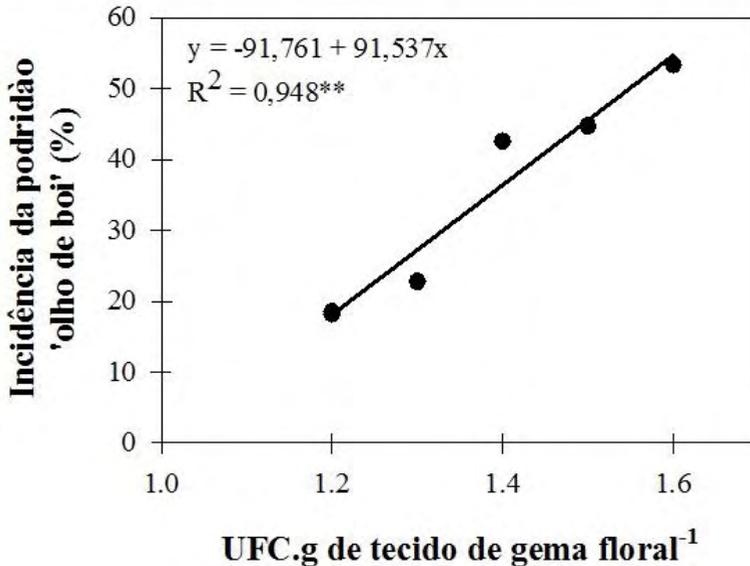


Figura 18. Relação entre a população epifita de *Cryptosporiopsis sp.* em gemas florais e o dano final em maçãs cv. 'Pink Lady[®]'. Pontos correspondem à média das parcelas experimentais nos ciclos 2006/2007 e 2007/2008. Vacaria-RS.

A maior favorabilidade à doença no segundo ciclo foi ratificada pela taxa anual de variação positiva para todos os parâmetros de incidência de POB na testemunha (Figura 19). Quanto aos tratamentos de inverno, apenas aqueles com produtos à base de cobre apresentaram taxa de variação de incidência de POB nula entre os ciclos avaliados, com destaque para óxido cuproso (Figura 19). A flutuação no número de UFC na superfície de frutos assintomáticos na testemunha variou entre os anos. Em ambos os ciclos houve um incremento linear no número de UFC no curso da maturação dos frutos ($P < 0,0001$) atingindo valores médios finais de 1100 UFC.fruto⁻¹ e 1400 UFC.fruto⁻¹, nos ciclos 2006/07 e 2007/08, respectivamente (Figura 20).

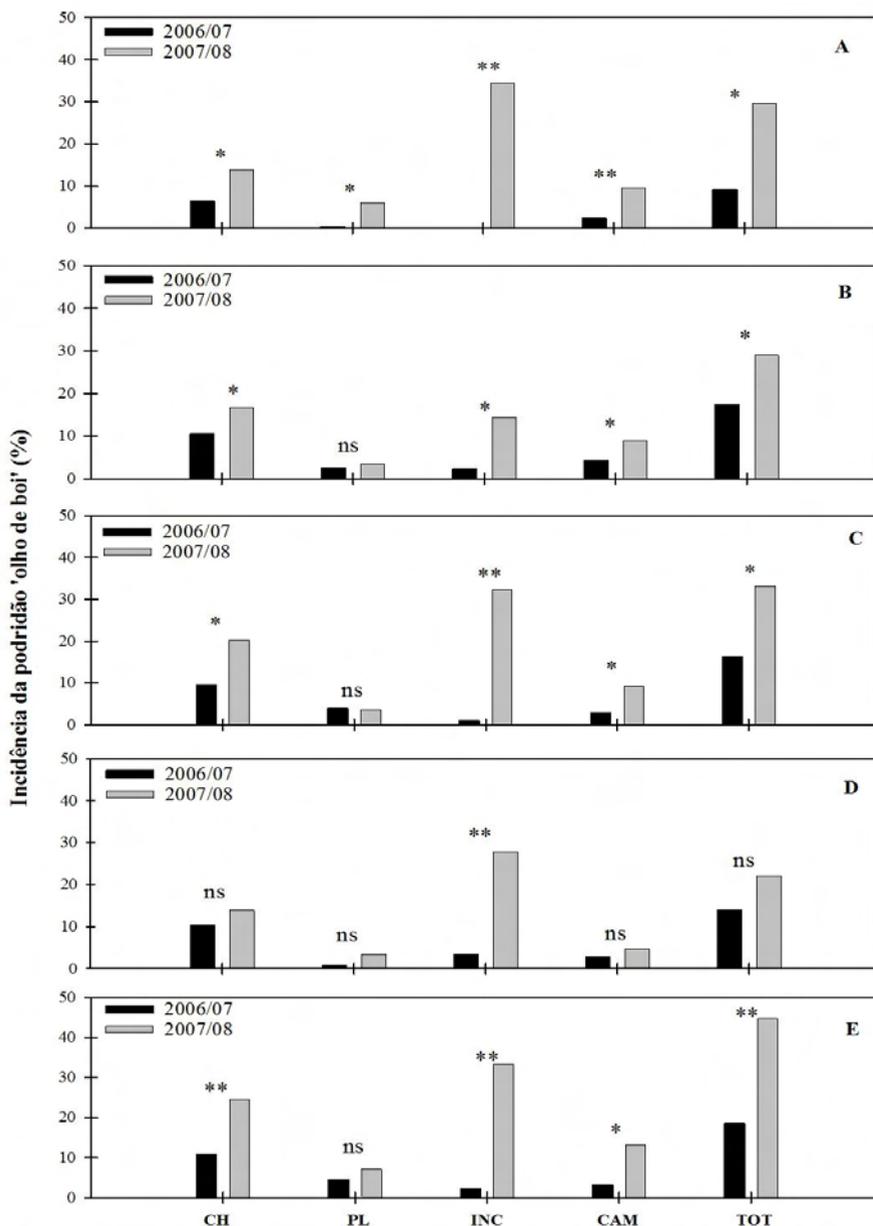


Figura 19. Podridão olho-de-boi em maçãs 'Pink Lady[®]' caídas no chão (CH); na planta no momento da colheita (PL); a partir da detecção das infecções latentes (INC); após três meses em frigoconservação (CAM) e; no incidência total (TOT) pela soma das classes CH, PL E CAM nos tratamentos utilizados: A) calda sulfocálcica; B) oxiclóreto de cobre; C) hidróxido de cobre; D) óxido cuproso e E) testemunha nos ciclos 2006/2007 e 2007/2008. Vacaria, RS. *Significância a $P < 0,05$, ** Significância a $P < 0,01$.

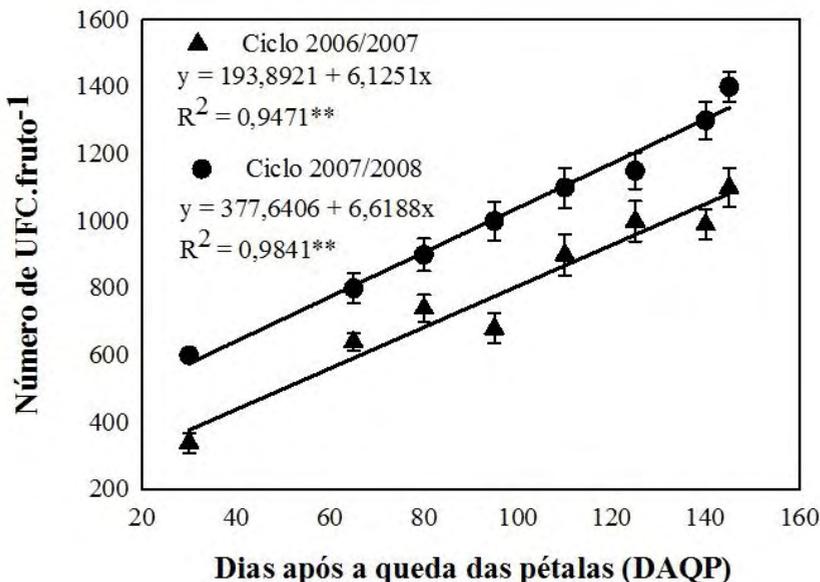


Figura 20. Quantificação do número de UFC de *Cryptosporiopsis sp.* recuperadas a partir da lavagem e sonicação de maçãs 'Pink Lady[®]' amostradas durante o ciclos 2006/2007 e 2007/2008 no tratamento referente à testemunha (sem tratamento de inverno) e cultivada em meio seletivo. Média obtida por cinco repetições

Quanto às perdas, no ciclo 2006/07 houve diferença significativa entre os tratamentos apenas para a incidência de POB no momento da colheita e na incidência total (Tabela 14). Nesta última, apenas o tratamento com a calda sulfocálcica possibilitou a redução das perdas quando comparado à testemunha, atingindo controle superior a 50% (Tabela 14). A maior incidência de POB no ciclo 2007/08 possibilitou uma melhor discriminação entre os tratamentos. Nesse, a incidência de POB foi menor nos frutos caídos ao chão nos tratamentos fungicidas quando comparados à testemunha (Tabela 14). Os fungicidas tiveram efeito diferencial ainda sobre os demais parâmetros avaliados, exceto quanto à incidência de POB no momento da colheita (frutos na planta). Houve destaque para o oxiclóreto de cobre e óxido cuproso, respectivamente, na redução das infecções latentes e da incidência da podridão em frutos após três meses de frigoconservação (Tabela 14). Todos os tratamentos fungicidas foram igualmente capazes de reduzir a incidência de POB quando comparados à testemunha, com destaque para o óxido cuproso que promoveu controle superior a 50% em relação à testemunha (Tabela 14).

Tabela 14. Efeito da aplicação de fungicidas no repouso das macieiras na incidência da podridão olho-de-boi em maçãs 'Pink Lady[®]'. Vacaria, RS. 2006/07 – 2007/08.

| Incidência da podridão olho-de-boi (%) em dois ciclos ^W | | | | | | | | | | |
|--|-------------------|--------|------------------|-------------------|-------------------------------|--------|-------------------|--------|--------------------|--------|
| Fungicidas | Frutos no chão | | Frutos na planta | | Infecção latente ^Y | | Câmara fria | | Total ^X | |
| | 06/07 | 07/08 | 06/07 | 07/08 | 06/07 | 07/08 | 06/07 | 07/08 | 06/07 | 07/08 |
| CS | 6,5 ^{ns} | 13,9 B | 0,2 C | 6,1 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 34,4 A | 2,3 ^{ns} | 9,6 B | 9,1 A | 29,6 B |
| OCo | 10,5 | 16,6 B | 2,5 B | 3,4 | 2,2 | 14,4 B | 4,2 | 8,9 B | 17,3 B | 28,9 B |
| HC | 9,4 | 20,2 B | 3,8 AB | 3,7 | 1,1 | 32,2 A | 3,3 | 9,2 B | 16,2 B | 33,1 B |
| OCu | 10,2 | 13,9 B | 0,8 C | 3,4 | 3,3 | 27,8 A | 2,7 | 4,6 C | 13,8 B | 22,0 B |
| Test. | 10,8 | 24,5 A | 4,4 A | 7,1 | 2,2 | 33,3 A | 3,1 | 13,2 A | 18,4 B | 44,7 A |

| Controle da podridão olho-de-boi (%) em dois ciclos | | | | | | | | | | |
|---|----------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|-------------|-------|--------------------|-------|
| Fungicidas | Frutos no chão | | Frutos na planta | | Infecção latente | | Câmara fria | | Total ^X | |
| | 06/07 | 07/08 | 06/07 | 07/08 | 06/07 | 07/08 | 06/07 | 07/08 | 06/07 | 07/08 |
| CS | 40,0 | 43,2 | 93,6 | 14,1 | 100,0 | 0,0 | 26,7 | 26,6 | 50,6 | 33,7 |
| OCo | 3,0 | 32,0 | 43,1 | 51,7 | 0,0 | 56,6 | 0,0 | 32,0 | 6,2 | 35,1 |
| HC | 12,6 | 17,2 | 12,3 | 47,7 | 50,0 | 3,3 | 8,4 | 29,7 | 11,8 | 25,8 |
| OCu | 5,1 | 43,0 | 81,1 | 51,2 | 0,0 | 16,6 | 15,0 | 64,5 | 25,1 | 50,6 |

^K Tratamentos erradicantes avaliados: calda sulfocálcica (CS), oxicleto de cobre (Oco), hidróxido de cobre (HC), óxido cuproso (OCu) e testemunha (Test.). ^X Valor obtido pelo somatório dos danos observados nos frutos no chão, frutos na planta e após o período de três meses em armazenamento frigorificado. ^Y Infecção detectada pela incubação de frutos assintomáticos a 25 °C por 30 dias. ^W Médias comparadas pela diferença mínima significativa (DMS, $P < 0,05$).

Todos os tratamentos possibilitaram uma vantagem econômica no controle da POB (Tabela 15). O uso de calda sulfocálcica, no ciclo 2006/07 foi, dentre os tratamentos avaliados, aquele que apresentou o maior benefício econômico. No ciclo 2007/08, os benefícios obtidos pelo uso dos fungicidas foram maiores do que no ciclo anterior como resposta à maior incidência da doença e das perdas por POB. O retorno econômico (relação entre o benefício obtido e o valor investido no controle) foi dissociado do benefício, onde o uso de oxicleto de cobre a 0,5% foi o tratamento que possibilitou o maior valor no ciclo 2007/08 (Tabela 15). Em estudos de aerobiologia de *Cryptosporiopsis sp.* foi verificada relação entre a liberação de propágulos do patógeno com a ocorrência de chuva (CORKE, 1967), sugerindo o papel dos respingos de chuva na dispersão dos ascósporos e conídios do fungo. Os dois ciclos avaliados nesse trabalho foram distintos quanto à distribuição, frequência e volume de chuva o que, associado à ocorrência de chuvas de granizo pode ter estimulado um aporte maior de inóculo no ciclo 2007/08, uma vez que as lesões causadas pelo granizo entre os meses de agosto a dezembro atuavam efetivamente como sítio infeccioso dado o período latente desse tipo de sintoma (4-5 meses) (GROVE et al., 1992; HENRIQUEZ et al., 2006) possivelmente explicando a maior densidade populacional de *Cryptosporiopsis sp.* na superfície dos frutos no ciclo 2007/08.

Tabela 15. Análise econômica do uso de tratamentos erradicantes aplicados durante o período de dormência das macieiras cv. 'Pink Lady[®]'. Vacaria-RS. 2006/07 – 2007/08.

| Tratamento (dose p.c.) | Benefício (R\$.ha ⁻¹) ^x | | Retorno (R\$ _{retorno} /R\$ _{investido}) ^y | |
|----------------------------|--|---------|---|---------|
| | 2006/07 | 2007/08 | 2006/07 | 2007/08 |
| Calda sulfocálcica (3,0%) | 2433,60 | 3926,00 | 33,34 | 53,78 |
| Oxicloreto de cobre (0,5%) | 301,60 | 4089,80 | 10,66 | 144,52 |
| Hidróxido de cobre (0,3%) | 569,40 | 3000,40 | 5,08 | 26,79 |
| Óxido cuproso (0,3%) | 1209,00 | 5891,60 | 11,57 | 56,38 |

^xValor determinado pela diferença nas perdas entre a testemunha (sem aplicação de inverno) e as perdas nos tratamentos; considerando as perdas na testemunha iguais a R\$ 4.802,00 e R\$ 11.624,40, nos ciclos 2006-2007 e 2007-2008, respectivamente. ^yValor determinado pelo quociente entre o valor investido (custo de produto+custo de aplicação) e o benefício.

As informações sobre a quantificação de inóculo de *Cryptosporiopsis sp.* nas maçãs em condições naturais de infecção estão sendo relatadas pela primeira vez, até onde se conhece. Assim como a determinação da relação entre a população epítifa em gemas e a incidência de POB, a qual poderá servir de parâmetro em estimativas do potencial de danos. Os resultados aqui apresentados mostram que não só foi possível detectar o inóculo na superfície dos frutos, mas que este incrementou linearmente ao longo do tempo. Esse fato reforça a necessidade de medidas para a redução do inóculo inicial, pela aplicação de tratamentos erradicantes no período de dormência do hospedeiro. A mais alta incidência de POB no tratamento sem fungicidas aplicados na fase de dormência reforça a importância da estratégia utilizada neste trabalho, focada para a redução de inóculo inicial como maneira de favorecer os tratamentos fungicidas realizados na fase de maior suscetibilidade dos frutos.

Em pomares com baixa concentração de inóculo primário de *Venturia inaequalis* a eficiência do controle de sarna da macieira é mais eficiente, pela redução do inóculo primário pela decomposição ou trituração das folhas caídas no chão (SUTTON et al., 2000). A alta incidência da doença no segundo ciclo avaliado, em valores acima daqueles comumente observados em outros anos, pode ser devido aos eventos de granizo, uma situação que ocorre com certa frequência no sul do Brasil e que deve ser considerado como fator de risco da doença. Considerando a fase de latência no ciclo da POB, a redução do inóculo primário bem como do número de propágulos na superfície dos frutos no momento da colheita são consideradas chave na estratégia de manejo (EDNEY, 1960).

A incapacidade de discriminação entre os tratamentos quanto à incidência de infecções latentes deve-se à alta variabilidade devida, em parte, aos baixos valores observados e ao método de detecção uma vez que, mesmo com o controle de 100% nas infecções latentes, o tratamento com calda sulfocálcica não diferiu dos demais tratamentos (EMERY et al., 2000). Estimativas mais acuradas para a detecção das infecções latentes de POB são necessárias por implicarem diretamente no monitoramento das primeiras infecções. A análise econômica demonstra as

vantagens no uso desta estratégia na redução das perdas ocasionadas por POB na macieira principalmente sob condições de maior favorabilidade à doença, facilitando o controle pré-colheita da doença com fungicidas específicos em função do risco epidemiológico (emissão de alertas).

3.5.3. Utilização de fosfito de potássio no controle da podridão olho-de-boi em maçãs Pink Lady®

No experimento com tratamentos protetores durante os 45 dias anteriores à colheita foram feitas cinco aplicações. Sintomas de fitotoxidez foram observados nas plantas a partir da quarta aplicação, na forma de estiolamento leve nos ápices dos ramos anuais. A incidência de frutos com sintomas resultantes de infecções latentes foi reduzida em 57% e 35% pelos fungicidas no período final de maturação dos frutos, incubados por 15 e 30 dias, respectivamente. No entanto, não houve vantagem pela mistura de captana e fosfitos de potássio na redução das infecções latentes quando comparados às aplicações simples (Tabela 16).

Tabela 16. Incidência de infecções latentes da podridão olho-de-boi em maçãs 'Pink Lady®' provenientes de parcelas com diferentes tratamentos fungicidas durante a fase final de maturação dos frutos. Vacaria, RS. 2007/08.

| Tratamentos | Incidência (%) ^x | |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------|
| | 15 DAI ^k | 30 DAI |
| Fosfito de potássio 40-20 | 6,67 B ^y | 40,00 B |
| Fosfito de potássio 30-20 | 10,83 B | 38,33 B |
| Fosfito de potássio 40-20 + captana | 14,17 B | 41,67 B |
| Fosfito de potássio 30-20 + captana | 11,67 B | 36,67 B |
| Captana | 11,67 B | 41,67 B |
| Testemunha | 25,83 A | 61,67 A |
| C.V.(%) | 39,46 | 11,06 |
| F | 6,04 | 14,71 |
| P>F | 0,003 | <0,0001 |

^x Incidência de infecções latentes (%) em maçãs cv. 'Pink Lady®' detectadas a partir de frutos assintomáticos e sem danos físicos aparentes. ^w Tratamento prévio à incubação dos frutos, consistindo na imersão dos mesmos em água por 6 h, sendo então armazenados a 25 °C com fotoperíodo nulo. ^v Amostras que após a colheita foram imediatamente incubadas nas mesmas condições. ^k Dias após a incubação (DAI) nas condições citadas. ^z Aplicações realizadas nos dias 26 de março; 2, 9 e 17 e 28 de abril de 2008 em pomar comercial da cv. 'Pink Lady®'. O critério de aplicação foi o acúmulo de chuva (>30 mm) entre as aplicações, sendo que quando não atingido este critério realizou-se aplicação semanal. ^y Dados médios de quatro repetições compostas por 30 frutos cada. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Waller-Duncan K ratio t ($P<0,05$).

O método de detecção de infecções latente permitiu relacionar tal dano com os danos após a fase final de frigoconservação ($R^2=0,49$ $P<0,05$). Os sintomas de POB foram predominantemente observados na fase de pós-colheita (Figura 21), sendo que na colheita a incidência de POB na testemunha foi inferior a 8%. Os tratamentos com fungicidas reduziram em 67% a incidência de POB na pós-colheita. Nas misturas de fosfito de potássio com captana houve maior controle quando comparados ao uso isolado de captana (Figura 21A). Com a proteção permanente a

partir dos 45 dias antes da colheita, a incidência da podridão nos frutos da testemunha colhidos e armazenados foi de 27%, e os melhores tratamentos fungicidas e misturas reduziram em 65% a doença (Figura 21B). A incidência da podridão em pós-colheita nas maçãs tratadas com a mistura do fosfito de potássio 30-20 com captana exerceu maior controle que a mistura do fungicida com fosfito 40-20 (Figura 21B).

A ocorrência de POB é predominante na fase de pós-colheita, sendo que, nas condições de campo essa é restrita aos frutos com ferimentos (VALDEBENITO SANHUEZA et al., 2004) fato observado neste trabalho. O uso de fosfito de potássio, em mistura ou em alternância com fungicidas de modo de ação diferente, aumenta a eficiência de controle de doenças (REUVENI; REUVENI, 1998), além de reduzir o risco de seleção de isolados resistentes e os custos de produção. Isto é, citado no manejo de oídio da mangueira (*Oidium mangiferae*) (REUVENI et al., 1998). Sendo assim, destaca-se como uma tática importante também no manejo de POB em aplicações pré-colheita.

Todos os tratamentos fungicidas reduziram o número de propágulos de *Cryptosporiopsis sp.* na superfície das maçãs, quando comparados à testemunha (Figura 22). A mistura fosfito de potássio + fungicida captana, apresentou o maior efeito erradicante sobre a população epífita do patógeno (Figura 22). Este tipo de ação dos sais de fosfito foi verificado em estudo com zoósporos viáveis de *Phytophthora cinnamomi* (WILKINSON et al., 2001) e com *Plasmopora viticola* em videira (WICKS et al., 1991). A redução do número de propágulos na superfície dos frutos está associada ao controle da podridão olho-de-boi (HENRIQUEZ, et al., 2008).

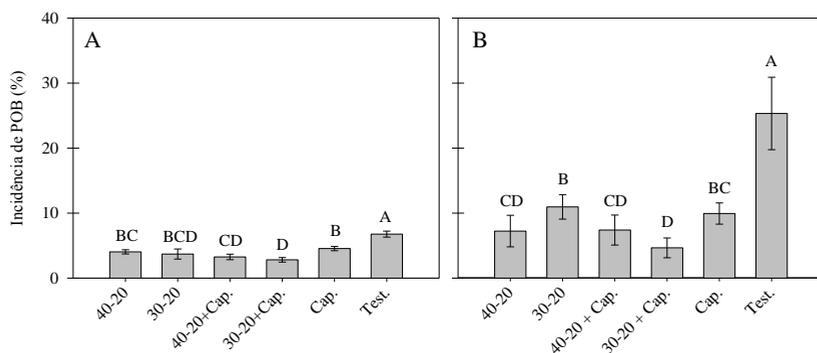


Figura 21. Incidência da podridão olho-de-boi (POB) na colheita (A) e após três meses de frigoconservação (B) em maçãs 'Pink Lady[®]', provenientes de parcelas pulverizadas com fosfito de potássio em diferentes combinações de P e K, aplicado isoladamente ou em mistura com captana, além de um tratamento testemunha sem aplicações de fungicidas no período final de maturação dos frutos (45 dias prévios à colheita). Médias representadas pelas colunas, seguidas por letras distintas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Waller-Duncan k ratio t.

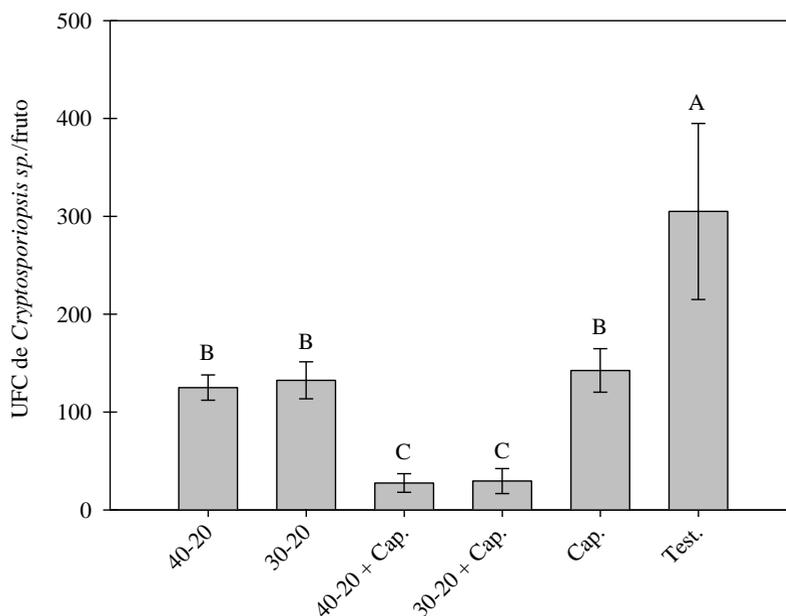


Figura 22. Número de UFC de *Cryptosporiopsis sp.* na superfície de maçãs 'Pink Lady[®]', no momento da colheita provenientes de parcelas pulverizadas com fosfito de potássio em diferentes combinações de P e K, aplicado isoladamente ou em mistura com captana, além de um tratamento testemunha sem aplicações de fungicidas no período final de maturação dos frutos (45 dias prévios à colheita). Médias representadas pelas colunas, seguidas por letras distintas, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Waller-Duncan k ratio t.

A utilização de fosfito de potássio 40-20 em mistura com captana, com aplicação imediatamente prévia à colheita (24 h) não afetou a incidência de POB no momento à colheita, como era de se esperar (Figura 23A), entretanto reduziu os danos ocasionados pela doença, pela redução das infecções latentes estabelecidas e dos danos em pós-colheita (Figura 23B e Figura 23C), baixando a incidência de POB em 30% e 7,5%, respectivamente. A mistura também diminuiu em 66% do número de UFC do patógeno sobre os frutos (Figura 23D). Os dados mostraram a ação erradicante dos fosfitos, sendo esta uma tática importante, para a redução de danos em cultivos comerciais.

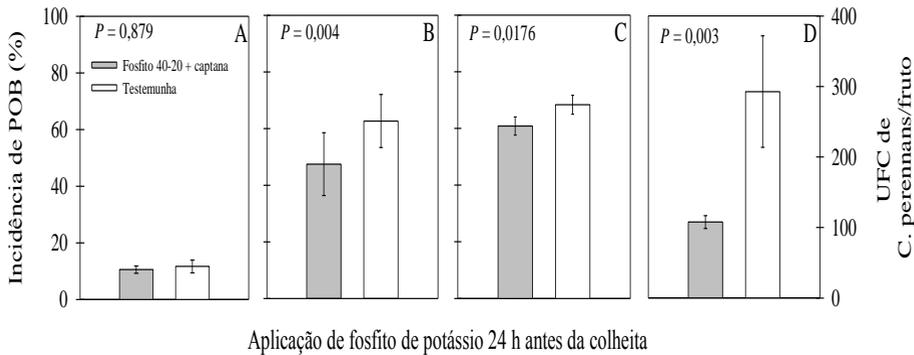


Figura 23. Incidência da podridão olho-de-boi (%) em frutos nas plantas (A), infecções latentes (B), após três meses de frigoconservação (C) e população epífita de *Cryptosporiopsis sp.* nas maçãs (D) nas parcelas com aplicações 24 h antes da colheita. Médias discriminadas pelo teste-t ($P < 0,05$).

O retardo da colheita causou maior dano pela POB (Figura 24A) com maior efeito na incidência de infecções latentes e das podridões em pós-colheita (Figura 24B e Figura 24C; $P < 0,0001$), com aumento de 70% de danos na fase de armazenagem. Conforme Prusky et al. (1991) a concentração de compostos antifúngicos relacionados à supressão das infecções latentes de *C. gloeosporioides* em abacate apresentam dinâmica temporal, com decréscimo ao longo da maturação dos frutos, onde, a partir de concentrações subfungitóxicas há a expressão dos sintomas. Tal processo pode ser responsável pelo aumento na incidência de POB com o retardo da colheita, assim como o estabelecimento das infecções pelos ciclos secundários do patógeno causados pelas lesões causadas pela infecção de danos pelo granizo e/ou insetos. A densidade populacional epífita de *Cryptosporiopsis sp.* sobre os frutos assintomáticos não diferiu entre os dois momentos de colheita (Figura 24D).

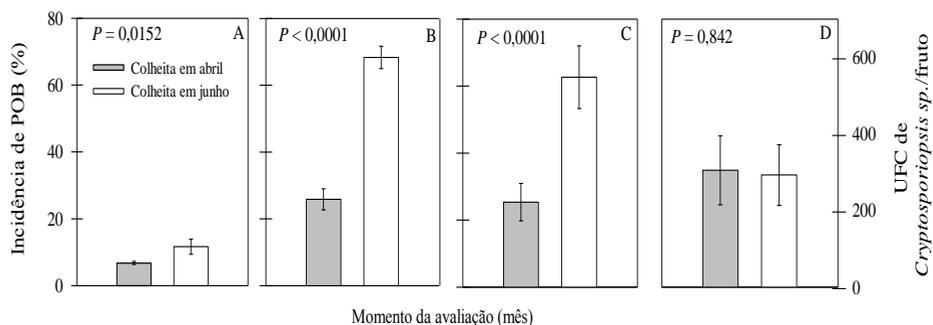


Figura 24. Incidência da podridão olho-de-boi (%) em frutos nas plantas (A), em frutos com infecções latentes (B), em frutos após três meses de frigoconservação (C) e população epífita de *Cryptosporiopsis sp.* nas maçãs (D). Dados correspondentes às parcelas da testemunha sendo as médias discriminadas pelo teste-t.

Em inoculações artificiais realizadas em pós-colheita, todos os fungicidas reduziram o estabelecimento das infecções de *Cryptosporiopsis sp.* em maçãs 'Pink Lady[®]', representado pela menor AACPD para o progresso da necrose lenticelar (Figura 25A). A utilização, em mistura ou não, dos fosfitos, indiferente à composição, apresentaram os melhores resultados, com redução média de 60% do número de lenticelas necrosadas quando comparados a frutos inoculados provenientes da testemunha. O desenvolvimento da podridão não foi afetado pelo tratamento fungicida, indicando ação de contato e não de profundidade dos fungicidas avaliados assim como influencia do método de inoculação (Figura 25B).

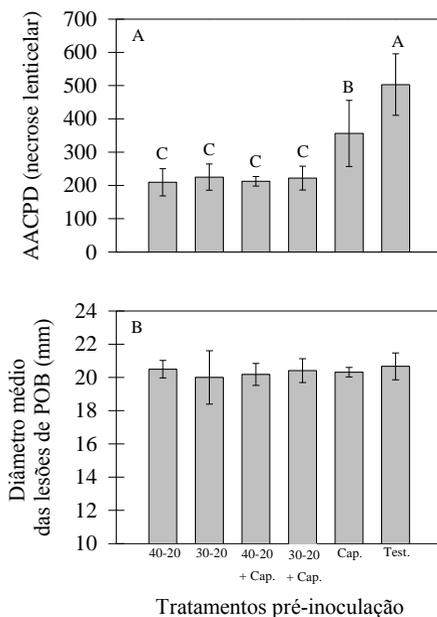


Figura 25. Área abaixo da curva de progresso de necrose lenticelar (AACPD) (A) e diâmetro de lesões de podridão olho-de-boi em maçãs inoculadas por imersão em suspensão de conídios (1×10^8 conídios/mL) (B). Frutos provenientes das parcelas correspondentes aos tratamentos com fungicidas durante o período final de maturação dos frutos. Colunas representando as médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Waller-Duncan k ratio t.

O desenvolvimento das colônias, obtido pelo índice de crescimento micelial (IVCM) e pelo diâmetro final das colônias (mm) apresentaram relação de ordem quadrática inversa à concentração de fosfito de potássio no meio de cultura ($R^2 > 0,90^*$) indiferente ao pH de correção (Figura 26A e Figura 26B). O número de UFC nas placas também foi influenciado pela suplementação de fosfito de potássio ao meio de cultura, com ajuste a um modelo quadrático à concentração de fosfito no meio de cultura, apresentando o máximo e o mínimo de colônias por placa, respectivamente, para a concentração de $0,250 \mu\text{L/L}$ com pH 2 e pH 7 (Figura 26C).

A ação *in vitro* de sais de fosfitos sobre a fisiologia dos patógenos, assim como observado no presente estudo, é um indicativo da ação fungicida direta de tais compostos (ARAÚJO et al., 2008; FENN; COFFEY, 1884). Ao contrário do estudo com *C. gloeosporioides* (ARAÚJO et al., 2008) não houve efeito da correção do pH sobre o desenvolvimento de *Cryptosporiopsis sp.*

O uso de fungicidas afetou aspectos físico-químicos dos frutos, como o pH e a acidez titulável do suco. A aplicação de fosfito de potássio 40-20, em mistura ou não com captana, bem como o uso isolado do fungicida protetor, reduziram o pH do suco das maçãs quando comparado ao obtido das maçãs provenientes da testemunha. Quanto à acidez titulável, a mistura de fosfito de potássio 40-20 e captana e aplicação exclusiva desse aumentou em 17% o teor de ácido málico no suco dos frutos, quando comparados à testemunha (Tabela 17). Os valores de teor de açúcar ($14,75 \pm 0,59$ °Brix), teor de amido ($2,06 \pm 0,15$) e pressão de polpa ($18,70 \pm 0,64$ lb) não diferiram entre os tratamentos.

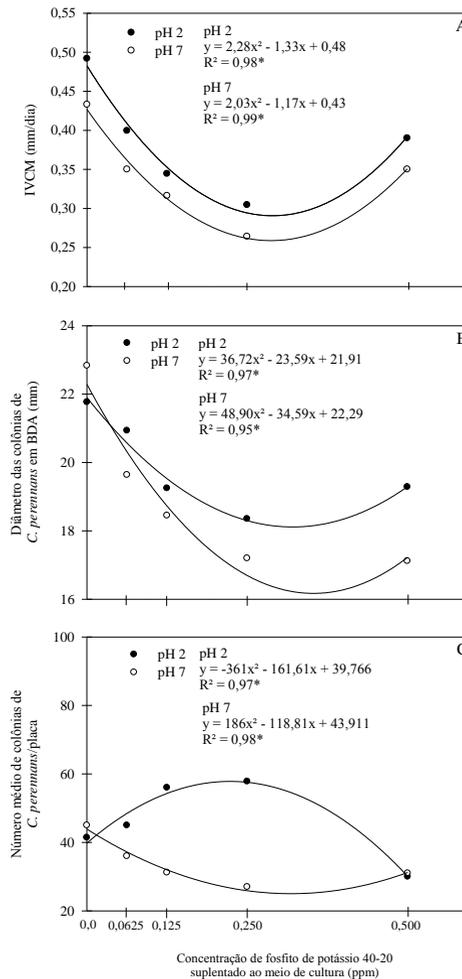


Figura 26. Crescimento *in vitro* de *Cryptosporiopsis* sp. pela suplementação de BDA com diferentes concentrações de fosfito de potássio 40-20 e dois ajustes de pH. Pontos correspondentes à média de sete repetições compostas por três placas de Petri cada. Placas incubadas a 20 °C por 14 dias.

Tabela 17. Análise físico-química de maçãs cv. 'Pink Lady®' submetidas aos tratamentos fungicidas listados durante o período final de maturação dos frutos (45 dias antecedentes à colheita). Análises realizadas após 20 dias de armazenamento dos frutos em câmara frigorífica (3 °C / UR 90%). Vacaria, RS. 2008.

| Tratamento | pH ^y | Acidez titulável ^x (% ác. málico) |
|-------------------------------------|----------------------|---|
| Fosfito de potássio 40-20 | 3,38 BC ^y | 6,98 AB |
| Fosfito de potássio 30-20 | 3,45 A | 6,20 B |
| Fosfito de potássio 40-20 + captana | 3,34 CD | 7,18 A |
| Fosfito de potássio 30-20 + captana | 3,44 AB | 6,60 AB |
| Captana | 3,30 D | 7,43 A |
| Testemunha | 3,46 A | 6,13 B |
| C.V.(%) | 1,28 | 7,84 |
| F | 9,60 | 4,01 |
| P>F | 0,0003 | 0,0165 |

^yLeitura realizada com solução de 10 mL do suco de cinco maçãs adicionado à 90 mL de água destilada para cada repetição. Leitura em peagâmetro (Digimed DMPH 2). ^xValor determinado por titulometria com NaOH a 0,1 N até pH 8,1 a partir de uma solução de 10 mL do suco de cinco maçãs adicionado à 90 mL de água destilada para cada repetição. ^yDados médios de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Waller-Duncan K ratio t ($P < 0,05$).

Outros estudos com fosfito de potássio em maçãs em aplicações em pós-colheita não consideraram a ação de tais sais nos atributos físico-químicos dos frutos (BLUM et al., 2007; BRACKMANN et al., 2004; BRACKMANN et al., 2007; CAMPOS et al., 2003a). As alterações nas características químicas dos frutos, no presente estudo, não apresentaram correlação com a incidência da podridão ($r=0,03$ $P=0.567$).

Os tratamentos fungicidas realizados em pré-colheita não influenciaram a atividade enzimática de PO e FAL nos frutos (Tabela 18). Para PO houve interação tripla entre os tratamentos, data de amostragem e inoculação dos frutos com *Cryptosporiopsis sp.*, como função do efeito da data de amostragem sobre os valores da atividade de PO, visto a não significância estatística individual do tratamento (T) e inoculação (I) sobre a variação (Tabela 18).

Tabela 18. Atividade enzimática em maçãs 'Pink Lady[®]' pulverizadas durante o período final de maturação com fosfitos de potássio e captana (tratamentos) avaliados quanto às enzimas peroxidase (PO) e fenilalanina amônia-liase (FAL) em duas datas de amostragem (data) com o confronto (inoculação) com *Cryptosporiopsis sp.* ou não. Vacaria, RS. 2007/08.

| Fonte de variação | G.L. (P.O.) | G.L. (FAL) | Quadrado médio | |
|-------------------|-------------|------------|----------------|----------|
| | | | P.O. | FAL |
| Tratamento (T) | 5 | 6 | 2,0741 | 0,0135 |
| Data (D) | 1 | n.a. | 46,3649** | n.a. |
| Inoculação (I) | 1 | 1 | 0,0988 | 1,2788** |
| Bloco (B) | 2 | 2 | 0,2963 | 0,0239 |
| T x D | 5 | n.a. | 3,4612 | n.a. |
| T x I | 5 | 5 | 0,9152 | 0,0128 |
| D x I | 1 | n.a. | 10,5460** | n.a. |
| T x D x I | 5 | n.a. | 6,5163** | n.a. |
| Resíduo | 32 | 22 | 2,1117 | 0,0222 |
| C.V.(%) | | | 17,41 | 19,57 |

**Significância estatística com $P < 0,01$.

n.a.Causa de variação não avaliada.

Na segunda data de amostragem, 14 dias após a primeira, houve um decréscimo de 20% na atividade enzimática de PO (Figura 27A). Entre as causas de variação relacionadas no experimento na atividade enzimática de FAL, apenas a inoculação com *Cryptosporiopsis sp.* afetou os valores desta enzima (Tabela 17), onde o confronto com o patógeno determinou uma maior atividade da FAL nos frutos (Figura 27B). O acréscimo na atividade da FAL pode ser considerado como um indicador de resistência, por que esta enzima é requerida para a síntese de fenóis associados com resistência (NICCHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Mas para que esta hipótese seja correta, é importante que haja interação específica do hospedeiro e patógeno, com a produção de compostos fenólicos e a sincronização da variedade de respostas do hospedeiro no processo de infecção, o qual é relacionado com o tempo de desenvolvimento do patógeno (CAMPOS et al., 2003a).

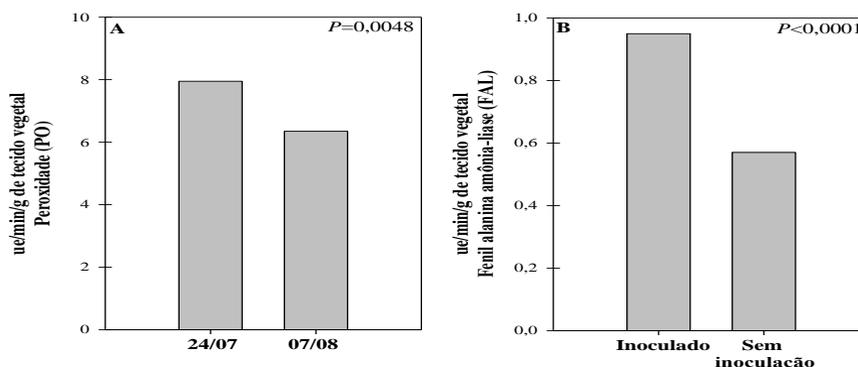


Figura 27. Atividade de enzimas peroxidase em duas datas de amostragem (A) e fenilalanina amônia-liase em maçãs 'Pink Lady[®]' sadias ou inoculadas com *Cryptosporiopsis sp.* Vacaria, RS. 2007/08.

A ausência de relação entre o uso dos fosfitos de potássio para o controle da murcha-de-verticillium (*Verticillium dahliae*) e os mecanismos de defesa é citado em mudas de cacaueteiro (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2006), no estudo os autores não encontraram indução na atividade de PO pela pulverização de fosfito de potássio na dose de 1,25 mL/, no entanto tal dose foi fungitóxica, reduzindo a viabilidade de esporos do patógeno e o progresso da doença. A relação entre PO e FAL e a suscetibilidade do hospedeiro a fitopatógenos é bem descrita e conhecida na literatura (CUI et al., 1996; KAO, 2003), sendo que tais enzimas têm a atividade determinada pela idade do tecido do hospedeiro assim como pela ação de indutores bióticos e abióticos (CAMPOS et al., 2003b, GUERRA, 2007; REUVENI et al., 1998; WALTERS et al., 2005), mas no presente estudo, tal comportamento não foi influenciado pelo uso dos fosfitos de potássio.

3.6. Experimento 6: Análise por microscopia de varredura do processo de infecção das maçãs por *Cryptosporiopsis perennans*

3.6.1. Avaliar lesões de *C. perennans* em frutos inoculados utilizando microscopia eletrônica de varredura

As análises por microscopia eletrônica de varredura mostraram colonização das lenticelas em maçãs 'Maxi Gala' inoculadas com *C. perennans*, com crescimento profuso de micélio (Figuras 28A e 28C) e esporulação do patógeno (Figuras 28B e 28C). Em maçãs 'Fuji Kiku', além da colonização das lenticelas, observou-se formação de micélio na epiderme (Figura 28D). Em maçãs 'Cox's Orange Pippin' foi observado que a penetração deste patógeno pode ocorrer pelas aberturas naturais, como a calicinal e a peduncular, e também através das lenticelas, visto que nesses pontos ele desenvolve a podridão quando inoculado (EDNEY, 1956). Todavia, nenhum estudo mostrou a colonização da epiderme sem ferimento, como observado em maçãs 'Fuji Kiku' neste estudo. Esta informação é importante, pois a epiderme, que corresponde à camada mais externa de células no fruto e seria a principal barreira contra patógenos, pode representar importante via de infecção de *C. perennans*, mesmo quando não há ferimentos. O estágio de maturação avançado dos frutos 'Maxi Gala' e 'Fuji Kiku' (4 e 7 meses em AC, respectivamente) e a temperatura de incubação (22°C) provavelmente facilitaram a infecção e colonização de *C. perennans*, que são favorecidos com o aumento no tempo de armazenamento dos frutos e em temperaturas próximas de 20°C (EDNEY, 1956).

Os conídios de *C. perennans* podem estar presentes nas lenticelas após a colheita, mesmo em frutos provenientes de pomares protegidos quimicamente durante o ciclo vegetativo, já que essas estruturas restringem o acesso de fungicidas (EDNEY, 1970). Os conídios deste patógeno tendem a aderir nas lenticelas e nas rachaduras da cutícula (DUGAN et al., 1993), mas os autores não relatam a possibilidade dos conídios serem gerados nas lenticelas como mostram os resultados deste trabalho. Essa constatação justifica o uso de controle cultural e químico no campo, preferencialmente em associação com métodos de controle pós-colheita (físicos, químicos e biológicos), visando diminuir a população de *C.*

perennans presente na superfície dos frutos. Não foram observadas diferenças na colonização da epiderme de maçãs 'Maxi Gala' entre os métodos de inoculação, e nem entre cultivares, o que concorda com os resultados de pesquisas anteriores, que demonstraram não haver diferenças de suscetibilidade entre cultivares de maçãs à infecção de *C. perennans* (EDNEY, 1956).

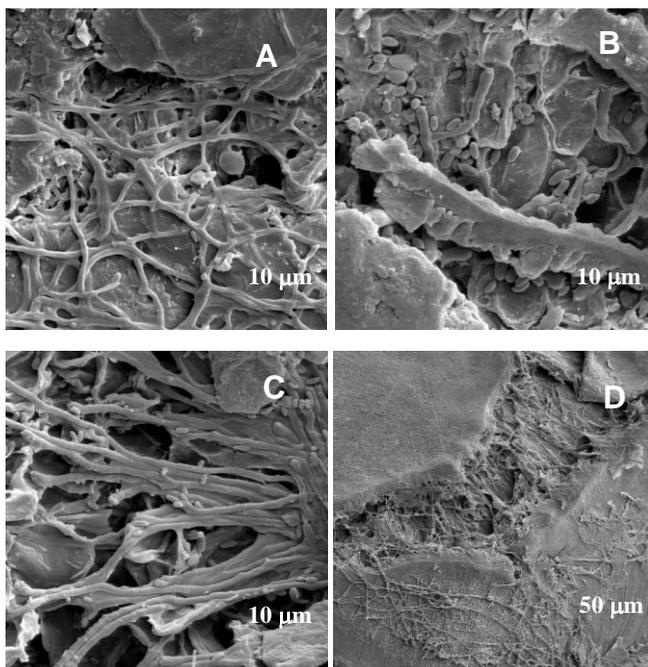


Figura 28. Colonização da superfície de maçãs 'Maxi Gala' (A, B e C) e 'Fuji Kiku' (D) após inoculação com *C. perennans*. Em maçãs 'Maxi Gala' observa-se a presença de micélio (A) e micélio + conídios (B e C) nas lenticelas, enquanto que em maçãs 'Fuji Kiku' observa-se a formação de micélio nas lenticelas e tecido adjacente (D).

3.6.2. Avaliar lesões de *C. perennans* em frutos inoculados utilizando microscopia eletrônica de transmissão

A Técnica não se mostrou eficiente para constatar a interrelação do patógeno com o hospedeiro por isto foi decidido documentar a infecção com microscopia eletrônica de varredura.

3.7. Experimento 7: Avaliação do efeito de protetores solares

No mês de janeiro, após a data de ensacamento dos frutos não ocorreram dias com temperaturas críticas para queima de sol em maçãs (dados não mostrados). Na Tabela 19 observa-se que no mês de fevereiro ocorreram quatro dias com temperaturas críticas para dano de sol em maçãs, enquanto que no mês de março, até a data da colheita, um dia apresentou condição para dano de sol.

Tabela 19. Número de horas com temperatura críticas e próximo de crítica.

| Data | DADOS DE TEMPERATURA - POMAR 'FUJI' | |
|--------|-------------------------------------|---------------|
| | acima de 27°C | acima de 30°C |
| 6/fev | 6h | 3h30min |
| 7/fev | 4h45min | 0 |
| 8/fev | 4h15min | 1h15min |
| 15/fev | 7h45min | 3h15min |
| 18/fev | 4h45min | 1h45min |
| 19/fev | 5h45min | 1h30min |
| 22/fev | 5h15min | 15min |
| 8/mar | 6h15min | 3h00min |

Na data do primeiro desensacamento (07/02) percebe-se que ocorreram 4h45min com temperatura acima de 27°C, sendo que o mínimo para causar dano de sol em frutos são 5h com esta temperatura. Enquanto isso na segunda data de desensacamento (15/02) observa-se que as temperaturas tiveram potencial para ocasionar dano de sol em frutos (7h45min acima de 27°C e 3h15min acima de 30°C).

Os danos ocorreram tanto nos frutos ensacados como em não ensacados (Tabela 20), sugerindo que a escaldadura por sol é causada pela temperatura e não pela exposição ao sol (Radiação).

Tabela 20. Nível de dano e tratamentos em frutos 'Fuji' expostos ou não ao sol em períodos diferentes.

| NÍVEL | TRATAMENTO | | | |
|------------------|------------|----|----|----|
| | T1 | T2 | T3 | T4 |
| SEM DANO (0) | 29 | 10 | 8 | 8 |
| DANO 1 | 9 | 8 | 11 | 11 |
| DANO 2 | 4 | 6 | 10 | 5 |
| DANO 3 | 3 | 4 | 8 | 8 |
| DANO 4 | 1 | 2 | 0 | 8 |
| DANO 5 (NECROSE) | 0 | 1 | 0 | 8 |
| TOTAL | 46 | 31 | 37 | 48 |

Inoculação de *Botryosphaeria dothidea* e *Cryptosporiopsis perennans* em maçãs 'Fuji' e 'Pink Lady' que receberam tratamento com protetor solar e não. Na colheita, a área exposta ao sol foi marcada com uma canetinha preta e a área não exposta com outra cor fácil de identificar. A inoculação foi nos dois lados do fruto (lado exposto e não). Os frutos não ficaram expostos a temperaturas elevadas após a colheita. Cada parcela foi composta de 3 frutos/planta, totalizando 48 frutos para cada tratamento (pois em cada tratamento estão sendo utilizadas 16 plantas – 4 parcelas de 4 plantas), sendo que foram 4 tratamentos e portanto 12 frutos/planta (total 192 frutos), cujos tratamentos e inoculações são apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21. Tratamentos e as inoculações utilizadas.

| Tratamento | Inoculação | nº de frutos | incubação | Avaliação |
|-------------------------|-----------------------------------|--------------|-----------|----------------------------------|
| Raynox 5% | <i>Cryptosporiopsis perennans</i> | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Raynox 5% | <i>Botryosphaeria dothidea</i> | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Raynox 5% | BDA | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Raynox 5% | papel | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Raynox 2.5% | <i>Cryptosporiopsis perennans</i> | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Raynox 2.5% | <i>Botryosphaeria dothidea</i> | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Raynox 2.5% | BDA | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Raynox 2.5% | papel | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Testemunha - sem tratar | <i>Cryptosporiopsis perennans</i> | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Testemunha - sem tratar | <i>Botryosphaeria dothidea</i> | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Testemunha - sem tratar | BDA | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |
| Testemunha - sem tratar | papel | 48 | 13 dias | 14, 21 e 28 dias após inoculação |

Foi observado aumento das podridões nas áreas internas dos frutos o que sugere a ocorrência de acúmulo de substâncias de defesas na parte expostas ao sol. Os dados de temperaturas foram coletados no SISALERT (Simulação de Sistema de Alerta), os quais são coletados em estações meteorológicas distribuídas nos pomares da região (Tabela 22).

Tabela 22. Dias com temperaturas acima de 27°C por mais de 5 h ou acima de 30°C por mais de 3 h nos dois pomares experimentais.

| Mês | DIAS DE TEMPERATURAS CRÍTICAS | |
|--------------|-------------------------------|------------------|
| | FUJI RASIP | PINK LADY® SCHIO |
| dez/07 | 9 | 9 |
| jan/08 | 6 | 5 |
| fev/08 | 8 | 4 |
| mar/08 | 3 | 3 |
| Total | 26 | 21 |

O mês de dezembro foi o que mais acumulou dias com potencial para causar dano de sol em maçãs, ou seja, mais dias com temperaturas acima de 27°C por mais de 5 horas ou acima de 30°C por mais de 3 horas.

3.8. Experimento 8: Avaliação do efeito da temperatura e período de molhamento foliar na severidade da MFG

Efeito de temperatura e molhamento foliar na severidade da Mancha Foliar da Gala

A 12°C, nenhum sintoma ocorreu nas plantas submetidas a 48 h de PMF (Figura 29 A). A ausência de sintomas com 48 de PMF a 12°C também é relatada no patossistema *C. lindemuthianum*: feijoeiro (TU, 1992). As lesões, na forma de pontuações minúsculas, só foram observadas nas plantas submetidas a 72 h de molhamento foliar (PMF), maior período testado, resultado que ratifica os anteriores (KATSURAYAMA; BONETI, 1999; HAMADA, 2005). Por outro lado, a severidade da MG nesta temperatura pode aumentar com o aumento do PMF de 72 h para 96 h ou mais (HAMADA, 2005). Entretanto, PMF de 72 h contínuas a 12°C é um evento raro, mesmo nas regiões pomícolas mais altas, além de que, nesta temperatura, *C. gloeosporioides* relacionado com esta doença necessitar de 7 ou mais dias para produzir os conídios *in vitro* e mais 3 dias para a produção de apressórios melanizados (KATSURAYAMA et al., 1999).

A 14°C, nível significativo de doença (>1%) só foi observado com 48 h de PMF (Figura 29B). Para os PMF de 20 a 24 h o índice de severidade da MFG (IS) variou entre 0,05% e 0,15%. E nas plantas submetidas a 48 h e 72 h de PMF os IS foram de 0,5% e 3,5%, respectivamente. Índices maiores podem ser obtidos submetendo-se as plantas aos PMF mais longos que os testados, 96 h, por exemplo. Porém, este aumento deve-se muito mais à expansão da lesão devido ao estresse causado pela permanência das plantas por longo tempo em ambiente escuro e úmido do que ao aumento no número de lesões (dados não apresentados).

A 16°C, nenhuma lesão foi observada com 12 h de PMF (Figura 29C). Algumas lesões, observadas a partir de 16 h de PMF, aumentaram linearmente até o maior PMF testado, de 72 h. Com base nos estudos de campo, a temperatura em torno de 16°C é considerada limiar para o aparecimento da doença nos pomares

(KATSURAYAMA; BONETI, 2003). Com 48 h de PMF o IS foi em torno de 10%. Do mesmo modo que relatado por Crusius (2000), a 18°C a infecção ocorreu a partir de 16 h de PMF (Figura 29D). Entretanto, IS>1% só foi observado nas plantas submetidas a 24 h ou mais de PMF e IS de 10% só foi atingido com PMF > 42 h.

O sintoma a 20°C foi observado com 10 h de PMF, porém só foi significativa (IS>1%) com 12 h ou mais de PMF (Figura 29E). Requerimento de 10 h ou mais de PMF para infecção está mais de acordo com os dados de outras doenças como a antracnose das leguminosas (LENNÉ, 1992) e do tomateiro (DILLARD, 1992) que o de 6 h relatado por Crusius et al. (2002) para a MFG. Esta diferença pode estar relacionada à metodologia do ensaio. No nosso ensaio, logo que completado o PMF estabelecido, as plantas foram levadas para o fitotron a 50% de UR onde foram mantidas durante 30 min para acelerar o secamento das folhas e, então, transferidas para a sala de crescimento regulada na mesma temperatura do ensaio. A adoção desse passo foi devido à constatação de que as plantas, após retiradas da câmara úmida, continuarem molhadas por longo período, principalmente à noite ou quando a umidade relativa do ar é alta, interferindo nos resultados dos ensaios.

A 22°C, a infecção ocorreu também a partir de 10 h de PMF, porém IS de 10% só foi observado nas plantas submetidas a 30 h de PMF (Figura 1F). A 24°C, a infecção (IS = 0,08%) foi observada em plantas submetidas a 8 h de PMF, e quando submetidas a 18 h de PMF o IS passou de 10% (Figura 29G). Finalmente, a 26°C, maior temperatura testada, a curva de severidade praticamente não diferiu da observada a 24°C. IS de 10% foi observado em plantas submetidas a 24 h de PMF. A análise de regressão linear simples da severidade, para as temperaturas e períodos de molhamento foliar testados é apresentada na Figura 29H. Maior coeficiente angular foi observado a 22°C, o que significa que a doença (proporção da área foliar lesionada) respondeu mais ao aumento do PMF (Tabela 23). Não se visualizou diferença significativa entre os coeficientes b (angular) das temperaturas de 14°, 16° e 18°C. O mesmo ocorreu entre 24° e 26°C.

Tabela 23. Coeficiente angular (b) e severidade da Mancha Foliar da Gala estimada para o período de molhamento foliar (PMF) de 72 horas.

| Temperatura (°C) | Coeficiente angular (b) | Constante (a) | R ² | Severidade ^{1/} da MG (PMF = 72 h) |
|------------------|-------------------------|---------------|----------------|---|
| 12 | 0,0752 | -0,1803 | 0,7157 | 1,7 |
| 14 | 0,5068 | -1,87 | 0,8362 | 11,3 |
| 16 | 0,5054 | -3,1521 | 0,7885 | 19,4 |
| 18 | 0,4923 | -3,6337 | 0,8956 | 26,1 |
| 20 | 0,5534 | -2,5049 | 0,6301 | 31,5 |
| 22 | 1,0448 | -5,6509 | 0,9152 | 35,4 |
| 24 | 0,7863 | +4,2617 | 0,7674 | 37,9 |
| 26 | 0,8078 | -1,4213 | 0,7281 | 38,9 |

^{1/}Estimada com a equação $Y = -91,496942 + (7,850882 \cdot T) + (0,242834 \cdot \text{PMF}) + (-0,177027 \cdot T \cdot T) + (0,021337 \cdot T \cdot \text{PMF}) + (-0,002206 \cdot \text{PMF} \cdot \text{PMF})$.

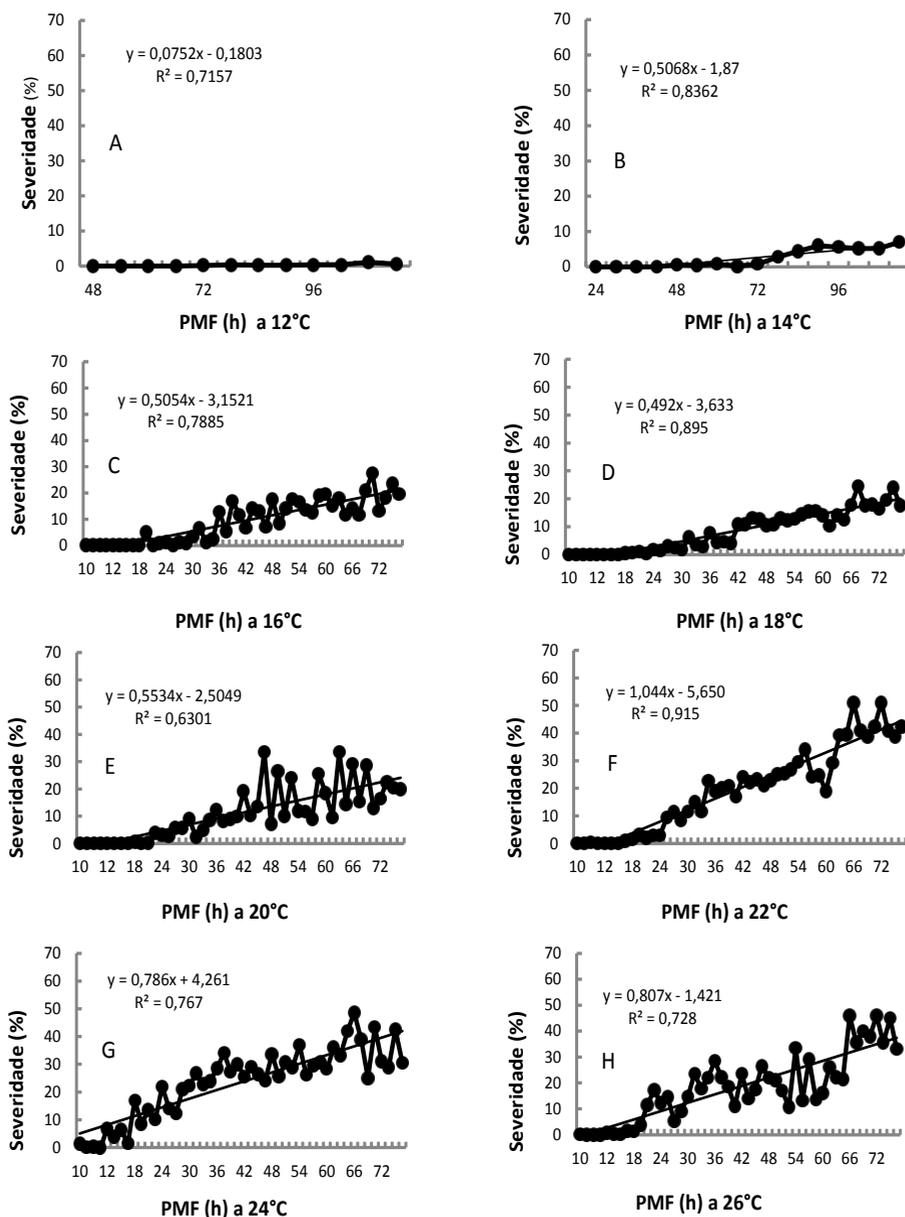


Figura 23. Efeito da temperatura (°C) e período de molhamento foliar (h) na severidade (%) da Mancha Foliar da Gala em condições controladas. Ciclos 2007/08 e 2008/09.

Um modelo (indutivo) de previsão para Mancha Foliar da Gala

Com os dados de severidade estimada para cada interação entre temperatura e PMF obteve-se a seguinte equação: $Y = -91,496942 + (7,850882 * T) + (0,242834 * PMF) + (-0,177027 * T * T) + (0,021337 * T * PMF) + (-0,002206 * PMF * PMF)$, representada na Figura 30.

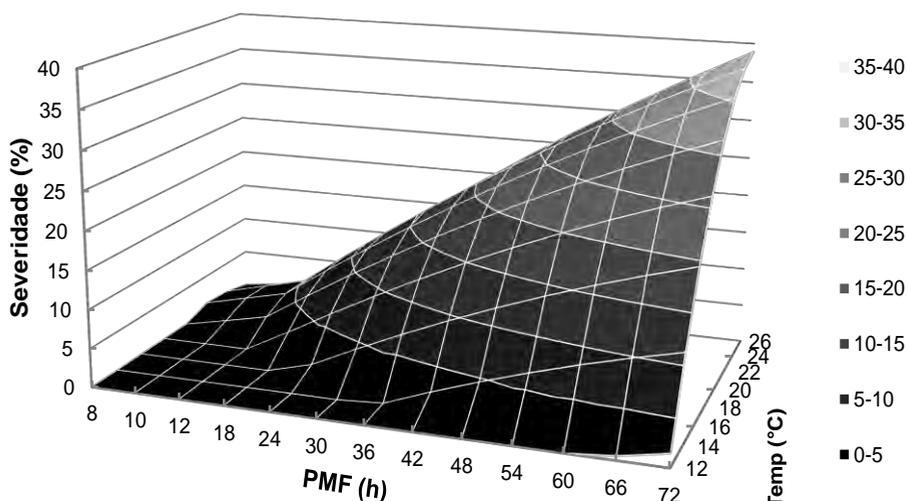


Figura 30. Efeito da temperatura e período de molhamento foliar na severidade da Mancha Foliar da Gala. São Joaquim, SC. 2009.

Os dados meteorológicos de Frei Rogério, SC, coletados a cada 30 min, foram processados com equação acima e comparados com o modelo empírico atualmente em uso. Ambos modelos, empírico e indutivo, indicaram o primeiro período crítico da doença em meados de outubro/08. Entretanto o novo modelo acusou com um dia de antecedência, tempo significativo para os sistemas de previsão. Além disso, em outubro, o modelo empírico acusou dois períodos favoráveis e o indutivo, três, sendo dois deles coincidentes.

Nenhum período crítico foi acusado em novembro/08 por ambos modelos comparados, porém, em dezembro/08, o modelo indutivo acusou três períodos distintos e o empírico apenas um e, em janeiro/09, quatro contra um, com tendência do novo modelo detectar mais períodos críticos, principalmente em temperaturas mais elevadas.

4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES FINAIS

- ✓ Os resultados obtidos recomendam monitorar a presença do patógeno (*Colletotrichum gloeosporioides*) em áreas conhecidas como focos iniciais da doença dos pomares utilizando coletores de água de chuva para detectar a presença de *C. gloeosporioides*.
- ✓ O modelo EECd e o de Fitzell poderão ser utilizados como método de alerta para o momento da pulverização uma vez que o controle conferido a planta não difere do método padrão com aplicações semanais. Estes métodos também proporcionam redução do número de pulverizações.
- ✓ A pulverização aos seis DAI com ulvana reduz significativamente a severidade da MFG, em folhas superiores de macieira que são as mais suscetíveis a doença. A germinação de conídios não é afetada pela ulvana. Plântulas suscetíveis tratadas com ulvana tiveram maior atividade da POX às 72 HAI, em relação às testemunhas. A atividade de GLU não foi alterada pela pulverização de ulvana.
- ✓ Plântulas com resistência inata não afetaram a germinação de conídios. Plântulas com resistência inata apresentaram maior atividade de POX às 24 e 72 HAI, comparado às testemunha. Plântulas resistentes não alteraram a atividade da GLU.
- ✓ O fosfito de potássio não induz resistência e possui ação curativa aplicado até 48 horas após a infecção contra *C. gloeosporioides* em macieira.
- ✓ Existe uma grande variabilidade morfo-fisiológica entre os isolados e entre os grupos de *Cryptosporiopsis* sp estudados;
- ✓ Os grupos (Grupo I e Grupo II), caracterizados geneticamente pela análise da região ITS-rDNA, apresentaram diferenças morfo-fisiológicas significativas e a variável que mais influenciou na diferenciação dos grupos foi o efeito da temperatura de 5°C sobre o crescimento micelial e esporulação;
- ✓ Os isolados Cp8 e Cp5, considerados padrões do grupo I e II, respectivamente, são diferentes entre si e diferentes dos outros isolados, sendo que através da análise genética, houve indicações de serem espécies diferentes.
- ✓ Toda esta variabilidade genética e morfo-fisiológica sugere que o manejo fitossanitário para o controle da podridão-olho-boi deve ser indicado de acordo com a espécie e seus variantes que ocorrem na região para evitar que as técnicas de controle utilizadas sejam eficientes.
- ✓ Tratamento de inverno em pomares de macieiras com os fungicidas calda sulfocálcica e oxiclureto de cobre durante o período de dormência das plantas deve ser considerado uma estratégia de manejo da podridão olho-de-boi por promover a redução do inóculo de *Cryptosporiopsis* sp. em

cancros de ramos, o que, associado com aplicações de fungicidas nos dois meses anteriores à colheita, promovem controle eficiente e econômico da podridão olho de boi.

- ✓ Os fosfitos de potássio tem ação fungitóxica direta sobre *Cryptosporiopsis* sp., sendo o seu uso recomendado em programas de manejo integrado da podridão olho-de-boi, principalmente pela capacidade de reduzir a população epífita na superfície das maçãs. A fenilalanina amônia-liase não aumentou nos frutos tratados com fosfitos.
- ✓ Em maçãs inoculadas com *C. perennans*, observa-se colonização e esporulação principalmente nas lenticelas, bem como colonização entre as lenticelas.
- ✓ O modelo gerado neste estudo é capaz de acusar maior número de períodos críticos da Mancha Foliar da Gala. Além disso, antecipa em algumas horas a determinação deste período em relação ao modelo empírico, atualmente em uso. O novo modelo processa os dados meteorológicos com simplicidade, resultando em menor erro na interpretação do risco. Associado ao modelo em uso é possível prever com maior confiabilidade os períodos críticos da doença.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a valiosa contribuição para as atividades de pesquisa da pesquisadora Patricia Ritschel e da analista Renata Gava, da Embrapa Uva e Vinho, e da Estagiária da Proterra Fernanda Varela Nascimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J.; BORSATO, L. C.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da Gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 148-152, 2008.

BANZATO, D. A.; KRONKA, S. N. Experimentação Agrícola, 4 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237p.

BECKER, W. F. Validação de um sistema de previsão da mancha-foliar-da-gala em macieira, cv. Royal Gala. In: ENCONTRO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 10., 2007, Fraiburgo. **Anais...** Fraiburgo: Epagri, 2007. v. 1, p. 267-274.

BECKER, W. F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Sistema de previsão da mancha-foliar-da-gala em macieira, cultivar Gala. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 17, p. 64-67, 2004.

BECKER, W. F.; MONDARDO, M. Validação de sistemas de previsão da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 64, 2004. Resumo apresentado no XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2004, Gramado.

BECKER, W. F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. da S. Sistema de previsão da mancha-foliar-da-gala em macieira, cultivar GALA. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 17, p. 64-67, 2004.

- BERTON, O.; MELZER, R. **Sistema de alerta para o controle da sarna da macieira**. Florianópolis: Empasc, 1989. 75 p.
- BLEICHER, J. Doenças da macieira e outras pomáceas. In: KIMATI, H.; et al. Manual de Fitopatologia. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 2v. 663p.
- BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C. V. T.; DEZANET, A.; LIMA, E. B.; NETO, P. H.; ÁVILA, R. D.; SIEGA, V. Fosfitos de potássio aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, p. 265-268, 2007.
- BOCCHESI, C. A. C.; MARTINELLI, J. A.; MATSUMURA, A. T. S.; FEDERIZZI, L. C.; PRESTES, A. M. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 11-16, 2003.
- BOLAY, A. Observation en Hollande de la forme parfaite du champignon *Gloeosporium perennans* Zeller & Childs. **T. Pl.ziekten**, v. 62, p. 322-324, 1956.
- BONETI, J. I. da S.; KATSURAYAMA, Y. Viabilidade do uso de fosfitos no controle da sarna-da-macieira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 18, p. 51-54, 2005.
- BONETI, J. I. da S.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças da macieira. In: A CULTURA da macieira. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p.527-555.
- BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; OZAWA, T. Levantamento das espécies de *Colletotrichum* associadas com a mancha foliar de Glomerella em macieira, cv. Gala, no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 268, 1999. Resumo 143.
- BONZATTO, P. A.; KRONZA, S. N. Experimentação Agrícola. 3º ed. Jaboticabal : Funep. 2006.
- BRACKMANN, A.; GIEHL, R. F. H.; SESTARI, I.; STEFFENS, C. A. Fosfitos de potássio para o controle de podridões pós-colheita em maçãs 'Fuji' durante a fase de armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1039-1042, 2004.
- BRACKMANN, A.; GIEHL, R. F. H.; SESTARI, I.; STEFFENS, C. A.; FAULIN, G. DI C.; PINTO, J. A. V. Controle de podridão pós-colheita de *Penicillium* spp., em maçã 'Fuji' com fosfitos e fungicidas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, p. 251-254, 2005.
- BRACKMANN, A.; GIEHL, R. F. H.; SESTARI, I.; STEFFENS, A.; EISERMANN, A. C. Microaspersão de fosfitos durante a frigoconservação de maçãs cv. 'Fuji' visando o controle de podridões pós-colheita. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 6, p. 7-10, 2007.
- BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Nova Iorque, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRISSET, M. N.; CESBRON, S.; THOMSON, S. V.; PAULIN, J. P. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 529-536, 2000.
- BYRK, H. Effectiveness of trifloxistrobin in the control of bull's eye rot (*Pezizula* spp.) of apple. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Skierniewice, v. 9, p. 77-83, 2001.
- CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2003a. 3 p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 87).
- CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; SILVA, J. B.; OSÓRIO, V. A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 15, p. 129-134, 2003b.
- CASTRO, L. A. S. **Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 37 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 93).

- COHEN, M. D.; COFFEY, M. D. Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 311-338, 1986.
- CONWAY, W. S.; SAMS, C. E.; WATADA, A. E. Relationship between total and cell wall bound calcium in apples following postharvest pressure infiltration of calcium chloride. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 398, p. 31-39, 1995.
- CORKE, A. T. K. Screening trials of materials for suppressing spore production by *Gloeosporium perennans* on apples trees. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 60, p. 241-249, 1967.
- CRUSIUS, L. U. **Epidemiologia da mancha foliar da macieira**. 2000. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- CRUSIUS, L. U.; FORCELINI, C. A.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; FERNANDES, J. M. C. Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 65-70, 2002.
- CUI, Y.; MAGILI, J.; FREDERIKSEN, R.; MAGILI, R. Chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA levels following exposure of sorghum seedlings to three fungal pathogens. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 187-199, 1996.
- DEMÉTRIO, C. G. B. Modelos lineares generalizados em experimentação agrônômica. 3. ed. Piracicaba: USP/ESALQ-Depto. de Ciências Exatas, 2001. 113 p.
- DIANESE, A. C.; BLUM, L. E. B.; DUTRA, J. B.; LOPES L. F.; SENA, M. C.; FREITAS, L. F.; YAMANISHI, O. K. Redução da Podridão do Pé (*Phytophthora palmivora*) do Mamoeiro (*Carica papaya*) por Fosfitos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 166, 2007.
- DILLARD, H. R. *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. [S.l.]: CAB International, 1992. p. 225-236.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods, 2 ed. Boca Raton, EUA: Lewis Publishers. 1995. 434 p.
- DUGAN, F. M.; GROVE G. G.; ROGERS, J. D. Comparative studies of *Cryptosporiopsis curvispora* and *Cryptosporiopsis perennans*. Morphology and pathogenic behavior. **Mycologia**, Nova Iorque, v. 85, p. 551-564, 1993.
- EDNEY, K.L. Some experiments with thiabendazole and benomyl as post-harvest treatments for the control of storage rots of apples. **Plant Pathology**, London, v. 19, p. 189-193, 1970.
- EDNEY, K.L. The rotting of apples by *Gloeosporium perennans* Zeller & Childs. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 44, p. 113-128, 1956.
- EDNEY, K. L.; AUSTIN, W. G. L.; CORKE, A. T. K.; HAMER, P. S. Effect of winter spraying on rotting of stored apples by *Gloeosporium* spp. **Plant Pathology**, London, v. 73, p. 10-13, 1960.
- 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.
- FAIZE, M.; BRISSET, M. N.; PERINO, C.; VIAN, B.; BARNY, M. A.; PAULIN, J. P.; THARAUD, M. Protection of apple against fire blight induced by an *hrpL* mutant of *Erwinia amylovora*. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 50, p. 667-674, 2006.
- FEITOSA, M. I.; FEICHTENBERGER, E.; KUDAMATSU, M.; ROSSETTI, V.; LEITE, L. R. Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L. no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 44, p. 33-54, 1977.
- FENN, M. E.; COFFEY, M. D. Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetyl-AI and phosphorus acid. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, p. 606-611, 1984.
- FITZEL, R. D.; PEAK, C. M. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 104, p. 53-59, 2008.

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

GARIEPY, T. D.; RAHE, J. E.; LÉVESQUE, C. A.; SPOTTS, R. A.; SUGAR, D. L.; HENRIQUEZ, J. L. *Neofabraea* species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest. **Plant Pathology**, London, v. 27, p. 118-124, 2005.

GEELLEN, J. A. **An evaluation of Agri-Fos Supra 400 for the control of black spot and powdery mildew of apple in Hawke's Bay**. North Hastings: Jar Geelen Research, Independent Horticultural Consultants, 1999. 15 p.

GROVE, G. G.; DUGAN, F. M.; BOAL, R. J. Perennial canker of apple: seasonal host susceptibility, spore production, and perennation of *Cryptosporiopsis* sp. in infected fruit in Eastern Washington. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, p. 1109-1114, 1992.

GUERRA, D. S. **Predisposição de macieiras (*Malus domestica* Borkh.) com infecções virais a *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweber em frutos e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig.) Penzig. & Sacc. em folhas**. 2007. 99 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GUEST, D. I.; GRANT, B. R. The complex action of phosphonates antifungal agents. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 66, p. 59-187, 1991.

HAMADA, N. A. **Caracterização morfológica, patogênica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. em macieira**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005a.

HAMADA, N. A. Influência da temperatura e do período de molhamento foliar na incidência e severidade da mancha-foliar-da-gala (*Colletotrichum* sp.). **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 18, p. 73-77, 2005b.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Nova Iorque, v. 61, p. 597-607, 1975.

HASSAN, M. A. E.; BUCHENAUER, H. Induction of resistance to fire blight in apple by acibenzolar-S-methyl and DL-3-aminobutyric acid. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 114, p. 151-158, 2007.

HAYAT, M. A. **Basic electron microscopy techniques**. New York: UNR, 1972. 119 p.

HENRIQUEZ, J. L.; SUGAR, D.; SPOTTS, R. A. Etiology of Bull's rot of pear caused by *Neofabraea* spp in Oregon, Washington, and California. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1134-1138, 2004.

HENRIQUEZ, J. L.; SUGAR, D.; SPOTTS, R. A. Effects of environmental factors and cultural practices on bull's eye rot of pear. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 421-424, 2008.

HENRIQUEZ, J. L.; SUGAR, D.; SPOTTS, R. A. Induction of cankers on pear tree by *Neofabraea alba* and *N. perennans*, and fungicide effects on conidial production on cankers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 481-486, 2006.

JONG, S. N.; LEVESQUE, C. A.; VERKLEY, G. J. M.; ABELN, E. C. A.; RAHE, J. E.; BRAUN, P. G. Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA and the B-tubulin gene. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 658-669, 2001.

KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 39, p. 83-89, 2003.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. da S. Viabilidade do uso de sistema de previsão para o controle da requeima da batateira na região de São Joaquim, SC. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 105-109, 1996.

- KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Controle da mancha foliar da Gala. In: REUNIÃO ANUAL DE FITOSSANIDADE NA CULTURA DA MACIEIRA, 4., 1999, São Joaquim. **Relatório...** São Joaquim: Epagri, 1999. p. 32-34.
- KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S.; BECKER, W. F. Mancha Foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 13, p. 14-19, 2000.
- KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S.; OZAWA, T. Efeito da temperatura e do período de molhamento foliar na severidade da mancha foliar de *Glomerella* macieiras da cv. Gala, em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. , p. 294, 1999. Resumo.
- KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Influência da temperatura e do período de molhamento foliar na etiologia da mancha da gala (*Colletotrichum* spp.). In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 6., 2003, Fraiburgo. **Anais...** Florianópolis: Epagri, 2003. p. 15-26.
- LALANCETE, N.; ROBISON, D. M. Effect of fungicides, application timing, and canker removal on incidence and severity of constriction canker of peach. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 721-728, 2002.
- LEITE JUNIOR, R. P.; TSUNETI, M.; KISHINO, A. Y. **Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no Estado do Paraná**. Londrina: IAPAR, 1988. 6 p. (IAPAR. Informe de Pesquisa, 81).
- LENNÉ, J. M. *Colletotrichum* diseases of legumes. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p.134-166.
- LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 620-625, 2003.
- LITTLE, T. M.; HILLS, F. J. **Statistical methods in agricultural research**. Berkeley: University of California, 1972.
- MACHARDY, W. E. **Apple scab: biology, epidemiology and management**. Paul: APS, 1996. 545 p.
- MAFIOLETTI, M. A. **Características morfofisiológicas de *Cryptosporiopsis perennans*, agente causal da podridão “olho de boi” em maçã**. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.
- MALUSA, E.; TOSI, L. Phosphorous acid residues in apples after foliar fertilization: results of field trials. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v. 22, p. 541-548, 2005.
- MELLO, L. M. R. **Produção e mercado da maçã brasileira – panorama 2005**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. (Embrapa Uva e Vinho. **Circular Técnica**, 64).
- MILLER, E.V. Some physiological studies of *Gloeosporium perennans* and *Neofabraea malicorticis*. **Journal of Agricultural Research**, v. 45, p. 65-77, 1932.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. London. Prentice-Hall. 1972. 480p.
- NICCHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, T. Phenolic compounds and their role disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, 1992.
- OGAWA, J. M.; ENGLISH, H. Fungal diseases of pome fruit. In: OGAWA, J. M.; ENGLISH, H. **Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops**. Oakland: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 1991. p. 32-39.
- PATERSON, R. R. M.; BRIDGE, P.D. **Biochemical Techniques for Filamentous Fungi**. Wallingford. C.A.C. International. 1994. 125 p.
- PIEPHO, H. P. Analysing disease incidence data from designed experiments by generalized linear mixed models. **Plant Pathology**, London, , v. 48, p. 668-674, 1999.

PISKOLCZI, M.; VARGA, C. S.; RACSKÓ, J. The meteorological causes of the sunburn injury on the surface of apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Mazovia, v. 12, p. 245-253, 2004. Workshop on Orchard Management in Sustainable Fruit Production, Poland, Skierniewice, Proc 53.

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

PUSEY, P. L. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. **Pesticide Science**, Oxford, v. 27, p.133-140, 1989.

REUVENI, M.; HARPAZ, M.; REUVENI, R. Integrated control of powdery mildew on field-grow mango tree by foliar sprays of mono-potassium phosphate fertilizer, sterol inhibitor fungicides and the strobilurin kresoxym-methyl. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 853-860, 1998.

REUVENI, M. D. O.; REUVENI, R. Integrated of powdery mildew on apple trees by foliar sprays of mono-potassium phosphate fertilizer and sterol inhibiting fungicides. **Crop Protection**, Surrey, v. 17, p. 563-568, 1998.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; RESENDE, M. L. V.; PEREIRA, R. B.; CAVALCANTI, F. R.; AMARAL, D. R.; PÁDUA, M. A. Fosfite de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb., em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência e Agrotécnologia**, Lavras, v. 30, p. 629-636, 2006.

SAINDRENTANT, P.; BARCHIETTO, T.; AVELINO P. J.; BOMPEIX, G. Effect of phosphite on phytoalexin accumulation in leaves of cowpea infected with *Phytophthora cryptogea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 32, p. 425-435, 1988.

SILVEIRA, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: MANUAL sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. [S.I.]: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. v. 1, p. 71-79.

SAS INSTITUTE. Getting started with the SAS: learning edition. Cary, 2002. 200 p.

SÔNIGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Avaliação de fosfitos no controle do míldio da videira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 14 p. (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 11).

SPENCER, D. M.; WILKINSON, E. H. A method of reducing the losses caused by *Gloeosporium* spp. in stored apples. **Nature**, Londres, v. 181, p. 1603-1604, 1958.

SPOLTI, P.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; LARANJEIRA, F. F.; DEL PONTE, E. M. Padrões espaciais de podridões e de fuligem em maçãs: Epidemiologia comparativa. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., 2010, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010.

SPOTTS, R. A. Environmental factors affecting conidial survival of five pear decay fungi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, p. 391- 392, 1985.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W. Association between lipoxygenase and peroxidase activity and systemic protection of cucumber plants against *Podospaera xanthii* induced by *Oudemansiella canarii* extracts. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 114, p. 9-13, 2007.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 25-34, 2000.

SUTTON, D. K.; MacHARDY, W. E.; LORD, W. G. Effects of shredding or treating apple leaf litter with urea on ascospore dose of *Venturia inaequalis* and disease buildup. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 1319-1326, 2000.

TU, J. C. *Colletotrichum lindemuthianum* on bean: Population dynamics of the pathogen and breeding for resistance. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 203-224.

VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. **Podridão de frutos e cancos dos ramos causados por *Cryptosporiopsis perennans* nas macieiras**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2001. (Embrapa Uva e Vinho. **Circular Técnica**, 29).

VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. Podridões de maçãs frigorificadas. In: GIRARDI, C. L. (Ed.). **Maçã: pós-colheita**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. P. 35-45. (Frutas do Brasil, 39).

VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; MAFFIOLETTI, M.; COMPARIN, C. C.; KRASNIAK, A.; BOGO, A.; ARCARI, R. **Características e controle da podridão 'olho-de-boi' nas maçãs do Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. 13 p. (Embrapa Uva e Vinho. **Circular Técnica**, 66).

VERKLEY, G. J. M. A monograph of the genus *Pezizula* and its anamorphs. **Studies in Mycology**, v. 44, p. 162, 1999.

WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 1368-1373, 2005.

WICKS, T. J.; MAGAREY, P. A.; WACHTEL, M. F.; FRENHAM, A. B. Effect of postinfection application of phosphorus (phosphonic) acid on the incidence and sporulation of *Plasmopora viticola* on grapevine. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 75-40, 1991.

WILKINSON, C. J.; HOLMES, J. M.; DELL, B.; TYNAN, K. M.; MCCOMB, B. L.; SHEARER, I. J.; COLQUHOUN, G. E.; HARDY, S. T. J. Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, London, v. 50, p. 587-593, 2001.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Soluble, dye-labelled substrates for a micro-plate assay of proteinase activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 25, p. 337-342, 1996.

YURI, J. A. El daño por sol en manzanas. **Revista Frutícola**, Curicó, v. 22, p. 89-96, 2001.

YURI, J. A.; TORRES, C.; BASTÍAS, R.; NEIRA, A. Golpe de sol em manzanas. Factores inductores y respuestas bioquímicas. **Agrociência**, Chapingo, v. 16, p. 23-32, 2000b.

YURI, J. A.; TORRES, C.; VÁSQUEZ, J. Golpe de sol em manzanas: evaluación del daño y métodos de control. **Agrociencia**, Chapingo, v. 16, p. 13-21, 2000a.

ZADOKS, J. C.; SCHEIN, R. D. **Epidemiology and plant disease management**. New York: Oxford University, 1979. 427 p.

7. PUBLICAÇÕES GERADAS PELA ATIVIDADE

ARAÚJO, L.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 54-59, 2010.

ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J.; BORSATO, L. C.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 148-152, 2008.

BOGO, A.; COMPARIM, C. C.; KUHNEM JUNIOR, P. R.; SALDANHA, A.; AMARANTE, C. V. T.; COELHO, C. M. M.; DREHMER, A. M. F. Efeito do tratamento com aminoetoxivinilglicina (AVG) sobre a incidência da mancha foliar da gala e queda pré-colheita de frutos em macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. v. 1, p. 1-32.

- BOGO, A.; COMPARIM, C. C.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; SALDANHA, A.; COELHO, C. M. M.; KUHNEM JUNIOR, P. R. Atividade enzimática de isolados de *Cryptosporopsis* sp associados a doença olho-de-boi em macieira na região sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. v. 1, p. 41-42.
- BOGO, A.; MAFFIOLETTI, M. A.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; CASA, R. T. Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meios de cultura. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 248-251, 2008.
- BOGO, A.; RIBEIRO, D.; DANTAS, A. C. M.; COELHO, C. M.; GUIDOLIN, A. F. DNA ribosomal phylogeny among isolates of *Colletotrichum* spp, agent causal of apple 'Gala' leaf spot. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF BIOTECHNOLOGY AND AGRICULTURE, 6., 2007, Ciego de Ávila. **Proceedings...** Ciego de Ávila, Cuba: Centro de Bioplasmas, 2007. v. 1, p. 44-51.
- BOGO, A.; SALDANHA, A.; COMPARIM, C. C.; COELHO, C. M. M. Diversidade e variabilidade de isolados de *Cryptosporiopsis* spp associados a podridão olho-de-boi em macieira na região sul do Brasil, através da caracterização morfológica e fisiológica. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UDESC, 18., 2008, Lages. **Anais...** Florianópolis: UDESC, 2008. v. 1, p. 24-25.
- NASCIMENTO, F. V.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; SPOLTI, P.; BARTNICKI, V. A. Variabilidade de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* quanto à sensibilidade ao tratamento hidrotérmico e à luz ultravioleta. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UCS, 8., Vacaria. **Anais...** Vacaria: UCS, 2008.
- NUNES, C. C.; ALVES, S. A. M. Manejo de doenças da macieira no período de verão. **AGAPOMI**, Vacaria, n. 199, p. 6-7, 2010.
- SCHENATO, P. G.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V. Determinação da presença da raça 1 de *Venturia inaequalis* no Sul do Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 281-267, 2008.
- SPOLTI, P.; SCHEINER, L.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; GLEASON, M.; BATZER, J.; DEL PONTE, E. M. Improving sooty blotch and flyspeck severity estimation on apple fruit with the aid of a diagrammatic scale. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 129, p. 21-29, 2011.
- SPOLTI, P.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; DEL PONTE, E. M. Meio semiseletivo para recuperação e quantificação de *Cryptosporiopsis perennans* em maçãs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 661-665, 2010.
- SPOLTI, P.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; GLEASON, M.; DEL PONTE, E. M. Inoculum and infection dynamics of the sooty blotch and flyspeck complex of apples in southern Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 497-501, 2011.
- SPOLTI, P.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; GLEASON, M.; DEL PONTE, E. M. Sooty blotch and flyspeck control with fungicide applications based on calendar, local IPM, and warning system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 7, p. 697-705, 2011.
- SPOLTI, P.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; LARANJEIRA, F. F.; DEL PONTE, E. M. Comparative spatial analysis of the sooty blotch/flyspeck disease complex, bull's eye and bitter rots of apples. **Plant Pathology**. No prelo. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02524.x
- SPOLTI, P.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; LARANJEIRA, F. F.; DEL PONTE, E. M. Padrões espaciais de podridões e de fuligem em maçãs: Epidemiologia comparativa. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., 2010, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010.
- SPOLTI, P.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; RITSCHER, P. S.; DEL PONTE, E. M. Períodos de suscetibilidade de maçãs à infecção por *Cryptosporiopsis perennans*. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA UVA E VINHO, 6.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 2., 2008, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. p. 31. Resumo.

SPOLTI, P.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; RITSCHER, P. S.; DEL PONTE, E. M. Uso de fosfitos de potássio para o controle da podridão 'olho de boi' em maçãs 'Pink Lady'. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA UVA E VINHO, 6.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 2., 2008, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. p. 30. Resumo.

STADNIK, M. J. ; ARAÚJO, L. VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de *Glomerella* e da sarna da macieira. In: STADNIK, M. J. (Org.). **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis: UFSC, 2009. p. 105-126.

VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; COMPARIN, B. P.; SPOLTI, P. Controle de podridões de maçãs e de morangos com *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: SBF, 2008.

VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E. M. Controle do inóculo inicial para redução dos danos pela podridão: 'olho-de-boi' em macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1044-1054, 2010.

