

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA- UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

CARLA CASSOL COMPARIN

VARIABILIDADE E DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE
Cryptosporiopsis spp., ASSOCIADOS À PODRIDÃO “OLHO-DE-
BOI” EM MAÇÃS NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (CAV/UDESC) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Ph.D.Amauri Bogo

Co-orientadora: Dra. Rosa Maria V. Sanhueza

LAGES – SC

2009

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária

Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região

(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Comparin, Carla Cassol

Variabilidade e diversidade de isolados de *Cryptosporiopsis* spp., associados à podridão “olho-de-boi” em maçãs na região sul do Brasil. / Carla Cassol Comparin – Lages, 2009. 52 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias / UDESC.

1. Maçã - epidemiologia. 2. podridão pós-colheita 3. variabilidade morfo-fisiologia.

I.Título.

CDD – 634

CARLA CASSOL COMPARIN

**VARIABILIDADE E DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE
Cryptosporiopsis spp., ASSOCIADOS À PODRIDÃO “OLHO-DE-
BOI” EM MAÇÃS NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

**Aprovado em:
Pela Banca Examinadora:**

**Homologado em:
Por:**

Ph. D. Amauri Bogo
Orientador – UDESC/Lages-SC

Dr. Jefferson Luis Meirelles Coimbra
Coordenador Técnico do Programa de
Mestrado em Produção Vegetal

Ph. D. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza
Co-orientadora – Proterra/Vacaria-RS

Dr. Paulo Cezar Cassol
Coordenador Geral do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Agrárias

Dr.^a. Patrícia Ritschel
Embrapa Uva e Vinho-RS

Dr. Adil Knackfuss Vaz
Direto Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias – UDESC/Lages-SC

Dr. Ricardo Trezi Casa
UDESC/Lages-SC

Lages – SC, 08 de dezembro de 2009

Aos meus pais Luis Carlos e Ausilia pelo amor, incentivo e dedicaçãõ. Ao meu irmão Leonardo pelo companheirismo e apoio. A minha filha Isabela pelo amor e compreensãõ.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Á DEUS, por estar sempre comigo nesta caminhada.

Aos meus pais Luis Carlos e Ausilia. Obrigada por vocês existirem. Obrigada por depositarem em mim a confiança para todas as horas e por nunca medirem esforços para que eu pudesse concretizar meus objetivos.

Ao meu irmão Leonardo por estar sempre torcendo por mim. Obrigada pelo companheirismo e pelo apoio.

A minha filha Isabela, pelo amor, paciência e compreensão. Obrigada por ter sacrificado muitos momentos que poderíamos ter desfrutado juntas para que eu pudesse me dedicar a esta dissertação. Filha obrigada por fazer parte da minha vida!

A Universidade do Estado de Santa Catarina/UEDESC, especialmente ao Centro de Ciências Agroveterinárias/CAV.

Ao Programa de Monitoria de Pós-Graduação/PROMOP, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos colegas de mestrado, pelos momentos de estudo, trabalho e descontração.

Ao bolsista Alexandre Saldanha, pela ajuda na realização dos experimentos.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Produção Vegetal.

A equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Uva e Vinho, Tina, Valdair, Renata, Piérri, Fernanda e Vinícius pela ajuda, companheirismo e acima de tudo amizade. Especialmente ao Bruno, meu amigo e primo que esteve presente em todos os momentos.

Ao professor Amauri Bogo, pela orientação, ajuda, empenho, compreensão, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

A Dra Rosa pela oportunidade de estágio na Embrapa Uva e Vinho, pelos primeiros ensinamentos em Fitopatologia, compreensão e acima de tudo pela amizade.

Aos meus amigos e a todos que de alguma forma contribuíram e estiveram presentes durante esta etapa.

RESUMO

A maçã é a fruta de clima temperado mais importante entre as comercializada como fruta fresca, tanto no contexto internacional quanto nacional, e por este motivo possui grande importância socioeconômica no país. Dentre os estados produtores do Brasil, destacam-se Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. Um dos fatores que mais compromete o aumento da produção desta cultura são as chamadas doenças de verão que causam podridões de frutos, entre elas a podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*, sin. *B. berengeriana*), a podridão amarga (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*), e a podridão “olho-de-boi” (*Cryptosporiopsis perennans*). Neste grupo de doenças, a podridão “olho-de-boi” vem causando perdas crescentes no Brasil, Argentina e Chile. A primeira constatação da podridão “olho-de-boi” no Brasil aconteceu 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 em Santa Catarina, sendo o agente causal identificado pela sua morfologia no Instituto de Micologia da Holanda (CBS) como *Cryptosporiopsis perennans*. Atualmente observa-se que isolados associados à doença apresentam grande variabilidade morfo-fisiológicas e genética, sugerindo a existência de outra(s) espécie(s). Com o objetivo de identificar a correta etiologia do agente causal, isolados de pomares comerciais dos estados de SC e RS, classificados por análise da região ITS-rDNA, em grupo I (Cp5, Cp9 e Cp11) e grupo II (Cp1, Cp2, Cp3, Cp4, Cp6, Cp7, Cp8, C10) pelo Instituto Canadense, foram avaliados morfo-fisiologicamente quanto ao crescimento em meios de cultura (BDA, AEM e V8), tamanho de esporos (comprimento e largura), ciclo biológico para obtenção da fase sexuada, patogenicidade em frutos (com e sem fermento) e atividade enzimática (lipolítica, proteolítica, amilolítica, DNase, RNase e pectolítica pH5 e pH7) e susceptibilidade a temperaturas (3, 4, 5, 30 e 31°C). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de contraste e teste de comparação de médias Tukey 5%. Verificou-se uma grande variabilidade entre os isolados de cada grupo. Verificou-se diferenças morfo-fisiológicas significativas e a variável que mais influenciou na diferenciação dos grupos foi o efeito da temperatura de 5°C no crescimento ou não dos isolados. Os isolados Cp8 e Cp5, considerados padrões do grupo I e II, respectivamente, são diferentes entre si e diferentes dos outros isolados e foram analisados pelo Instituto de Micologia da Holanda (CBS), como representantes de outras espécies.

Palavras-chave: Maçã. Podridão “olho-de-boi”. Variabilidade.

ABSTRACT

The apple is one of the most important of temperate fresh fruit in both international and national levels, and for this reason has great economic importance in the country. Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Parana and Sao Paulo are the biggest county apple producer, respectively. One factor that most compromise the apple production culture is called summer diseases that cause fruit rot, including the white rot (*Botryosphaeria dothidea*, sin. *B. berengeriana*), bitter rot (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*), and Bull's eye rot (*Cryptosporiopsis perennans*). In this group of diseases, "Bull's eye rot" is causing increasing losses in Brazil, Argentina and Chile. The first finding of brown Bull's eye rot in Brazil happened in the growing seasons of 1995 and 1996 in apple cultivars Fuji and Golden Delicious, harvested in orchards of Tainhas, Caxias do Sul, Vila Oliva and Vacaria in Rio Grande do Sul and Fraiburgo in Santa Catarina, being the causal agent identified in the CBS as *Cryptosporiopsis perennans*. Nowadays it is observed that isolates associated with the disease are similars morpho-physiological and genetic, suggesting the existence of other (s) kind (s). In order to correctly identify the etiologic agent, isolates from commercial orchards in the states of SC and RS, classified by analysis of the ITS-rDNA, group I (CP5, CP9 and CP11) and group II (CP1, CP2, CP3, CP4, CP6, CP7, CP8, C10) by the Canadian Agricultural and Agri-Food Canada, were evaluated morpho-physiological by its growth in culture media (PDA, V8 AEM), spore size (length and width), life cycle for obtaining the sexual phase, pathogenicity on fruits (with and without injury) and enzymatic activitie (lipase, protease, amylase, DNase, RNase and Pectolytic pH5 and pH7) and susceptibility to temperature (3, 4, 5, 30 and 31 ° C). The experimental design was completely randomized and data were analyzed for contrast and comparison test of averages Tukey 5%. There was a great variability between isolates. They showed different morpho-physiological and significant differences, and the variable that most influenced the differentiation was the effect of temperature of 5 ° C in the growth or not of the isolates. Isolates CP8 and CP5, considered standards of the group I and II, respectively, are different between each other and different from other isolates and were analyzed by the CBS, as representatives of other species.

Keywords: Apple. "Bull's eye rot". Variability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Origem dos isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp.	25
Tabela 2 -	Crescimento micelial médio (CMM) de onze isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp. (Cp1 a Cp11) em três meios de cultura (BDA, AEM e V8) após 15 dias de incubação a 22°C.....	32
Tabela 3 -	Variabilidade de onze isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp. (Cp1 a Cp11) em três diferentes meios de cultura (BDA, AEM e V8) após 15 dias de incubação a 22°C.....	35
Tabela 4 -	Características dos isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp., classificados em três grupos distintos conforme características apresentadas no meio de cultura BDA, após 15 dias de incubação a 22°C.....	35
Tabela 5 -	Diâmetro médio dos conídios de onze isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp., cultivados em meio de cultura BDA, após 15 dias de incubação a 22°C.....	38
Tabela 6 -	Virulência de isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp. em frutos com ferimento das cvs. Pink Lady e Fuji, mantidos a 22°C.....	43
Tabela 7 -	Virulência de isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp. em frutos sem ferimento na cv. Pink Lady, mantidos a 22°C.....	43
Tabela 8 -	Caracterização enzimática de onze isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp., após 15 dias de incubação a 22°C.....	46
Tabela 9 -	Crescimento micelial médio (CMM) de onze isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp. a diferentes temperaturas – 21 dias após a incubação.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sintomas da podridão “olho-de-boi” nos frutos cv. Fuji (A, E, F), cv. Gala (C, D) e cv. Pink Lady (B).....	20
Figura 2 -	Sintoma da podridão “olho-de-boi” nos ramos.....	20
Figura 3 -	Isolado monospórico de <i>Cryptosporiopsis</i> spp.....	24
Figura 4 -	Colônia de <i>Cryptosporiopsis</i> spp. 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).....	26
Figura 5 -	Detalhe da colônia de <i>Cryptosporiopsis</i> spp. (A) e reverso da colônia (B), no meio de cultura BDA.....	26
Figura 6 -	Detalhe da régua micrométrica utilizada para a observação dos conídios de <i>Cryptosporiopsis</i> spp.....	27
Figura 7 -	Coloração e morfologia das colônias de <i>Cryptosporiopsis</i> spp. no meio de cultura BDA (A), reverso BDA (B), meio de cultura AEM (C), reverso AEM (D), meio de cultura V8 (E) e reverso (F).....	34
Figura 8 -	Formação de grupos entre os onze isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp., Grupo A (Cp1, Cp5 e Cp11), Grupo B (Cp2, Cp3, Cp4 e Cp7) e Grupo C (Cp6, Cp8, Cp9 e Cp10).....	36
Figura 9 -	Variação no comprimento e largura dos conídios de <i>Cryptosporiopsis</i> spp.....	38
Figura 10 -	Formação de cancrios em ramos de macieiras inoculados com isolados de <i>Cryptosporiopsis</i> spp.....	40

Figura 11 - Sintomas característicos da podridão “olho-de-boi” nas frutas inoculadas cv. Fuji com fermento (A e B) cv. Pink Lady com fermento (C e D) e cv. Pink Lady sem fermento (E e F).....	42
Figura 12 - Produção de enzimas por <i>Cryptosporiopsis</i> spp., amilolítica (A), Rnase (B), Lipolítica (C), Pectolítica pH5 (D), Proteolítica (E) e Pectolítica pH7 (F).....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A CULTURA DA MACIEIRA	16
2.2 PODRIDÃO “OLHO-DE-BOI”	17
2.2.1 Ocorrência e importância.....	17
2.2.2 Etiologia	18
2.2.3 Sintomatologia	19
2.2.4 Epidemiologia	21
2.2.5 Controle	22
2.3 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA E FERRAMENTAS MOLECULARES USADAS NA CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE FUNGOS.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS.....	24
3.2 VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS EM RAMOS E FRUTOS DE MACIEIRA.....	27
3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS.....	29
3.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA QUANTO À SUSCEPTIBILIDADE À TEMPERATURA.....	30

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS.....	31
4.2 VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS EM RAMOS E FRUTOS DE MACIEIRA.....	38
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS.....	43
4.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA QUANTO À SUSCEPTIBILIDADE A TEMPERATURAS.....	46
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A maçã é a fruta de clima temperado mais importante entre as comercializadas como fruta fresca, tanto no contexto internacional quanto nacional, e por este motivo possui grande importância socioeconômica no país. Dentre os estados produtores do Brasil, destacam-se Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. A maçã está entre as quatro frutas mais consumidas no mundo. No Brasil, ela é comercializada os doze meses do ano e distribuída em todo o país (PETRI; LEITE, 2008).

A maior parte da produção provém de três cultivares: Gala, Fuji e Golden Delicious. A cultivar Gala é a primeira a ser colhida – fevereiro – com 46% da produção total; a Fuji, cuja colheita se dá em abril, é a mais resistente para frigo-conservação, participando com 45% da produção; a Golden Delicious, colhida em março, representa 6% da produção total e os 3% restantes são compostos por outras cultivares.

Hoje, os maiores produtores mundiais de maçã são a China, EUA e Turquia e o Brasil vem ocupando a 13ª posição.

A produção nacional de maçã concentra-se na Região Sul do país, que é responsável por 98% da produção. Em 1972, a área plantada no Brasil era de 931ha e uma produção de aproximadamente 1,52t, já no ano de 2002 havia 31.070ha plantados e uma produção de 857,340t. Na última safra o Brasil produziu cerca de um milhão de toneladas da fruta (ICEPA).

Até a década de 70, o Brasil importava praticamente toda a maçã consumida. O aumento da produção da fruta permitiu ao país substituir gradativamente as importações na década de 80 e início da década de 90, tornando-se autosuficiente (MELLO, 2006). Entretanto, 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. acutatum*), e a podridão “olho-de-boi” (*Cryptosporiopsis perennans*) (SANHUEZA et al., 2006).

Neste grupo de doenças, a podridão “olho-de-boi” vem causando perdas crescentes no Brasil e Chile. A primeira constatação da podridão “olho-de-boi” no Brasil aconteceu 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 em Santa Catarina, sendo o agente causal identificado no Instituto de Micologia da Holanda (CBS), com base nas características morfológicas, como *Cryptosporiopsis perennans* (SANHUEZA, 2001).

Quatro espécies do gênero *Neofabraea* são conhecidas como causadoras da podridão “olho-de-boi” em maçãs: *Neofabraea malicorticis* (Jacks), *N.perennans* (Kienholz), *N.alba* (Guthrie) e *Neofabraea* sp. nov, esta determinada por Jong et al, 2001 (HENRIQUEZ et al., 2004).

Atualmente observa-se que isolados associados à doença apresentam grande variabilidade morfo-fisiológicas e genética, sugerindo a existência de outra(s) espécie(s).

Isolados coletados de pomares comerciais do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, apresentando grande variabilidade, foram encaminhados no ano de 2006 para o Instituto Canadense de Agricultura e Alimentos, onde se fez análise da região ITS-rDNA. Obteve-se desta análise dois grupos distintos, nomeados como Grupo I e Grupo II. No Grupo I encontram-se os isolados: Cp5, Cp9 e Cp11 e no Grupo II os isolados: Cp1, Cp2, Cp3, Cp4, Cp6, Cp7, Cp8 e Cp10, e se concluiu que os isolados analisados não apresentavam similaridade com *Cryptosporiopsis perennans*.

Devido à diversidade de características encontradas entre os isolados dos dois grupos, no ano de 2009, um isolado de cada grupo, Cp5 e Cp8, foram encaminhados para o Instituto de Micologia da Holanda (CBS) para análise baseada em técnicas moleculares. Obteve-se então que o isolado Cp5 (Grupo I) tratava-se de uma espécie supostamente ainda não descrita, mas com 98,7% de homologia da região ITS-rDNA com o isolado Cp8 (Grupo II), este já descrito como *Cryptosporiopsis actinidiae*, isolado de quivizeiro na Nova Zelândia e provocando podridão em kiwis.

Este trabalho teve como objetivo:

GERAL: gerar informações que auxiliem na determinação da correta etiologia do agente causal da podridão “olho-de-boi”, atualmente vinculada a *C. perennans*, através das características morfo-fisiológicas e genéticas de isolados provenientes de pomares comerciais dos estados de SC e RS.

ESPECÍFICOS:

1. Isolamento e caracterização morfológica dos isolados de *Cryptosporiopsis* spp.;

2. Ciclo biológico e virulência;
3. Atividade enzimática;
4. Caracterização fisiológica quanto à sensibilidade a temperaturas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DA MACIEIRA

O centro de origem da macieira é a região entre o Cáucaso e o leste da China e o sua domesticação teve início há 20.000 anos. A disseminação das formas primitivas das macieiras ocorreu com a migração dos povos euroasiáticos.

A pomicultura brasileira teve início no ano de 1926 no município de Valinhos-SP, e no ano de 1928 iniciou-se a pesquisa em macieira no Brasil (PETRI; LEITE, 2008).

A macieira pertence à Família Rosaceae, Ordem Rosales, Subfamília Pomoideae, Tribo Maleae, Gênero *Malus*, Miller, abrangendo cerca de 100 gêneros e mais de duas mil espécies. Na nomenclatura científica são citados vários nomes para a macieira: *Pyrus malus* Lineu, *Malus pumila* Miller, *Malus sylvestris* Miller, *Malus malus* Britton, *Malus communis* Poiret e *Malus domestica* Borkhausen, proposta em 1803 e segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, está é a primeira denominação válida publicada para a macieira cultivada (BENDER, 1986).

É uma fruteira lenhosa, decídua, temperada, muito adaptável a diferentes climas, crescendo desde os trópicos até as altas latitudes. As plantas possuem folhas alternadas, simples e caducas, com bordos dentados e tomentosa na parte adaxial. O fruto é um pomo, constituído de receptáculo carnudo que envolve os ovários, possuindo endocarpo coriáceo. As flores são hermafroditas, brancas ou rosas, inferovariadas e dispostas em inflorescência denominada umbela (IUCHI, 2002).

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de frutas, e os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina participam como um dos grandes produtores de frutas de clima temperado, tendo a maçã como principal representante e o estado de Santa Catarina participando com 60% da produção nacional. Contudo, o Brasil, é ainda um país marginal no comércio mundial de frutas frescas, ocupando o terceiro lugar no ranking mundial com 43 milhões de toneladas em 2002, o que corresponde a apenas 1,5% do total produzido. (SANHUEZA, 2009).

A maçã é a fruta de clima temperado de maior importância entre as frutas comercializadas como fruta fresca, tanto no contexto internacional quanto nacional. Dessa maneira, o Brasil assumiu a posição de destaque no cenário mundial de produção de maçãs,

passando da condição de importador para a de auto-suficiente e de exportador. Essa situação deve-se a investimentos do setor em tecnologias modernas, alcançando índices de produção e produtividade elevados, permitindo colocar em diferentes mercados o ano todo frutas de alto padrão de qualidade.

A produção de maçã está concentrada na Região Sul do Brasil, que é responsável por 98% da produção nacional. Em 1974 era de apenas 1,53 mil toneladas, passando a produzir 351 mil toneladas da fruta em 1990 (EMBRAPA, 2004) e chegando atualmente a aproximadamente 1 milhão de toneladas (ICEPA, 2009).

Os principais estados produtores de maçã são: Santa Catarina com 15.907 hectares, Rio Grande do Sul com 13.639 ha, Paraná com 1.300 ha e São Paulo com 224 ha (EMBRAPA, 2004). Na safra de 2007/2008 foram produzidas 1.136.132 toneladas de maçã sendo 582.924 toneladas proveniente de Santa Catarina, 509.352 toneladas do Rio Grande do Sul, 41.800 toneladas do Paraná e 2.056 toneladas de São Paulo (ICEPA, 2009).

A estrutura produtiva está baseada em três cultivares: Gala, Fuji e Golden Delicious. A Gala representa 46% da produção total, a Fuji 45%, Golden Delicious 6% e o restante estão distribuídos entre outras variedades. (EMBRAPA, 2004).

Não diferindo das frutas de clima tropical, a maçã é uma fruta de elevada perecibilidade, e dentre os fatores que afetam o sistema produtivo estão as doenças e pragas, especialmente as doenças pós-colheita, que são responsáveis por perdas expressivas. Entre as doenças pós-colheita da maçã encontra-se a podridão “olho-de-boi” que é responsável por perdas de 13 a 16% do refugo.

2.2 PODRIDÃO “OLHO-DE-BOI”

2.2.1 Ocorrência e importância

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 (SANHUEZA, 2001).

O agente causal da podridão “olho-de-boi” foi identificado em 1996 no Brasil como *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) e sua posição taxonômica foi confirmada no Instituto de Micologia da Holanda (CBS) com base às características morfológicas, mas

supõe-se que o fungo tenha se estabelecido no país com antecedência à constatação, visto que ele tem sido isolado de cancos antigos de macieira com mais de 20 anos (SANHUEZA et al., 2006). 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).

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.

2.2.2 Etiologia

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 *Pezizula*, e mais recentemente colocadas novamente no gênero *Neofabraea* (JONG et al apud MAFFIOLETTI, 2007, p.17). 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(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. À 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).

2.2.3 Sintomatologia

A podridão “olho-de-boi” nos frutos de maçãs (Figura 1) apresenta-se marrom-clara com centro amarelo pálido, de forma mais ou menos circular, às vezes com margens marrom-escuras ou avermelhadas, deprimidas de textura firme e desenvolvimento lento. Internamente, os tecidos são de cor marrom amarelado, firme, desidratados e com espaços que surgem no centro da lesão e/ou em outras áreas da podridão. As margens entre os tecidos doentes e sadios são bem definidas. O centro das áreas infectadas são muitas vezes de leve coloração alternando com áreas de marrom, dando a característica aparência de um olho de boi. As frutas raramente são apodrecidas por uma lesão. Nas lesões maiores de 1 cm de diâmetro, ocorre rachadura na epiderme em consequência da desidratação dos tecidos colonizados pelo patógeno. As podridões iniciadas em lesões causadas por ferimento no campo são mais amareladas que as que se desenvolvem em pós-colheita, têm halo avermelhado e apresentam a polpa desidratada e com cavernas. Elas surgem a partir dos ferimentos e/ou em outras áreas da podridão como resultado da compactação das áreas afetadas. Sob condições de umidade, no centro das lesões, podem se formar estruturas sub-epidermais escuras ou alaranjadas que produzem no centro, massas esbranquiçadas de conídios. Sintomas da doença são observados ao redor de lenticelas e ferimento, na cavidade peduncular e calicinar e ao redor dos carpelos (SANHUEZA et al., 2006).

Em pomares com frutas que apresentam a podridão, geralmente encontra-se cancrós nos troncos (Figura 2) e ramos com anéis concêntricos de tecidos sobressalentes e, nas margens, a epiderme se solta dando o aspecto de papel. Os tecidos dos ramos afetados são de cor marrom-amarelada e podem ser observadas ao redor dos cancrós e no cerne dos ramos e do tronco. Na superfície dos cancrós pode-se também observar os acérvulos do patógeno (SANHUEZA, 2001).

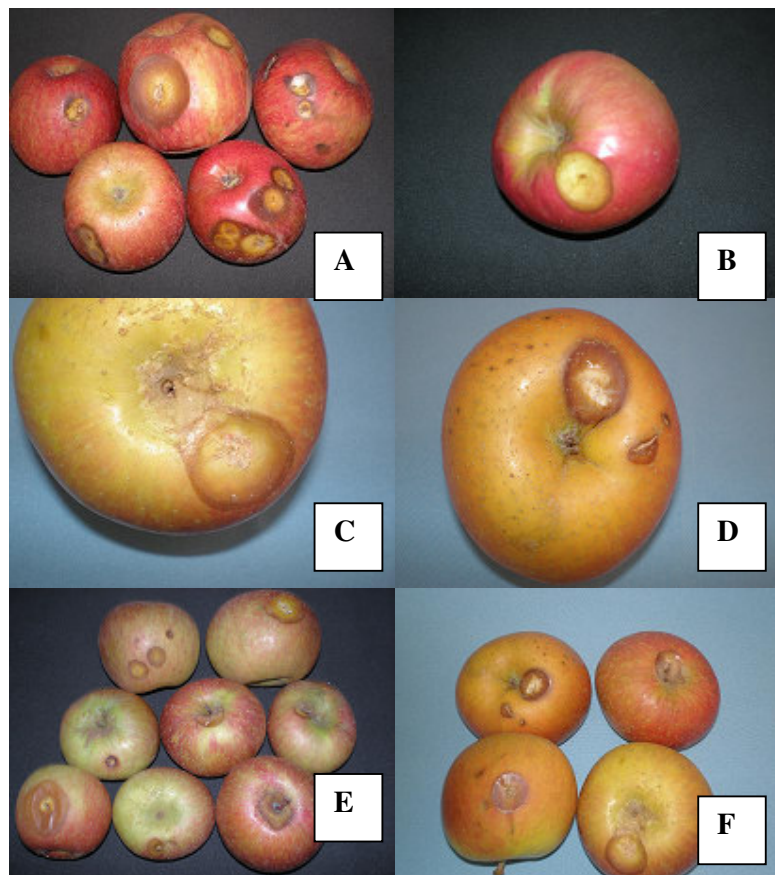


Figura 1 - Sintomas da podridão “olho-de-boi” nos frutos cv. Fuji (A, E, F), cv. Gala (C, D) e cv. Pink Lady (B).



Figura 2 - Sintoma da podridão “olho-de-boi” nos ramos.

2.2.4 Epidemiologia

Nas macieiras a infecção de *C. perennans* pode produzir cancos em ramos ou se desenvolver saprofiticamente em restos culturais, permitindo que os esporos sejam produzidos e disseminados por respingos de chuva diretamente sobre os frutos. Sobre os ramos o patógeno requer ferimentos para poder iniciar o processo de infecção. O fungo sobrevive nos tecidos infectados adjacentes às bordas dos cancos velhos. A maior parte dos cancos perenes se origina onde houve um ferimento durante a poda (GROVE *et al.*, 1992). Para a formação do cancro antracnose, *C. curvispora* não requer ferimento (DUGAN *et al.*, 1993).

A formação do cancro perene não traz perdas para a macieira, porém os conídios produzidos na superfície do cancro funcionam como inóculo para a infecção do fruto e subsequente desenvolvimento da podridão “olho-de-boi” (GROVE *et al.*, 1992).

Os conídios do patógeno são formados em acérvulos e lavados pela chuva dos cancos e de outros tecidos infectados e posteriormente disseminados pelo vento. Os ascósporos formados nos cancos dos ramos com mais de dois anos são ejetados e transportados pelas correntes de ar.

A infecção nos frutos pode ocorrer durante todo o ciclo, mas concentra-se quando o fruto está próximo da maturação e as perdas maiores ocorrem durante e após a frigorificação. O patógeno não necessita de ferimentos para iniciar a infecção que pode se iniciar pela epiderme lesionada, pelas lenticelas ou pelas aberturas naturais como a calicinal e a peduncular, porém o processo é facilitado pela ocorrência de lesões causadas por granizo, insetos e favorecido pela alteração da cutícula e das lenticelas causada pelo impacto de fatores ambientais ou de manejo na fisiologia da fruta (SANHUEZA *et al.*, 2006).

A doença é mais severa em regiões com invernos suaves, e as condições propícias para a infecção são alta pluviosidade e temperatura média de 20°C, especialmente no período próximo da colheita. A podridão se desenvolve rapidamente entre 18°C e 24°C, mas também ocorre na fruta frigorificada a 0°C. Os sintomas da podridão “olho-de-boi” em maçãs surgem em pré e pós-colheita. Os frutos infectados no pomar contribuem para a formação do inóculo e sobrevivência do fungo. Nos pomares o fungo sobrevive principalmente nos ramos com cancos. (MAFFIOLETTI, 2007).

2.2.5 Controle

As estratégias de controle recomendadas para esta doença incluem a redução de inóculo com a eliminação dos cancrios, visto que neles se desenvolvem as estruturas do patógeno e a remoção dos ramos de poda, dos frutos do raleio e de poda de inverno e verão (SANHUEZA et al., 2006). O controle cultural é fundamental para reduzir os níveis de inóculo, visto que mais de 300 cancrios já foram encontrados em uma única macieira (JONG, 1998).

Recomenda-se o uso de fungicidas cúpricos no inverno e de benzimidazóis e protetores em pré-colheita. A aplicação de fungicidas protetores em pós-colheita é eficiente no controle, porém possivelmente não alcance o patógeno, pois o mesmo, provavelmente, está infectando tecidos profundos das lenticelas ocasionados pelas infecções precoces de início da estação de cultivo. Os cortes dos ramos devem ser protegidos por uma pasta fungicida. É constatado, porém, que essas medidas trazem retorno em pomares com pouca infecção, mas não naqueles onde a incidência da doença é mais intensa (SANHUEZA, 2001).

Trabalhos realizados entre 2000 e 2003 em Oregon, mostraram que sulfato de cobre, trifloxystrobin e ziram reduziram a germinação de conídios de *N. perennans* em cancrios induzidos em pereiras. (HENRIQUEZ et al., 2005).

A aplicação pós-colheita de leveduras como o *Cryptococcus laurentii* é uma opção alternativa do controle de doenças pós-colheita como a podridão “olho-de-boi”, trabalhos demonstram que o tratamento com levedura reduz significativamente a incidência e o tamanho das lesões da podridão “olho-de-boi” (BLUM et al., 2004). Outra alternativa de controle pode ser feita com o fungo *Tremella* spp, considerado como agente de biocontrole de grande potencial para alguns patógenos que causam podridão em maçã (SARTORI et al., 2007).

O resfriamento rápido das frutas diminui o avanço das infecções e a extensão da infecção nas maçãs pode ser estimado mantendo as amostras em temperaturas de 18 – 21°C e umidade relativa do ar próximo da saturação por um período de 30 dias e assim prever o nível de infecção das amostras e prever com antecedência o tempo médio de armazenamento da produção da estação de cultivo. O controle das condições de armazenamento, com oxigênio em torno de 1%, reduz a incidência e severidade da podridão “olho-de-boi”.

2.3 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA E FERRAMENTAS MOLECULARES USADAS NA CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE FUNGOS

O número estimado de espécies de fungos no Planeta Terra é de 1,5 milhões, mas o número de espécies descritas até hoje é de aproximadamente 70 mil. A grande dificuldade da identificação e classificação de fungos está associada ao fato de que a taxonomia deste grupo envolve a classificação de taxa baseada em aspectos morfológicos, os quais são aplicados às chaves de classificação. Em muitos casos, têm-se dificuldade para determinar quais as características que realmente definem uma espécie ou gênero.

Devido a esta dificuldade na identificação de espécies de fungos, muitas ferramentas são utilizadas, como os caracteres morfológicos, fisiológicos e mais recentemente os moleculares.

Hoje, existem diversas técnicas de biologia molecular disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo da genética, como na prática de melhoramento de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Ambigüidades taxonômicas do gênero *Cryptosporiopsis* e *Neofabraea* surgiram a partir de trabalhos de Kienholz (1939), que utilizou para descrever a espécie *N.perennans* características de apotécios obtidos em inoculação artificial em macieiras. Já Borema & Verhoeven (1972) consideraram *C. perennans* e *C. malicorticis* como sinônimo de *C. curvispora*, considerando este o correto nome da fase anamórfica de *N.malicorticis*. Sutton (1980) não considerou a espécie *C. curvispora* utilizada por Boerema & Verhoeven (1972), utilizando somente *C. perennans* como sinônimo de *C. malicorticis*. Estes fungos tem sido considerados diferentes espécies de acordo com características culturais, curvatura de macroconídios, fisiologia e sintomas da doença em maçã nos EUA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

3.1.1 Isolamento dos isolados de *Cryptosporiopsis* spp.

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 desinfestados 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 que foram incubadas a 22°C. Após o crescimento das colônias, culturas monospóricas de cada isolado foram transferidas para tubos de vidro com BDA e preservados a 4°C. Os isolados utilizados neste experimento fazem parte da coleção monospórica de *Cryptosporiopsis* spp. da Embrapa Uva e Vinho (Tabela 1). Os isolados Cp1 a Cp9 já haviam sido utilizados por Maffioletti, (2007). Em todos os experimentos utilizou-se isolados monospóricos com 15 dias (Figura 3).



Figura 3 – Isolado monospórico de *Cryptosporiopsis* spp.

Tabela 1 - Origem dos isolados de *Cryptosporiopsis* spp.

Código dos isolados	Local de origem	Ano de coleta
Cp 1	Tainhas/ RS	2002
Cp 2	Tainhas/ RS	2002
Cp 3	Tainhas/ 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

3.1.2 Crescimento micelial dos onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp. em três meios de cultura

Onze isolados monospóricos de *Cryptosporiopsis* spp. cultivados em BDA foram transferidos para placas de Petri contendo três diferentes meios de cultura: BDA batata-dextrose-ágar (10g de dextrose, 18g de ágar, 300 ml de caldo de batata e 700 ml de água destilada), AEM Ágar Extato de Malte (25 g de extrato de malte, 17g de ágar e 1000ml de água destilada) e ágar suco de tomate V8 (200 ml de V8, 3g de CaCO₃, 17g de ágar e 800ml de água destilada). Discos de micélio de 10mm de diâmetro foram extraídos das margens das culturas com auxílio de um perfurador e transferidos para o centro das placas de Petri contendo os diferentes meios. As placas ficaram incubadas em câmaras de crescimento (BOD) a 22°C sob iluminação contínua. A avaliação foi feita aos 15 dias após a incubação, onde se mediu o crescimento micelial com auxílio de um paquímetro digital (Figura 4). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições por isolado.

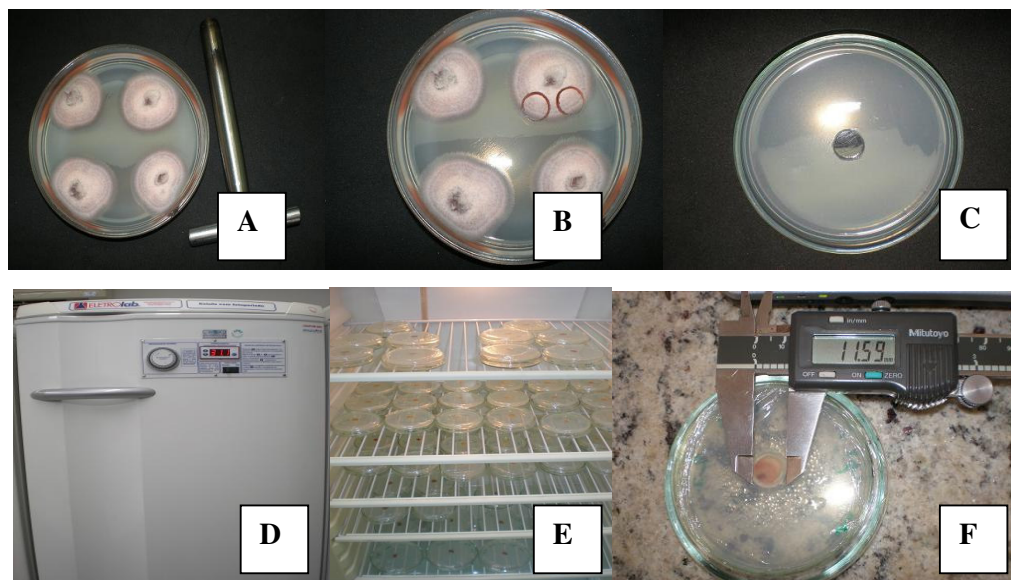


Figura 4 - Colônia de *Cryptosporiopsis* spp. com 15 dias de idade (A), detalhe dos círculos de 10mm de diâmetro (B), repicagem dos discos para as placas contendo os diferentes meios (C), câmara de crescimento BOD (D), placas no interior da câmara de crescimento BOD (E), mensuração do crescimento micelial com paquímetro digital (F).

3.1.3 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 5). As cores atribuídas às colônias foram através de comparações em um padrão de cores (PANTONE®). Após estas observações agruparam-se os isolado semelhantes.

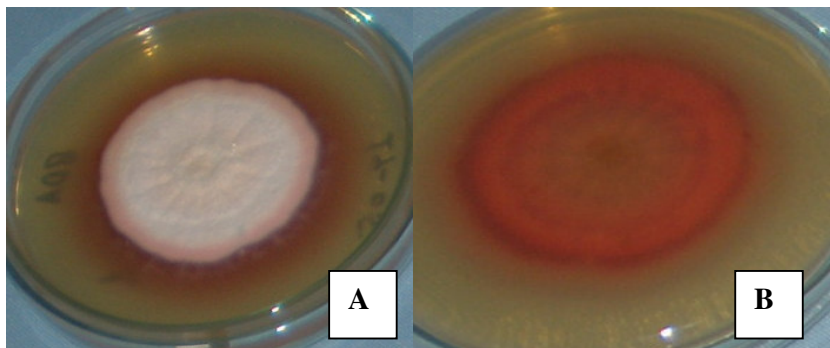


Figura 5 – Detalhe da colônia de *Cryptosporiopsis* spp. (A) e reverso da colônia (B), no meio de cultura BDA.

3.1.4 Observação dos conídios de cada um 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 6). 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.

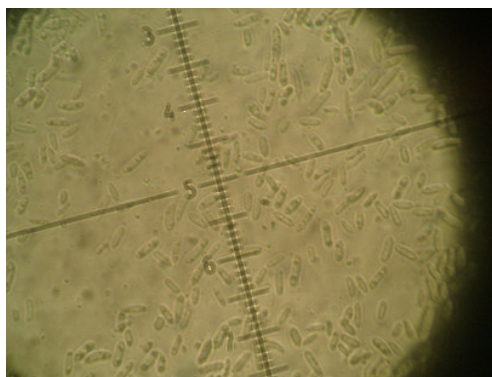


Figura 6 - Detalhe da régua micrométrica utilizada para a observação dos conídios de *Cryptosporiopsis* spp.

3.2 VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS EM RAMOS E FRUTOS DE MACIEIRA

3.2.1 Virulência em ramos de macieira

Discos de micélio de 10mm 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 (três 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 de manual, com o objetivo

de encontrar a fase sexuada do patógeno, já que esta nos auxiliaria na identificação de espécie dos isolados estudados.

3.2.2 Virulência em frutos de macieira

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, que são apresentados a seguir.

Inoculação dos frutos:

Experimento 1 – Inoculação de frutos com ferimentos. Retirou-se com o auxílio de um perfurador, um disco de 10mm de diâmetro de cada lado do fruto da cv. Fuji e Pink lady. Discos de micélio de 10mm 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.

Experimento 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 10mm 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 cinco repetições por isolado. Cada repetição foi constituída por um fruto inoculado em um lado.

3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS

Onze isolados foram avaliados quanto às suas atividades pectolítica, lipolítica, amilolítica, proteolítica, RNase e DNase, seguindo protocolos de Hankin & Anagnostakis, 1975. 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.

■ **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.

■ **Atividade lipolítica:** utilizou-se o meio contendo 10g de peptona, 5g de NaCl, 0,01g de CaCl₂, 20g de ágar, 1000ml de água destilada e pH ajustado para 6,0. O Tween-20 (1ml para cada 100ml 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.

■ **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.

■ **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 (10g/100ml água) sobre as colônias. A reação será positiva se houver a formação de zonas claras ao redor das colônias.

■ Atividade de RNase: o meio é formado por 5g de glicose, 5g de KH_2PO_4 , 2g de NaCl, 0,05g de FeSO_4 , 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15g de agar, 5g de caseína hidrolisada e 2mg/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.

■ Atividade de DNase: o meio é formado por 42g/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.

3.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA QUANTO À SUSCEPTIBILIDADE À TEMPERATURA

Discos de micélio de 10mm 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. Dados prévios tinham mostrado a ausência de crescimento dos isolados a 32°C (Comparin et al. não publicados). 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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

4.1.1 Crescimento micelial dos 11 isolados em três meios de cultura

Após as análises estatísticas, foram observadas diferenças significativas no crescimento micelial dos onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp. apenas em dois meios de cultura: BDA e V8 (Tabela 2). Brito (2006), estudando o crescimento micelial de *Curvularia eragrostidis* em diferentes meios de cultura relatou haver variação na velocidade do crescimento micelial em função do meio utilizado e das próprias características fisiológicas dos isolados. A composição do meio de cultura determina a quantidade e a qualidade do crescimento micelial e esporulação de fitopatógenos (CARNAÚBA et al., 2007).

Os resultados demonstram as diferenças existentes entre os dois grupos (Grupo I e Grupo II) e também a variabilidade encontrada entre os isolados de um mesmo grupo.

Os isolados 5, 9 e 11 (Grupo I) comportaram-se de forma semelhante no meio de cultura V8, reforçando assim a existência de dois grupos entre os isolados (Grupo I e Grupo II). Já no meio de cultura BDA, apenas os isolados 5 e 9 apresentaram características semelhantes, diferindo totalmente do isolado 11 o que demonstra a variabilidade existente entre os isolados de um mesmo grupo.

No meio de cultura BDA foi observado o maior tamanho de colônia para o isolado 11 e o menor tamanho para o isolado 2, isolados que pertencem ao grupo I e Grupo II respectivamente, resultado que reforça a variabilidade entre os isolados. O crescimento micelial médio (CMM) dos onze isolados em BDA variou de 29,35 mm a 48,16mm de diâmetro após 15 dias de incubação. Já na espécie *Cryptosporiopsis actinidiae*, que causa podridão em kiwi e em maçã na Nova Zelândia, o crescimento das culturas variou entre 45mm a 50mm de diâmetro após 14 dias de incubação (JOHNSTON et al., 2004). Isolados coletados a partir de ramos e frutos no RS e SC, apresentaram colônias de desenvolvimento lento, 2 a 3 cm após 10 dias de incubação em meio de cultura BDA a 22°C (MAFFIOLETTI, 2007).

Tabela 2 - Crescimento micelial médio (CMM) de onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp. (Cp1 a Cp11) em três meios de cultura (BDA, AEM e V8) após 15 dias de incubação a 22°C

Grupos	BDA		AEM		V8	
	Isolado	CMM ¹	Isolado	CMM	Isolado	CMM
I	Cp 5	30,99 D	Cp 5	28,88 A	Cp 5	32,29 AB
	Cp9	34,01 D	Cp 9	35,26 A	Cp 9	33,32 AB
	Cp 11	48,16 A	Cp 11	40,00 A	Cp 11	41,02 AB
II	Cp 1	31,91 D	Cp 1	46,30 A	Cp 1	27,73 AB
	Cp 2	29,35 D	Cp 2	33,46 A	Cp 2	23,50 B
	Cp 3	40,18 C	Cp 3	36,18 A	Cp 3	30,80 AB
	Cp 4	33,76 D	Cp 4	35,94 A	Cp 4	40,22 AB
	Cp 6	42,41 BC	Cp 6	46,51 A	Cp 6	43,8 A
	Cp 7	46,53 AB	Cp 7	47,49 A	Cp 7	41,36 AB
	Cp 8	40,88 C	Cp 8	42,66 A	Cp 8	37,43 AB
	Cp 10	30,09 D	Cp 10	33,89 A	Cp 10	28,44 AB
	CV	4,67		18,45		18,94

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

Trabalhos vêm sendo realizados com várias espécies fúngicas no intuito de verificar o comportamento destes em diferentes meios de cultura. Brito (2006) constatou que o meio IDA (folhas de inhame-dextrose-ágar) proporcionou as maiores médias de crescimento micelial de *Curvularia eragrostidis*, Poloni et al.,(2008) verificou que o meio Sabouraud maltose induziu o crescimento de *Bipolaris sorokiniana* e Abdanur, 2003 observou que os meios CA e V8 proporcionaram os maiores crescimentos das colônias de *Phytophthora* sp.

4.1.2 Caracterização morfológica dos isolados

Os onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp. apresentaram-se bastante heterogêneos quanto à coloração e aspecto das colônias em cada um dos três meios utilizados (Figura 7) (Tabela 3). Trabalhos feitos por Bogo et al (2008) mostraram que há variação na morfologia e coloração das colônias de *Cryptosporiopsis perennans* cultivadas nos meios de cultura BDA, AEM e V8. Resultados diferentes foram encontrados nos isolados avaliados neste trabalho (Cp1 a Cp11) no meio de cultura AEM, onde os mesmos apresentaram pouca variação com relação a coloração neste meio de cultura. A coloração do micélio das colônias variou de cinza-esverdeado a levemente rosado. Variação na coloração das colônias também foi observada em isolados de *Cryptosporiopsis actinidia*. No meio de cultura BDA, esta espécie

apresentou colônias com cores entre vermelho alaranjado intenso a marrom alaranjado, semelhante aos isolados Cp6 e Cp9 que no meio de cultura BDA apresentaram o reverso vermelho alaranjado (JOHNSTON et al., 2004). Vários estudos relatam a grande variabilidade na coloração do micélio de fitopatógenos dependendo do meio de cultura utilizado (POLONI et al., 2008; ANDRADE et al., 2007; BOGO et al., 2008; CASTRO, 2007).

Aparecido et al., (2008) conseguiu separar isolados do gênero *Cylindrocladium* em três grupos distintos com base nas características culturais (cor e aspecto da cultura) desses isolados. Sete grupos distintos foram formados por Andrade et al., (2007) ao estudar isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* crescidos em meio de cultura BDA. Nos resultados obtidos observações e descrições das culturas nos três meios foram realizadas, e baseando-se nas culturas cultivadas no meio batata-dextrose-ágar (BDA) foi possível agrupar os isolados em três grupos distintos (Tabela 4). No Grupo A, caracterizado pela presença de margens variando entre rosa forte a vermelho e sem definição de centro, foram reunidos três isolados (Cp1, Cp5 e Cp11). Quatro isolados (Cp2, Cp3, Cp4 e Cp7), caracterizados por ausência de borda e ausência de centro, foram classificados no Grupo B, e no Grupo C, caracterizados pela definição de centro em tons de cinza e branco, foram incluídos o restante dos isolados (Cp6, Cp8, Cp9 e Cp10) (Figura 8).

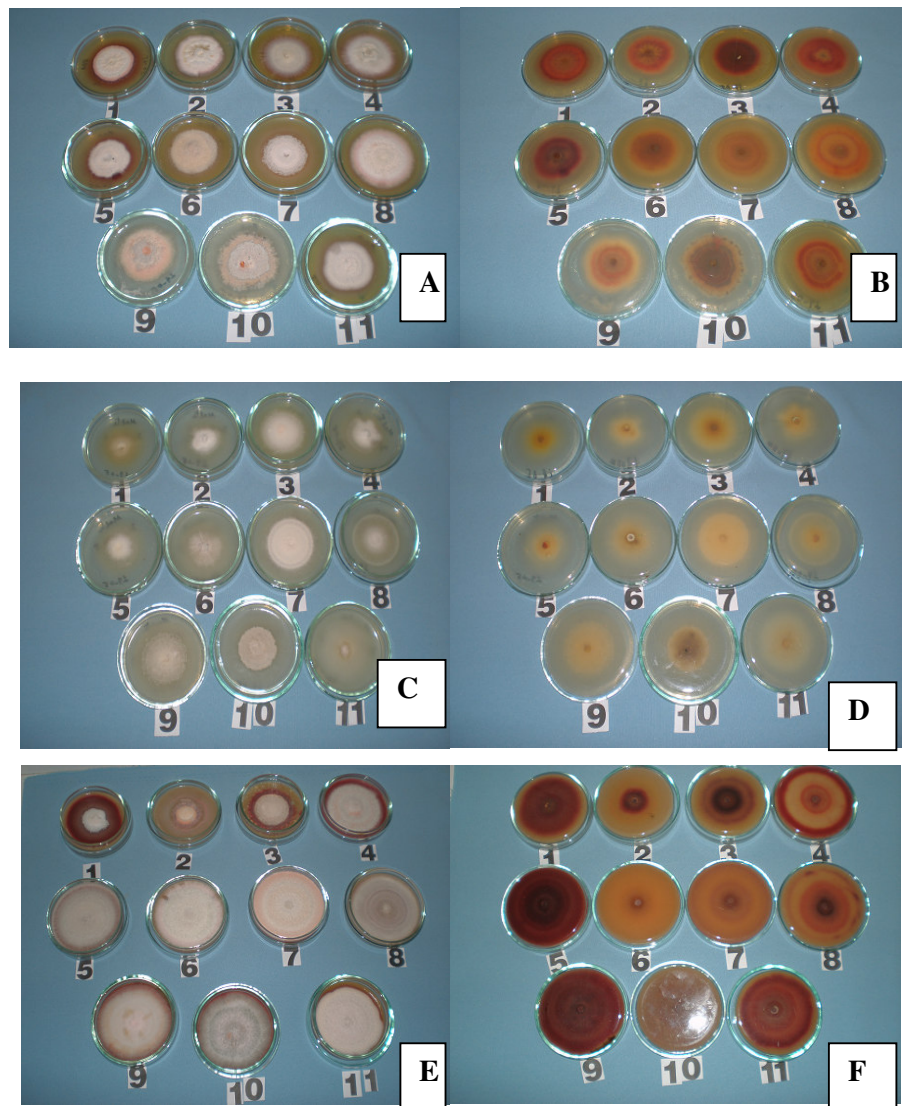


Figura 7 - Coloração e morfologia das colônias de *Cryptosporiopsis* spp. no meio de cultura BDA (A), reverso BDA (B), meio de cultura AEM (C), reverso AEM (D), meio de cultura V8 (E) e reverso (F).

Tabela 3 - Variabilidade de onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp. (Cp1 a Cp11) em três diferentes meios de cultura (BDA, AEM e V8) após 15 dias de incubação a 22°C

Isolado	Meio de cultura	Cor da colônia	Borda	Reverso
Cp1	BDA	Rosa claro com centro branco	Rosa	Vermelho
	AEM	Branca	Ausente	Amarelo
	V8	Rosa claro com centro branco	Rosa escuro	Vermelho escuro
Cp2	BDA	Rosa claro com centro branco	Ausente	Vermelho com bordas brancas
	AEM	Branca	Ausente	Amarelo
	V8	Branca com centro amarelo	Rosa forte	Vermelho escuro
Cp3	BDA	Rosa claro com centro grande e branco	Ausente	Vermelho com bordas brancas
	AEM	Branca	Ausente	Amarelo
	V8	Rosa	Ausente	Vermelho escuro
Cp4	BDA	Rosa claro com centro grande e branco	Branca	Vermelho com bordas brancas
	AEM	Branca	Ausente	Amarelo
	V8	Branca com centro rosa	Rosa escuro	Rosa escuro
Cp5	BDA	Rosa claro com centro branco	Rosa	Vermelho com pequenas bordas brancas
	AEM	Branca	Ausente	Amarelo
	V8	Rosa	Rosa escuro	Vermelho escuro
Cp6	BDA	Rosa e cinza	Ausente	Laranja e vermelho com bordas amarelas
	AEM	Branca com centro cinza	Ausente	Amarelo
	V8	Branca	Rosa claro	Rosa escuro
Cp7	BDA	Rosa claro com centro grande e branco	Branca	Vermelho com bordas brancas
	AEM	Branca	Ausente	Amarelo
	V8	Branca	Rosa	Rosa escuro
Cp8	BDA	Rosa claro com centro cinza	Ausente	Vermelho
	AEM	Branca	Ausente	Amarelo
	V8	Rosa com centro branco	Rosa escuro	Vermelho
Cp9	BDA	Rosa claro e cinza com centro cinza	Ausente	Vermelho alaranjado
	AEM	Branca	Ausente	Amarelo
	V8	Rosa claro	Ausente	Vermelho
Cp10	BDA	Rosa claro com centro cinza	Branca	Vermelho
	AEM	Branca com centro cinza	Ausente	Amarelo
	V8	Branca com centro cinza	Rosa claro	Vermelho
Cp11	BDA	Rosa claro com centro branco	Rosa	Vermelho
	AEM	Branca com centro cinza	Ausente	Amarelo
	V8	Branca e cinza	Rosa claro	Vermelho

Tabela 4 - Características dos isolados de *Cryptosporiopsis* spp., agrupados em três grupos distintos conforme características apresentadas no meio de cultura BDA, após 15 dias de incubação a 22°C

Grupo	Cor da colônia	Borda	Reverso	Micélio aéreo
A	Tons de rosa e branco, com centro branco	Rosa	Vermelho	Presente, mas reduzido
B	Rosa, com centro grande branco	Sem definição de borda	Vermelho com bordas claras	Presente
				Presente
C	Tons de rosa e cinza, com centro cinza	Sem definição de borda	Tons variando entre vermelho e laranja	

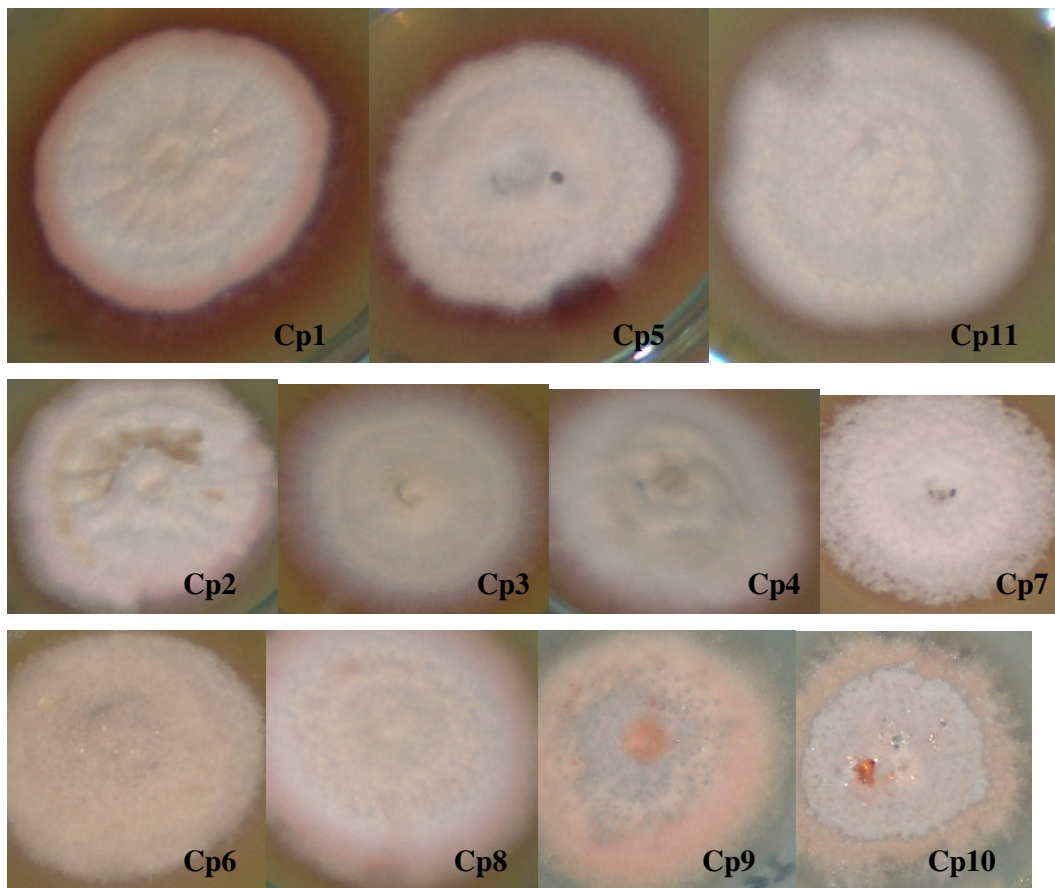


Figura 8 - Formação de grupos entre os onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp., Grupo A (Cp1, Cp5 e Cp11), Grupo B (Cp2, Cp3, Cp4 e Cp7) e Grupo C (Cp6, Cp8, Cp9 e Cp10).

Nos dois grupos caracterizados pela análise molecular, Grupo I (Cp5, Cp9 e Cp11) e Grupo II (Cp1, Cp2, Cp3, Cp4, Cp6, Cp7, Cp8 e Cp10), se observaram isolados com diferente morfologia das colônias no meio de cultura BDA. Os isolados Cp5 e Cp11, pertencentes ao Grupo I, mostraram características similares e fizeram parte de um mesmo grupo (Grupo A), porém neste mesmo grupo encontra-se o isolado Cp1, o qual faz pertence ao Grupo II. Esta característica demonstra novamente a variabilidade existente entre os onze isolados e entre os isolados pertencentes a um mesmo grupo de acordo com a análise da região ITS-rDNA.

4.1.3 Observação dos conídios de cada um dos isolados no meio de cultura BDA

Entre os 11 isolados de *Cryptosporiopsis* spp., foram observados quatro formatos de conídios (FEITOSA et al., 1977 modificado): cilíndrico curto, cilíndrico, cilíndrico à levemente

fusiforme e cilíndrico à fusiforme (Tabela 5). Destes, 6 apresentaram formato cilíndrico à fusiforme, 3 apresentaram formato cilíndrico à levemente fusiforme, 1 apresentou formato cilíndrico e 1 cilíndrico curto. Nos estudos da forma de conídios de outras espécies de patógeno tem sido observada pouca variabilidade. Nechet (2002), estudando isolados de *Colletotrichum* sp obtidos de cafeeiro encontrou apenas conídios do tipo cilíndrico curto e cilíndrico. Já Andrade et al., (2007) estudando isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro observou conídios do tipo cilíndrico, obcláveo e elipsóide. Apenas conídios no formato cilíndrico foram observados por Aparecido et al., (2007) ao estudar isolados do gênero *Cylindrocladium*.

Entre os isolados estudados (Cp1 a Cp11), encontrou-se macroconídios e microconídios. Os macroconídios apresentaram dimensões que variaram de 12,5 – 25 x 5 – 8 μ e os microconídios com dimensões variando de 2,5 – 10 x 1,5 – 2,5 μ (Figura 9). Melo (1995) estudando isolados de *Trichoderma harzianum* encontrou variações no tamanho dos conídios entre 2,53 a 4,23 μ . Isolados de *Bipolaris sorokiniana* com conídios desenvolvidos em meio de cultura apresentando valores médios de comprimento de 76,6 μ e largura de 22,78 μ foram verificados por Toledo et al., (2004).

Todos os isolados estudados apresentaram formação de macroconídios e microconídios. Bogo et al (2008) mostrou que colônias de *Cryptosporiopsis perennans* produziram macroconídios curvos, hialinos, unicelulares, com extremidades arredondadas à levemente pontiagudo e com dimensões variando de 4-7 x 15-30 μ , e microconídios cilíndricos, retos e alguns levemente curvados nas pontas, com ápice arredondado e dimensões variando de 1-2 x 5-8 μ .

Estudos feitos por Kienholz (1939) e posteriormente por Dugan *et al.* (1993) compararam a morfologia dos conídios dos isolados de *C. perennans* e *C. curvispora*. Os macroconídios produzidos em meio de cultura BDA pela espécie *C. curvispora* apresentaram-se altamente curvados, diferindo da espécie *C. perennans*. No meio de cultura V8-aveia, os conídios de *C. perennans* e *C. curvispora* produzidos diferiram significativamente sendo que os de *C. curvispora* apresentaram largura média de 1,9 μ , enquanto os conídios de *C. perennans* mediram 1,6 μ .

Dos isolados que pertencem ao Grupo I (Cp5, Cp9 e Cp11), o Cp9 e o Cp11 apresentaram conídios semelhantes (cilíndrico à fusiforme) e o isolado Cp5 apresentou conídios cilíndricos à levemente fusiforme. Já no Grupo II houve maior variabilidade quanto a forma dos conídios.

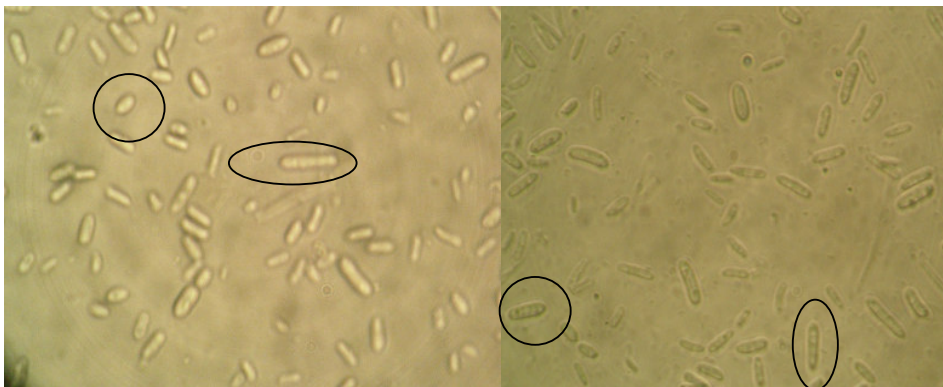


Figura 9 - Variação no comprimento e largura dos conídios de *Cryptosporiopsis* spp.

Tabela 5 - Diâmetro médio dos conídios de onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp., cultivados em meio de cultura BDA, após 15 dias de incubação a 22°C

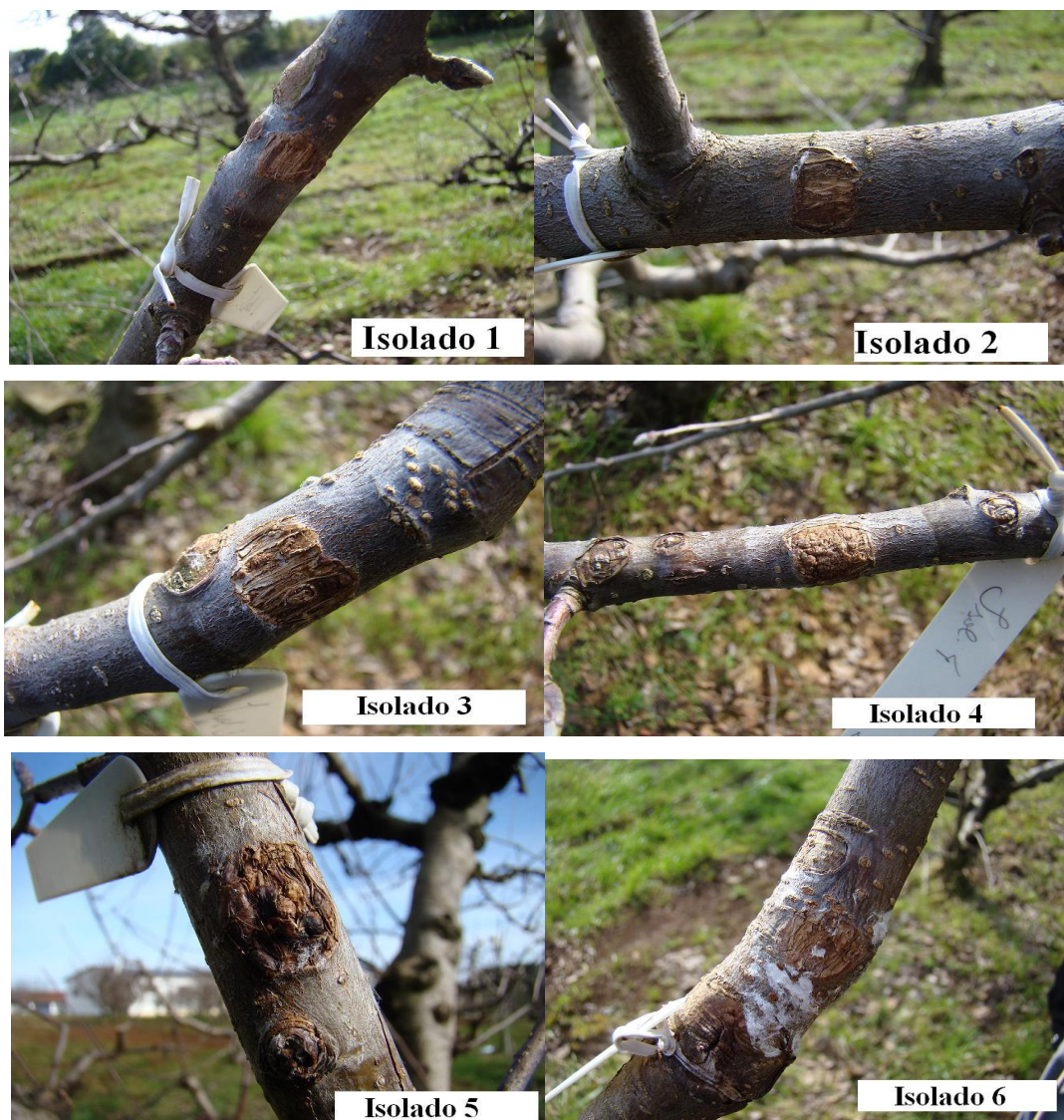
Diâmetro médio dos conídios				
Grupos	Isolado	Comprimento	Largura	C/L
I	Cp5	12 BCD	3,2 BC	3.75 Clf
	Cp9	14,5 A	3,3 BC	4.39 Cf
	Cp11	11,2 CD	2,8 BC	4.00 Cf
	Cp1	11,1 CD	3,2 BC	3.46 C
	Cp2	13,6 AB	4,6 A	2.95 Cc
	Cp3	11,7 BCD	2,7 BC	4.33 Cf
	Cp4	12,3 BC	3 BC	4.10 Cf
	Cp6	12,3 ABC	3,4 B	3.61 Clf
	Cp7	11,6 BCD	2,9 BC	4.00 Cf
	Cp8	13,9 AB	3,1 BC	4.48 Cf
	II	Cp10	9,8 D	2,6 C

4.2 VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS EM RAMOS E FRUTOS DE MACIEIRA

4.2.1 Virulência em ramos de macieira

Os onze isolados formaram cancos (Figura 10), após 27 dias, porém o apotécio do patógeno não foi observado em nenhum dos isolados. Em outubro de 1956, o apotécio pertencente à *Pezizula malicorticis* foi encontrado em macieiras no Leste da Holanda, estas

havam 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.A., 1956).



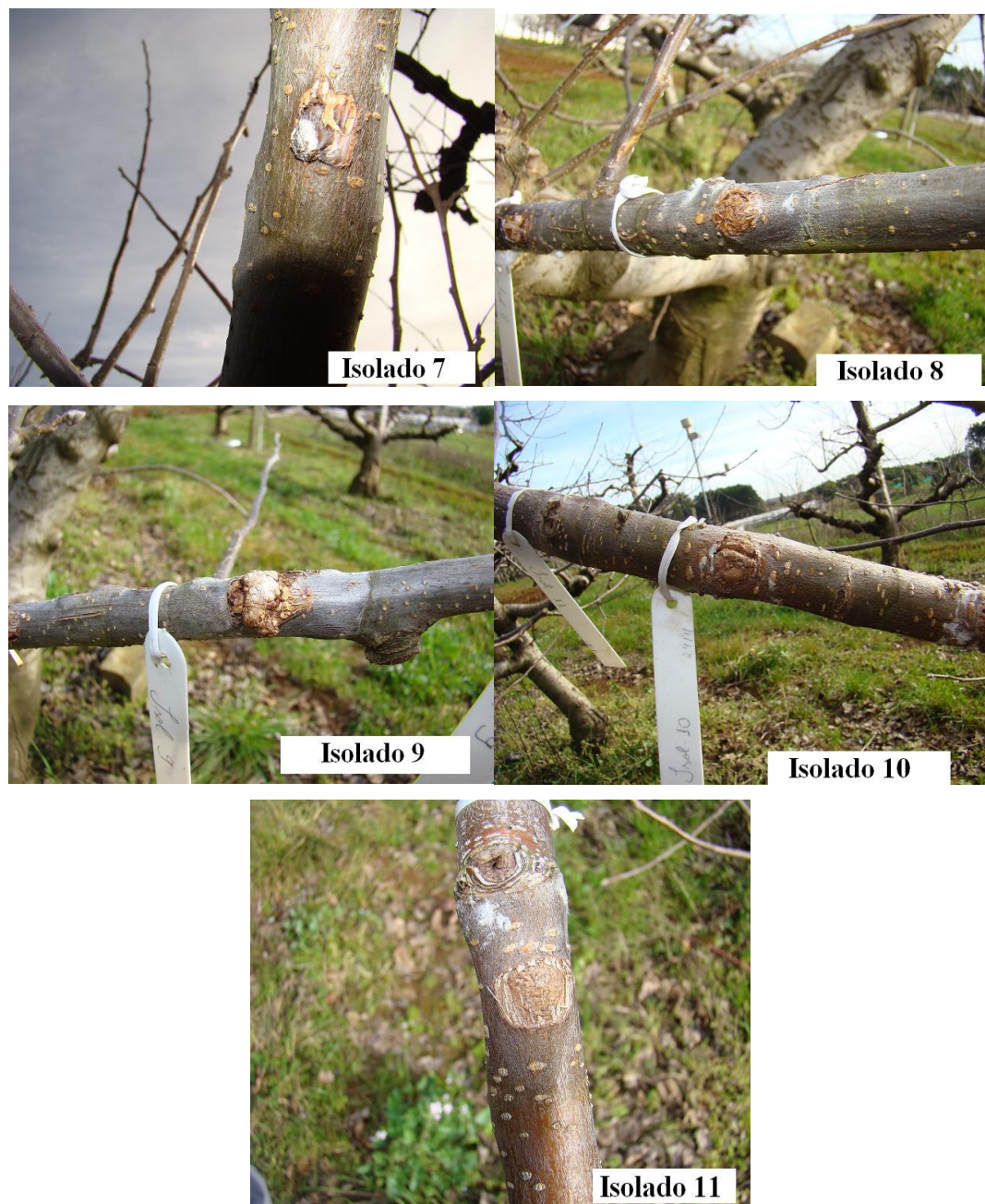


Figura 10 - Formação de cancos em ramos de macieiras inoculados com isolados de *Cryptosporiopsis* spp.

4.2.2 Virulência em frutos de macieira

O teste de virulência revelou a suscetibilidade das maçãs cv. Fuji e cv. Pink Lady aos onze isolados (Cp1 a Cp11) de *Cryptosporiopsis* spp., independente da indução de ferimento ou não. Sanhueza et al (2006), já havia demonstrado não haver diferença na suscetibilidade das cultivares Fuji e Pink Lady a nove isolados (Cp1 a Cp9) de *Cryptosporiopsis* spp.

Resultados similares foram encontrados por Castro (2007) onde todos os isolados de *Rhizoctonia solani* estudados mostraram-se patogênicos ao citrus independente da indução ou não de ferimento. Vários autores relatam trabalhos onde experimentos mostram a patogenicidade de todos os isolados testados (CASTRO, 2007; ANDRADE et al., 2007; NECHET, 2002).

Quinze dias após a inoculação já havia sintomas característicos da podridão “olho-de-boi” nas frutas das duas cultivares testadas (Figura 11). Todos os isolados apresentam a podridão morfológicamente 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 Sanhueza et al., (2006). Nos experimentos onde se fez ferimentos, o isolado Cp9 foi o que apresentou maior patogenicidade nas cultivares Pink Lady e Fuji (Tabela 6). Já no experimento sem ferimento, feito apenas com a cultivar Pink Lady, não houve diferença estatística significativa entre os isolados (Tabela 7).

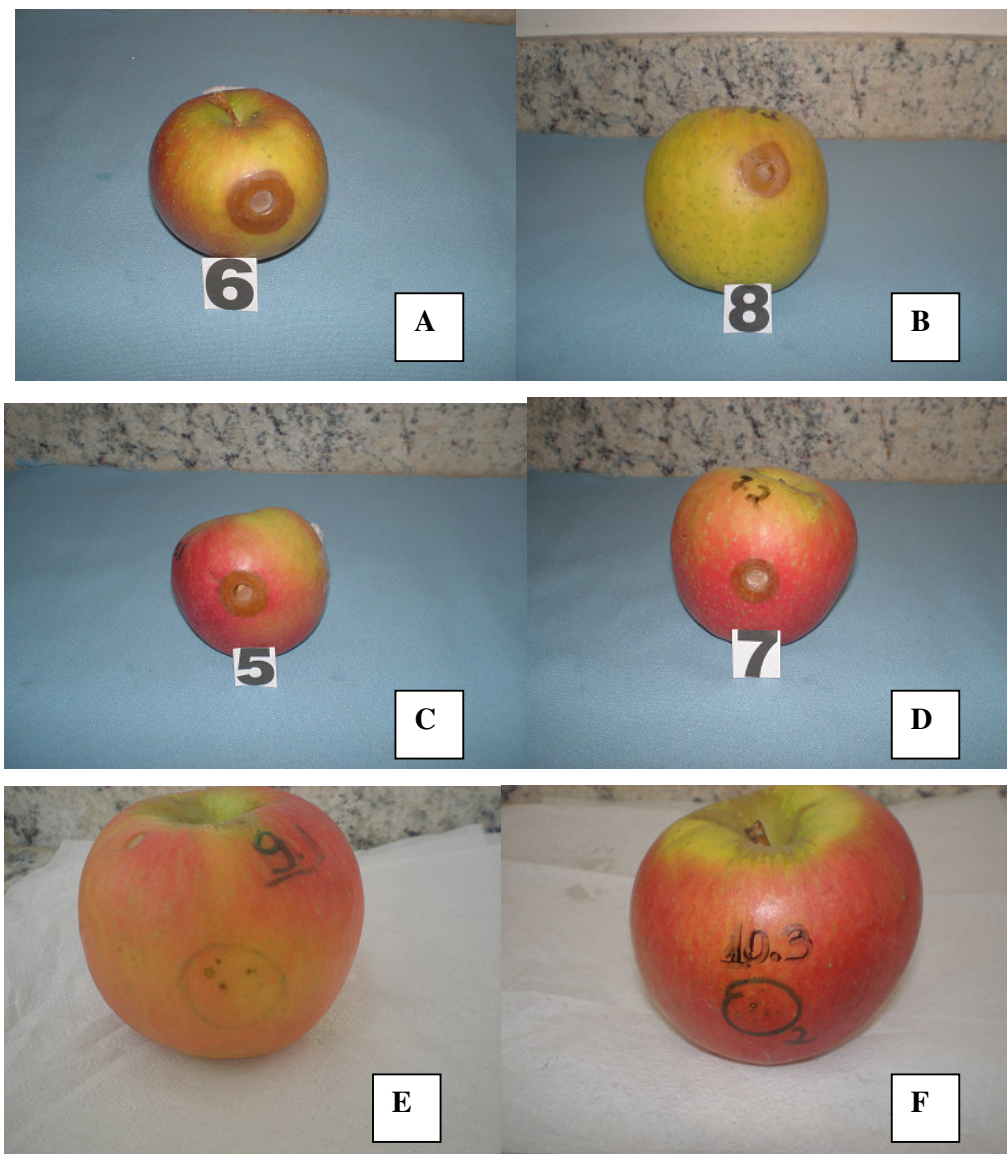


Figura 11 - Sintomas característicos da podridão “olho-de-boi” nas frutas inoculadas cv Fuji com ferimento (A e B) cv Pink Lady com ferimento (C e D) e cv Pink Lady sem ferimento (E e F).

Tabela 6 - Virulência de isolados de *Cryptosporiopsis* spp. em frutos com fermento cv Pink Lady e Fuji, mantidos a 22°C

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

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

Tabela 7 - Virulência de isolados de *Cryptosporiopsis* spp. em frutos sem fermento cv Pink Lady, mantidos a 22°C

Grupos	Isolado	lesões/lenticela¹
I	Cp 5	4,00 a
	Cp 9	5,00 a
	Cp 11	3,33 a
II	Cp 1	1,00 a
	Cp 2	3,66 a
	Cp 3	3,00 a
	Cp 4	2,00 a
	Cp 6	4,00 a
	Cp 7	3,33 a
	Cp 8	3,66 a
	Cp 10	2,66 a
	CV	48,01

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

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS

Os onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp. mostraram capacidade de produzir as enzimas amilolítica, RNase, lipolítica e pectolítica pH5 (Figura 12). Resultados semelhantes

foram encontrados por Bastos (2004) que estudando isolados de *Crinipellis pernicioso* observou que todos apresentaram atividade lipolítica e Lima-Filho et al (2003) que testou isolados de *Colletotrichum* spp e estes mostraram capacidade de produzir enzimas amilolíticas e lipolíticas.. Já Belmonte (2009) demonstrou que a enzima lípase não reagiu para nenhum dos isolados de *Curtobacterium* sp avaliados.

Houve diferenciação dos isolados na produção das enzimas proteolítica, DNase e pectolítica pH7 (Figura 12) (Tabela 8).

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 apud LIMA-FILHO et al, 2003). É possível, que a atividade das enzimas lípase, 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).

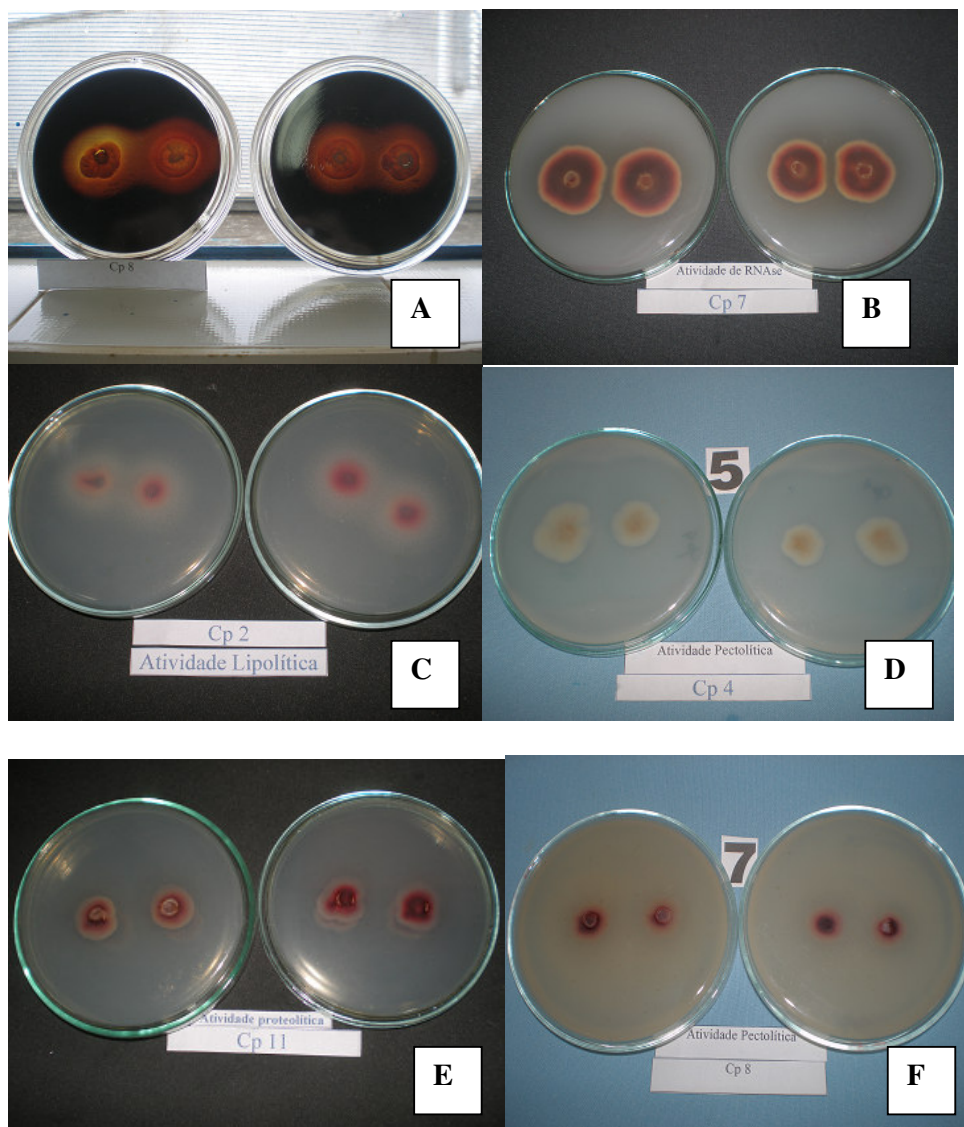


Figura 12 - Produção de enzimas por *Cryptosporiopsis* spp., amilolítica (A), Rnase (B), Lipolítica (C), Pectolítica pH5 (D), Proteolítica (E) e Pectolítica pH7 (F).

Pelos resultados obtidos, sugere-se que *Cryptosporiopsis* spp. 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 8 – Caracterização enzimática de onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp., após 15 dias de incubação a 22°C

Grupos	Isolado	Meio enzimático					Pecto	Pecto
		Proteolítica	Amilolítica	DNase	RNase	Lipolítica	pH 5	pH 7
I	Cp 5	negativa	Positiva	Negativa	positiva	Positiva	Positiva	Positiva
	Cp 9	negativa	Positiva	Positiva	positiva	Positiva	Positiva	Negativa
	Cp 11	positiva	Positiva	Positiva	positiva	Positiva	Positiva	Positiva
	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 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
	II	Cp 10	negativa	Positiva	Negativa	positiva	Positiva	Positiva

Não foi possível diferenciar os isolados conforme os dois grupos (Grupo I e GrupoII) de acordo com as características obtidas pelas atividades enzimáticas.

A capacidade dos fungos em produzir enzimas, além de ser importante no processo biológico, também é igualmente importante na diferenciação entre espécies mais, menos ou não produtoras de enzimas quando cultivados em substratos adequados à indução da atividade enzimática, servindo como critério auxiliar nos estudos taxonômicos (COUTO, 2002 apud BRITO, 2006, p. 27).

A análise da produção enzimática de fungos em meio sólido proposta por Hankin & 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).

4.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA QUANTO A SUSCEPTIBILIDADE A TEMPERATURAS

Os onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp. comportaram-se de maneira diferente em cada uma das temperaturas analisadas. Resultados opostos foram encontrados por Abdanur et al., (2003) que ao estudar isolados de *Phytophthora* sp em diferentes temperaturas observou

que os mesmos apresentavam pequenas variações na taxa de crescimento em cada temperatura testada.

Nas cinco temperaturas analisadas (3°C, 4°C, 5°C, 30° e 31°), apenas na temperatura de 3°C não houve crescimento micelial de nenhum isolado em nenhuma das avaliações (5, 15 e 21 dias). Isolados de *Phytophthora* sp avaliados por Abdanur et al., (2003) não cresceram a 8°C nem a 36°C.

O efeito da temperatura a 5°C foi a variável que mais contribuiu para diferenciar os isolados entre si nos grupos (Grupo I e Grupo II) (Tabela 9).

A temperatura de 30°C foi a variável que mais contribuiu para diferenciar o isolado Cp5 dos demais, e na temperatura de 31°C, os isolados Cp9 e Cp11 (Grupo I) se comportaram de maneira similar.

Tabela 9 -Crescimento micelial médio (CMM) de onze isolados de *Cryptosporiopsis* spp. a diferentes temperaturas – 21 dias após a incubação.

Grupos	Isolado	CMM 4°C¹	Isolado	CMM 5°C¹	Isolado	CMM 30°C¹	Isolado	CMM 31°C¹
I	5	11,81 F	5	14,72 FG	5	12,47 I	5	12,45 E
	9	14,00 CDE	9	12,27 G	9	16,79 EF	9	14,92 C
	11	13,84DE	11	15,15 F	11	16,62 F	11	15,40 C
II	1	14,50 CD	1	0 I	1	15,37 G	1	12,52 E
	2	12,55 EF	2	16,72 E	2	17,23 EF	2	15,39 C
	3	15,62 BC	3	19,84 C	3	17,76 DE	3	13,81 D
	4	15,66 BC	4	19,77 C	4	18,51 CD	4	15,44 C
	6	18,33 A	6	22,59 A	6	24,93 B	6	22,97 A
	7	16,65 AB	7	21,43 B	7	26,27 A	7	18,64 B
	8	17,22 AB	8	18,85 D	8	19,02 C	8	18,77 B
	10	13,73 DE	10	13,17 H	10	14,18 H	10	13,30 DE
	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%

O crescimento micelial de isolados de *Cryptosporiopsis* spp. foi influenciado pela temperatura e em meio de cultura o crescimento ocorreu nas temperaturas entre 4°C e 31°C. Pulz (2007) relatou que a melhor temperatura observada para o crescimento de isolados de *Alternaria dauci* e *A.solani*, independente do meio de cultura, é em torno de 25°C.

CONCLUSÃO

Existe uma grande variabilidade entre os isolados e entre os grupos de *Cryptosporiopsis* spp. estudados.

Os isolados Cp8 e Cp5, considerados padrões do grupo I e II, respectivamente, são diferentes entre si e diferentes dos outros isolados quando consideradas as técnicas moleculares realizadas com estes isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDANUR, A.; SANTOS, A.F.; TRATCH, R. **Crescimento micelial e esporulação de isolados de *Phytophthora* sp patogênicos à acácia-negra.** Bol. Pesq. Fl., Colombo, n.47, p. 33-42, jul./dez. 2003.

ANDRADE, E.M., et al. **Caracterização morfofocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro.** Fitopatologia 32: 21-31. 2007.

APARECIDO, C.C.; FURTADO, E.L.; FIGUEIREDO, M.B. **Caracterização morfofisiológica de isolados do gênero *Cylindrocladium*.** Summa Phytopathol., Botucatu, v.34, n.1, p.38-47, 2008.

BASTOS, C.N. **Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis perniciosa*.** Fitopatologia Brasileira 30: 286-288. 2005.

BELMONTE, V.C.F. **Variabilidade genética de isolados de *Curtobacterium* sp. associados a citros.** 2009. 67p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BENDER, J.R. Botânica e Fisiologia In: **Manual da Cultura da Macieira.** Florianópolis: EPAGRI, 1986. Cap 2, p. 26-47.

BOCCHESI, C.A.C., et al. **Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia.** Fitopatologia Brasileira 28: 011-016. 2003

BOGO, A., et al. **Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meios de cultura.** Tropical Plant Pathology, v. 33, n. 3, p. 248-251, 2008.

BOLAY, A. **Observation en Hollande de la forme parfaite du champignon *Gloeosporium peennans* Zeller et Childs.** T. Pl. Ziekten. v. 62. p. 322-324. 1956.

BRITO, N.M. **Estudo da fisiologia e variabilidade genética de *Curvularia eragrostidis* na cultura do inhame.** 2006. 93p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Areia, 2006.

BLEICHER, J. História da macieira. In: **A cultura da Macieira.** Florianópolis: EPAGRI, 2002, p. 29-36.

BLUM, L.E.B.; et al. ***Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridão em maçãs.** Fitopatol. Bras. V. 29, n.4, Brasília July/Aug. 2004.

CARNAUBA, J.P., et al. **Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*.** Summa phytopathol. v.33. n.2, Botucatu Apr/June 2007.

CASTRO, C.V.B. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* Kunh.** 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Amazônia, Belém, 2007.

DUGAN, F.M.; GROVE G.G.; ROGERS, J.D. **Comparative studies of *Cryptosporiopsis curvispora* and *Cryptosporiopsis perennans*.** Morphology and pathogenic behavior. Mycologia, v. 85, n. 4, p. 551-564, 1993.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Frutas do Brasil: Maçã - Produção.** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, n. 39, p. 35-45. 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. pp 220**

GARIEPY, T.D., et al. ***Neofabraea* species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest.** Plant Pathol. 27: 118-124. 2005.

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

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. **The use of solid media for detection of enzyme production by fungi.** Mycologia 61: 597-607. 1975.

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, v. 88, n. 10, p.1134 – 1138. 2004.

HENRIQUEZ, J.L., SUGAR, D., SPOTTS, R.A. **Induction of Cankers on Pear Tree Branches by *Neofabraea alba* and *N. Perennans*, and Fungicide Efeccts on Conidial Production on Cankers.** Plant Disease, v. 90, n. 4, p. 481-486. 2005.

ICEPA. **Maçã. Panorama Mundial.** Disponível em: <http://www.cepa.epagri.sc.gov.br>
Acesso em: 10 maio 2009.

IUCHI, V.L. Botânica e Fisiologia. In: **A cultura da Macieira.** Florianópolis: EPAGRI, 2002. Cap. 3, p. 59-104.

JOHNSTON, P.R., et al. ***Cryptosporiopsis actinidiae* sp. nov.** Micotaxon, v. 89, p. 131-136, 2004.

JONG, S.N. **The development of specific, non-discriminating PCR primers for the detection of *Pezicula malicorticis* and *P. Perennans*, agents of anthracnose canker, perennial canker, and bull's-eye rot of apple.** 1998. 163p. Dissertação (Mestrado) – Universitu of Guelph, Canadá, 1998.

KIENHOLZ, J.R. **Comparative study of the apple anthracnose and perennial canker fungi.** Journal of Agricultural Research, v. 59, n.9, p. 635-663, 1939.

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 28: 620-625. 2003.

MAFFIOLETTI, M.A. **Características morfológicas e fisiológicas de *Cryptosporiopsis perennans* agente causador da podridão “olho-de-boi” em maçãs.** 2007. 59p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina/UEDESC-CAV, Lages, 2007.

MELO, I.S.; PERES, E. **Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I- Aspectos citológicos.** Sc. agric., Piracicaba, 52(1): 56-59, jan./abr. 1995.

MELLO, L.M.R. **Produção e mercado da maçã brasileira – Panorama 2005.** Circular Técnica . Bento Golçalves:EMBRAPA, n. 64, 2006.

MELLO, L.M.R. **Avaliação de impactos econômicos, de tecnologias geradas pela Embrapa Uva e Vinho – 2005**. Documentos 58. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2006.

NECHET, K.L.; ABREU, M.S. **Caracterização morfológica e testes de patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de cafeeiro**. Cienc. Agrotec., Lavras. v.26, n.6, p.1135-1142, nov./dez., 2002.

PETRI, J.L.; LEITE, G.B. **Macieira**. Revista Brasileira de Fruticultura v.30, n 4 875-1166, 2008.

POLONI, A., et al. **Análise da variabilidade morfológica e taxa de crescimento de culturas policloniais e monoclônicas de *Bipolaris sorokiniana***. Biociências, Porto Alegre, v.16. n.1, p. 52-63, janeiro, 2008.

PULZ, P. **Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura**. 2007. 68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

SANHUEZA, R.M.V. **Podridão de frutos e cancos dos ramos causados por *Cryptosporiopsis perennans* nas macieiras**. Circular Técnica. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2001. n. 29.

SANHUEZA, R.M.V., et al. **Características e controle da podridão “olho de boi” nas maçãs do Sul do Brasil**. Circular Técnica. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2006. n. 66.

SANHUEZA, R.M.V. **Eliminação das fontes de inóculo durante e após a colheita para prevenir a ocorrência de perdas no pomar**. Agapomi, Vacaria, ed. 179, abril 2009. Disponível em: <<http://www.agapomi.com.br/htm>> Acesso em 10 maio 2009.

SARTORI, V.C., et al. **Avaliação do potencial antagônico do fungo *Tremella* sp. frente a diferentes fitopatógenos da macieira**. Rev. Bras. Agroecologia, v.2, n.1, fev.2007.

TOLEDO, J.; REIS, E.M.; FORCELINI, C.A. **Efeito do substrato na morfologia de conídios de *Bipolaris sorokiniana* e da densidade de inóculo na intensidade da mancha marrom em cevada**. Fitopatol. bras. 29 (1), jan-fev 2004.

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