

MARTA ALEXANDRA MAFFIOLETTI

**CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE
Cryptosporiopsis perennans, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO “OLHO-
DE-BOI” EM MAÇÃ**

LAGES, SC

2007

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

MARTA ALEXANDRA MAFFIOLETTI

**CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE
Cryptosporiopsis perennans, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO
“OLHO-DE-BOI” EM MAÇÃS**

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

Orientador: PhD. Amauri Bogo
Co-Orientadora: Dra Rosa Maria V. Sanhueza

LAGES, SC

2007

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Maffioletti, Marta Alexandra

Características morfológicas de *Cryptosporiopsis perennans*, agente causal da podridão “olho-de-boi” em maçã / Marta Alexandra Maffioletti – Lages, 2007.

59 p.

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

1. Maçã. 2. Maçã – Doenças e pragas. 3. Fungos - Controle.
4. Fungos – Culturas e meios de cultura. I. Título.

CDD – 634.11

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE *Cryptosporiopsis perennans*, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO “OLHO-DE-BOI” EM MAÇÃS

MARTA ALEXANDRA MAFFIOLETTI

Bióloga

Aprovado em:

Pela banca examinadora:

Homologado em:

Por

PhD. Amauri Bogo
Orientador – UDESC/Lages-SC

Dr. Ricardo Trezzi Casa
Coordenador Técnico do Curso de Mestrado em
Produção Vegetal

Dra. Rosa Maria V. Sanhueza
Embrapa Uva e Vinho
Bento Gonçalves/RS

Dr. Osmar Klauberg Filho
Coordenador do Programa de Mestrado em
Agronomia

Dr. Ricardo Trezzi Casa
UDESC/Lages-SC

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

Dra. Andréia Hansen Oster
Embrapa Agroindustria Tropical /Ceará

LAGES
Santa Catarina - Brasil
Março - 2007

AGRADECIMENTOS

Não, não é simplesmente agradecer que quero. Quero trazer para dentro do meu texto aqueles que já o percorrem nas entrelinhas. E não só aos que me ajudaram efetivamente na construção dessa Dissertação, mas a todos que partilharam comigo minhas aflições, ouviram minhas lamentações, e me deram força e coragem para chegar até o fim. Àqueles que me ajudaram, de alguma forma, no meu percurso nesses dois anos.

Meu maior agradecimento é dirigido aos meus pais, pelo contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Aos meus irmãos Elcio, Laércio e Luciane pelo amor e encorajamento que me deram.

Ao meu esposo Alexandre, meu companheiro nesta trajetória, que soube compreender, como ninguém, a fase pela qual eu estava passando. Durante a realização deste trabalho, sempre tentou entender minhas dificuldades e minhas ausências. Agradeço-lhe, carinhosamente.

A professora e amiga Dra Andréia Hansen Oster que foi quem possibilitou o início de toda essa conquista, agradeço. *Guarde em seu coração minha amizade, meu carinho e toda felicidade que você merece...*

A Universidade do Estado de Santa Catarina, através do curso de Mestrado em Produção Vegetal, pela oportunidade concedida.

A Dra Rosa pelas oportunidades, ensinamentos e disponibilidade revelada ao longo deste trabalho, quero agradecer.

Ao professor PhD Amauri Bogo pela orientação.

A PhD Miryan Coracini por toda a ajuda, dedicação, e acima de tudo, pela grande amizade, palavras não bastam para agradecer.

Aos professores que sempre se empenharam em transmitir seus conhecimentos e pela prontidão. Em especial a professora Mari Lucia Campos e aos professores Ricardo Trezzi Casa e Jéferson Meireles Coimbra, expresso meu respeito e admiração.

Enfim, a todos os colegas e amigos de curso, cujas presenças, palavras e silêncios rascunharam seus nomes em minha vida.

*A ÁGUA DE UM RIO ADAPTA-SE AO CAMINHO QUE É POSSÍVEL,
SEM ESQUECER DO SEU OBJETIVO: O MAR... FRÁGIL EM SUA
NASCENTE, AOS POCOS VAI GANHANDO A FORÇA DOS OUTROS
RIOS QUE ENCONTRA...*

Paulo Coelho

*Aos meus pais Laurindo e Elza e ao meu esposo Alexandre,
meus grandes amigos, companheiros e incentivadores, sem os quais este
trabalho não teria sido realizado...*

OFEREÇO!

RESUMO

A cultura da macieira tem grande importância sócio-econômica para a região sul do Brasil tendo atingido no ciclo 2003/04 aproximadamente 970.000 toneladas. Nos ciclos vegetativos de 1995 e 1996, um sintoma diferente daqueles relatados até então no Brasil em frutos e ramos da macieira foi constatado em pomares do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Após o estudo de sua etiologia, identificou-se a ocorrência do fungo *Cryptosporiopsis perennans*. Este patógeno pode causar podridões ao redor de 15% das maçãs no armazenamento e, no presente, há poucos estudos que contribuem ao conhecimento do patógeno ou à epidemiologia da doença. Este trabalho visou estudar o crescimento micelial e a produção de conídios de isolados de *C. perennans* em meios de cultura com e sem fungicidas e determinar o efeito de temperaturas e períodos de umidade na infecção de maçãs ‘Fuji’. As ações conduzidas foram: a) determinação os efeitos dos meios de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), ágar-extrato-de-malte (AEM) e ágar-sucoV8 (V8) no crescimento micelial e produção de conídios de nove isolados de *C. perennans*; b) avaliação a sensibilidade “*in vitro*” de *C. perennans* a seis concentrações dos fungicidas captan, hidróxido de cobre, dithianon, mancozeb e trifloxistrobin incorporados ao meio de cultura BDA; c) avaliação da incidência e severidade da podridão “olho-de-boi” em maçãs ‘Fuji’ inoculadas com *C. perennans* e submetidas a diferentes combinações de períodos de umidade e temperatura. Os resultados mostraram que o maior estímulo ao crescimento do micélio do patógeno foi induzido pelos meios de cultura AEM e V8 e que cinco dos nove isolados avaliados produziram maior quantidade de conídios quando cultivados em suco V8 e quatro em AEM. Todos os fungicidas apresentaram-se eficientes para o controle do crescimento micelial de *C. perennans* quando comparados a testemunha, porém os resultados mais promissores foram obtidos com os fungicidas dithianon e mancozeb. A temperatura e período de incubação que proporcionaram maior índice de incidência e severidade da podridão “olho-de-boi” em frutos de maçã cv. Fuji, foram de 22°C com 20 horas de incubação.

ABSTRACT

The apple culture has great social and economic importance for the south region of Brazil and in the 2003/04 crop season produced approximately 970,000 tons. During the 1995/96 crop season, a different symptom from the most of symptoms observed in apple fruit and branches were evidenced in Rio Grande do Sul and Santa Catarina orchards. After etiological studies, it was determined the occurrence of fungus *Cryptosporiopsis perennans*. This pathogen can cause rot around of 15% on storage apples and for the time been there is few studies about the pathogen and the epidemiology of the disease. The purpose of this work was to study the development and the production of *C. perennans* spores over different cultures medium with and without fungicides, and to determine the effect of temperature and humidity periods over the Bull's eye rot on 'Fuji' apple. The experiments carried out were the following: a) evaluation of the effect of potato-dextrose-agar (PDA), malt extract (MEM) and V8 juice (V8) medium on the development and production of spores by 9 isolates of *C. perennans*; b) evaluation of sensibility "in vitro" of *C. perennans* to six different concentrations of the fungicides captan, copper hidroxide, dithianon, mancozeb and trifloxistrobin diluted in PDA; c) evaluation of incidence and severity of the 'Bull eye's' rot when "Fuji" apples inoculated with *C. perennans* had been submitted to different combinations of humidity and temperature periods. The results showed that the medium AEM and V8 promoted better stimulus to mycelium growth and that five *C. perennans* isolates produced more spores when cultivated in V8 and four isolates in MEM. The different fungicides tested were efficient to control *C. perennans* micelial growth, however the most promising results were obtained with the fungicides dithianon and mancozeb. Higher incidence and severity of the 'Bull eye's' rot on "Fuji" apples were obtained with 20 hours of incubation at 22°C.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Origem dos isolados de *Cryptosporiopsis perennans* de maçãs ‘Fuji’ 16

TABELA 2. Crescimento micelial médio (CMM) de nove isolados de *C. perennans* (Cp1 a Cp9) em três meios de cultura (BDA, AEM e V8), após 3 e 13 dias de incubação (CMM inicial e CMM final, respectivamente) a 21°C e fotoperíodo de 12 horas 19

TABELA 3. Comparação do crescimento micelial médio (CMM, em mm) de cada isolado de *C. perennans* (Cp1 a Cp9) em três meios de cultura (BDA, AEM e V8), após 3 e 13 dias de incubação (Valor p inicial e Valor p final, respectivamente) a 21°C e fotoperíodo de 12 horas.....20

TABELA 4. Fungicidas utilizados nos ensaios do controle *in vitro* de *C. perennans* .. 26

TABELA 5. Valores médios transformados (MT) e não transformados (MNT) da incidência de *C. perennans* em frutos de maçãs cv. Fuji, submetidos a diferentes temperaturas e tempo de incubação. Vacaria, RS.....35

TABELA 6. Efeito da interação entre temperatura e tempo de incubação na incidência de *C. perennans* em frutos de maçãs cv. Fuji, Vacaria/RS 35

TABELA 7. Valores médios transformados (MT) e não transformados (MNT) da severidade de *C. perennans* em frutos de maçãs cv. Fuji. Vacaria/RS 38

TABELA 8. Efeito da interação entre temperatura e tempo de incubação na severidade de *C. perennans* em frutos de maçãs cv. Fuji. Vacaria/RS 39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Sintoma da podridão “olho de boi” no fruto (Foto: Sanhueza, 2001). 6

FIGURA 2. Número médio de conídios de nove isolados (Cp1 a Cp9) de *C. perennans* em três meios de cultura (BDA, Ext. de malte e V8) após 13 dias de incubação a 21°C e fotoperíodo de 12 horas, Vacaria, RS..... 21

FIGURA 3. Efeito de diferentes doses dos fungicidas A (captan), B (cobre), C (dithianon), D (mancozeb) e E (trifloxistrobin) no crescimento micelial (mm) de *C. perennans* após 3 dias de incubação a 21°C e fotoperíodo de 12 horas, Vacaria, RS..... 28

FIGURA 4. Efeito de diferentes doses dos fungicidas A (captan), B (cobre), C (dithianon), D (mancozeb) e E (trifloxistrobin) no crescimento micelial (mm) de *C. perennans* após 13 dias de incubação a 21°C e fotoperíodo de 12 horas, Vacaria, RS..... 29

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.Cultura da macieira	3
2.2.Podridão “olho-de-boi”	5
2.2.1.Ocorrência e importância.....	5
2.2.2 Etiologia	6
2.2.3. Sintomatologia	8
2.2.4. Caracterização do agente causal	9
2.2.5. Epidemiologia.....	10
2.2.6. Controle	11
3. PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE <i>Cryptosporiopsis perennans</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	12
RESUMO.....	24
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4. EFEITO DE FUNGICIDAS NO CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE <i>Cryptosporiopsis perennans</i>	23
RESUMO	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26

5. EFEITO DA TEMPERATURA E PERÍODO DE INCUBAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Cryptosporiopsis perennans</i> EM MAÇÃS CV FUJI	31
RESUMO	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES GERAIS	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO GERAL

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) vem assumindo a cada ano maior importância para o desenvolvimento socioeconômico do sul do Brasil e sua fruta está entre as seis com maior volume comercializado no Brasil tendo apresentado, em 1999, um consumo per capita de 5,30 kg (Embrapa, 2004).

A maior parte da produção no Brasil provém das cultivares ‘Gala’ e ‘Fuji’ que representam 46% e 45% da produção total, respectivamente (Embrapa, 2004).

O cultivo de macieiras se concentra na região Sul que é responsável por 95% da produção nacional. Em 2005, o Estado de Santa Catarina foi o maior produtor do país com área plantada de 18.428 ha e no Rio Grande do Sul, a área com pomares atingiu 14.959 ha (Embrapa, 2004).

Até a década de 70, o Brasil importava praticamente toda a maçã consumida. O aumento da produção da fruta permitiu ao Brasil substituir gradativamente as importações na década de 80 e início da década de 90, tornando-se autosuficiente. O Brasil passou de tradicionalmente importador para exportador (Mello, 2006).

Entretanto, os pomicultores brasileiros enfrentam problemas na atividade ocasionados por fatores produtivos, entre os quais estão as perdas resultantes de podridões de frutos tanto em pré como em pós-colheita. As podridões dos frutos armazenados são responsáveis pela maior parte do refugo nos galpões de embalagens. Nas principais doenças que afetam maçãs em pré e pós-colheita no Brasil se inclui a podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*, sinn. *B. berengeriana*), a podridão amarga (*Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*), e a podridão “olho de boi” (*Cryptosporiopsis perennans*).

A podridão “olho-de-boi” foi descrita em 2001, com agente etiológico identificado como *C. perennans* e tem ocasionado perdas entre 13% e 16% do total das maçãs do refugo (Sanhueza, 2001).

A podridão é constatada em pré-colheita nas maçãs previamente lesionadas pelo granizo ou por insetos ou após a frigorificação. Relatos de outros países onde esta doença ocorre registram que a infecção se inicia principalmente pelas lenticelas e rachaduras da epiderme, por ferimentos ou ainda se desenvolver a partir de carpelos, da abertura calicinal ou na base do pedúnculo. Os estudos disponíveis no Brasil sobre a caracterização de isolados deste patógeno são restritos e o mesmo ocorre quanto as condições do ambiente que propiciam a infecção da cv. ‘Fuji’.

Este trabalho visou estudar o crescimento do micélio e a produção de conídios de isolados de *C. perennans* em três meios de cultura, avaliar a inibição do crescimento micelial por fungicidas acrescidos ao meio de cultura e determinar o efeito da temperatura e período de umidade na infecção de maçãs ‘Fuji’ inoculadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.Cultura da macieira

A macieira pertence à família Rosaceae, ordem Rosales e subfamília Pomoideae. Ao longo do tempo a macieira recebeu diferentes denominações de gêneros e epíteto, como *Pyrus malus* Lineu, *Malus pumila* Miller, *Malus sylvestris* Miller, *Malus malus* Britton, *Malus communis* Poiret e a partir de 1803, foi denominada de *Malus domestica*, Borkhausen.

O centro de origem da maçã é a cadeia de montanhas da Ásia entre os mares Negro e Cáspio e o leste da China (Bleicher, 2002). É uma fruteira lenhosa, decídua, temperada, muito adaptável a diferentes climas, crescendo desde os trópicos até as altas latitudes. Pertence a Família Rosaceae subfamília Pomoideae, que abrange cerca de 100 gêneros e mais de 2.000 espécies espalhadas por todo mundo. 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 e contém uma única semente. As flores são hermafroditas, brancas ou rosas, inferovariadas e dispostas em inflorescência denominada umbela (Iuchi, 2002).

Entre as frutas de clima temperado, a maçã é a de maior volume de comercialização *in natura*, tanto no Brasil quanto no mercado internacional. A produção se concentra na região Sul, que é responsável por 98% da produção nacional. Em 1974 atingia apenas 1,53 mil t, passando a produzir, em 1990, 351 mil t da fruta. No ano 2005 foram produzidas 843.919 t de maçã. Sendo 504.994 t provenientes do Estado de Santa Catarina, 296.775 t do Rio Grande do Sul, 40.275 do Paraná e 1.875 de São Paulo. O

Estado de Santa Catarina é o maior produtor do país com área plantada de 18.428 ha e produção de 504.994 t, em 2005. O Rio Grande do Sul, segundo maior produtor, possui área de 14.959 ha. Esses Estados são responsáveis por 95% da produção nacional (Mello, 2006).

O consumo per capita da fruta no Brasil, situa-se entre 3,5 e 4,3 kg. O consumo é considerado baixo comparando com Alemanha 39,6 kg, Áustria 54,5 kg, Eslovênia 44,1 kg, Holanda 35,2 kg e Portugal 33,4 kg per capita (Mello, 2006).

A maior parte da produção brasileira provém das cultivares Gala (46%) e Fuji (45%) e suas mutações clonais (9%). Contudo, novas cultivares menos exigentes em frio estão viabilizando o cultivo em outras regiões do Brasil (Embrapa, 2004).

Dentre os fatores que afetam negativamente o sistema produtivo destacam-se as doenças e pragas, especialmente as doenças de pós-colheita, que são responsáveis por perdas expressivas.

Entre as doenças mais importantes constatadas em macieiras no Brasil se encontram as doenças de verão que causam podridão de frutos no campo e possuem uma fase de infecção latente, não detectada na colheita. Neste grupo se incluem a “podridão branca” (*B. dothidea*), “podridão amarga” (*C. gloeosporioides*), e a podridão “olho-de-boi” (*C. perennans*). As três ocorrem em todas as cultivares e tornam-se mais evidentes quando a fruta atinge a maturação e diminuem os mecanismos de resistência. Isto ocorre no período próximo da colheita período que exige maiores cuidados quanto ao uso de fungicidas para evitar a colheita de maçãs com resíduos não permitidos. Em anos com verões chuvosos, longos períodos de molhamento e temperaturas médias entre 15°C a 22°C, estas podridões causam perdas elevadas tanto nas cultivares tardias como nas de maturação precoce, mesmo nos pomares com proteção química durante todo o

ciclo. Os sintomas destas doenças podem ser constatados no campo, durante a frigorificação e na comercialização da fruta (Boneti *et al.*, 2001).

Neste grupo de doenças, a podridão “olho-de-boi” é uma moléstia detectada somente na última década no Brasil e as informações disponíveis sobre as características do patógeno, a epidemiologia e o controle da doença ainda são pouco conhecidas.

2.2. Podridão “olho-de-boi”

2.2.1. Ocorrência e importância

A primeira constatação da podridão “olho-de-boi” no Brasil aconteceu nos ciclos vegetativos de 1995 e 1996 em maçãs das cvs. ‘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 (Sanhueza, 2001). O agente causal foi identificado como *Cryptosporiopsis perennans* e sua posição taxonômica foi confirmada no Instituto de Micologia da Holanda (CBS) no ano de 1996.

Segundo Boneti *et al.* (2001), o fungo pode ter se estabelecido no país com antecedência à constatação visto que ele tem sido isolado de cancros抗igos 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 partir da constatação, foi verificada a grande importância desta doença, destacando-se na atualidade entre as principais doenças de pós-colheita na cultura da maçã, podendo acarretar perdas que podem variar de 13 a 16% do total de frutos do refugo (Sanhueza, 2001).



FIGURA 1. Sintoma da podridão “olho de boi” no fruto (Foto: Sanhueza, 2001).

2.2.2 Etiologia

O sintoma da podridão “olho-de-boi” em maçãs tem sido associado à infecção causada por diferentes fungos. 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 *Pezicula* e mais recentemente, novamente colocadas no gênero *Neofabraea* (Jong *et al.*, 2001).

São conhecidas quatro espécies do gênero *Neofabraea* causadores da podridão “olho-de-boi” em maçã: *N. alba* (Guthrie), *N. malicorticis* (H. Jacks) (Nannf), *N. perennans* (Kienholz), e *N. spp.* (Gariépy *et al.*, 2003). Há também a *N. populi*, que causa cancro no gênero *Populus*, mas não produz sintoma da doença em maçã e pêra (Gariépy *et al.*, 2003).

No index fungorum da Fundação Cabi Bioscience e Landcare Research na Inglaterra (Species Fungorum, 2006) foi revisada a sinonímia do Gênero *Neofabraea* como:

- *Macrophoma curvispora* Peck, (1900)

- *Gloesporium malicorticis* Cordley, (1900)
- *Neofabraea malicorticis* H. S. Jacks., Rep. Oregon Exp. Sta.:187 (1913)
- *Gloesporium perennans* Zeller & Childs, (1925)
- *Cryptosporiopsis malicorticis* (Cordley) Nannf., Nova Acta R. Soc. Scient. Upsal., Ser. 4 8(2): 91(1932)
- *Pezicula malicorticis* (H.S.Jacks.) Nannf., Nova Acta R. Soc. Scient. Upsal., Ser. 4 8(1.2): 92 (1932)
- *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenw., (1939)
- *Neofabraea perennans* Kienholz, Journal of Agricultural Research 59:662 (1939)
- *Cryptosporiopsis curvispora* (Peck) Gremmen,: 172 (1959)
- *Pezicula perennans* (Kienholz) Dugan, R.G. Roberts & G.G. Grove, Mycologia 85(4): 571 (1993).

N. alba é o principal agente causador da podridão “olho-de-boi” em maçãs do continente europeu, mas é pouco expressiva na América do Norte (Spotts, 1990). *N. malicorticis* causa o cancro de antracnose em macieira e é encontrado principalmente nas áreas mais úmidas do Noroeste do Pacífico, sendo um patógeno agressivo, capaz de infectar profundamente a madeira. *N. malicorticis* e *N. perennans* são consideradas uma só espécie na Europa, mas como espécies distintas na América do Norte. Uma nova espécie tem sido descrita em estudos filogenéticos de *Neofabraea* spp., causando cancro nas árvores e podridão em maçãs sendo representada por isolados da Nova Escócia, Canadá e um de Portugal (Jong *et al.*, 2001).

Em 1999, Verkley fez uma ampla revisão do gênero *Pezicula* através de características morfológicas e moleculares (PCR-RFLP - rDNA), incluindo todos os isolados dentro do gênero *Neofabraea*. Contudo, Abeln *et al.* (2000), conduziu um

estudo dos gêneros *Pezicula*, *Dermea* e *Neofabraea* através do sequenciamento parcial dos genes do RNA ribossomal e concluiu que o gênero *Neofabraea* é uma linhagem evolutiva separado dos outros gêneros e não pode ser incluído entre o gênero *Pezicula*. Mais recentemente, Jong *et al.* (2001) identificaram 4 espécies novas no gênero *Neofabraea* (*N. alba*, *N. malicorticis*, *N. perennans* e uma nova espécie ainda não descrita) associadas ao cancros das árvores e podridão “olho-de-boi” em maçã. Os autores encontraram diferenças genéticas entre *N. malicorticis* e *N. perennans* suficientes para separá-las em diferente táxon (gênero).

2.2.3. Sintomatologia

Os sintomas nos frutos (Figura 1) caracterizam-se por podridão de cor marrom-clara com o centro amarelo-pálido, de forma mais ou menos circular, algumas vezes com margens marrom-escura ou avermelhadas, deprimidas, de textura firme e desenvolvimento lento. Internamente, os tecidos apresentam-se 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. A superfície da podridão é muitas vezes de coloração creme coberta de uma massa de esporos. Nas lesões maiores de 1 cm de diâmetro, ocorre rachadura na epiderme em consequência da desidratação dos tecidos colonizados pelo patógeno (Sanhueza, 2001).

Em pomares com frutas que apresentam a podridão, geralmente encontra-se cancros nos troncos 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 observados ao redor dos cancros e no cerne

dos ramos e do tronco. Na superfície dos cancros pode-se também observar os acérvulos do patógeno (Sanhueza, 2001).

2.2.4. Caracterização do agente causal

A forma e tamanho dos conídios de *N. malicorticis* mostraram pequenas diferenças em estudos realizados desde a identificação deste patógeno. Estudos sob várias condições de desenvolvimento mostraram variações entre 3 a 6 μ x 15 a 35 μ (Kienholz, 1939; Verkley, 1999; Abeln *et al.*, 2000).

Segundo Gariépy *et al.* (2003) as características morfológicas e fisiológicas dessas espécies são muito similares. Em adição a alta variabilidade morfológica, dois ou mais desses patógenos podem ocorrer em uma mesma região, o que tem dificultado a identificação e originado relatos conflitantes.

As culturas podem produzir micélio bastante colorido, exceto em substratos deficientes em carboidratos, nitrogênio, oxigênio, ou suprimento de luz. A exposição a luz por poucos minutos induz a formação de micélio colorido. Contaminação por bactérias compatíveis e alguns fungos geralmente induzem a formação de pigmento vermelho no ponto de contato (Kienholz, 1939).

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, ligeiramente incrustadas no meio, inicialmente de cor branca e, posteriormente, creme-amarelada ou rosa, com micélio aéreo e pigmentação amarelo-avermelhada escura difusível no meio de cultura. Os microconídios desenvolvidos em meio de cultura apresentaram-se, hialinos, unicelulares e com tamanho de 0,41 x 1,17 μ . Os conídios retirados dos acérvulos desenvolvidos nos frutos são oblongos e retos (Sanhueza, 2001).

2.2.5. Epidemiologia

Nas macieiras a infecção de *C. perennans* pode produzir cancros 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 cancros velhos (Grove *et al.*, 1992).

A infecção nos frutos pode ocorrer durante todo o ciclo, a partir da queda das pétalas, mas concentra-se próximo a colheita (An online guide to plant disease control, 2006).

Apesar do patógeno não precisar de ferimentos para iniciar a infecção, 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 da cultura na fisiologia da fruta (Sanhueza *et al.*, 1996; Boneti *et al.*, 2001).

As condições propícias para o início da infecção são invernos suaves e alta pluviosidade, temperatura média de 20°C (Spotts, 1990; Sanhueza, 2001). A podridão se desenvolve rapidamente entre 18°C a 24°C, mas também ocorre na fruta frigorificada a 0°C. O processo de infecção se inicia pela epiderme lesionada, pelas lenticelas, ou pelas aberturas naturais como a calicinal e a peduncular.

Em geral, os sintomas surgem em pré e pós-colheita. Os frutos infectados no chão do pomar contribuem para a formação do inóculo e sobrevivência do fungo. Nos pomares o fungo sobrevive principalmente nos ramos com cancros. Os conídios do patógeno são formados nos acérvulos na superfície dos cancros e lavados pela chuva e

posteriormente disseminados pelo vento. Os ascósporos são produzidos no apotécio nos cancros dos ramos com mais de dois anos, estes são ejetados e transportados pelas correntes de ar (Grove, 1990; Spotts, 1990; Sanhueza, 2004). No Brasil não foi ainda relatada a ocorrência da fase perfeita de *C. perennans* (Sanhueza, 2001).

2.2.6. Controle

O controle da doença deve ser iniciado por práticas que visem reduzir o inóculo primário. É recomendada a retirada dos cancros, visto que neles se desenvolvem as estruturas do patógeno, remoção dos ramos de poda de inverno e verão e dos frutos do raleio e a aplicação de fungicidas protetores em pré-colheita, especialmente quando ocorrem chuvas no fim da primavera-início do verão (Spotts, 1990; Sanhueza,, 2001). 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 (An online guide to plant disease control, 2006). 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).

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” (Spotts, 1990).

3. PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE *Cryptosporiopsis perennans* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

RESUMO

Nove isolados de *C. perennans* foram cultivados nos meios de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), ágar extrato de malte (AEM) e ágar suco de tomate V8 (V8). Após 3 e 13 dias de incubação a 21°C com fotoperíodo de 12 horas, foi avaliada a produção de conídios e o tamanho das colônias. Verificou-se que os efeitos dos meios de cultura variaram dependendo do isolado e não se observaram tendências semelhantes para as duas características avaliadas. Verificou-se que no meio de cultura V8 todos os isolados, com exceção do 6, apresentaram maior crescimento inicial. O isolado 6 apresentou maior crescimento micelial inicial no meio de cultura BDA. Aos 13 dias o tamanho das colônias foi maior no meio de cultura V8 para os isolados 1, 2, 4, 5, 8 e 9; o isolado 3 cresceu igualmente nos meios V8 e BDA e os isolados 6 e 7 tiveram crescimento micelial similar nos meios V8 e AEM. A maior produção de conídios foi observada nos isolados 2, 4 e 8 quando utilizado o meio AEM. O meio de cultura V8 exerceu maior estímulo à produção de conídios nos isolados 3, 5, 6, 7 e 9. Os meios V8 e AEM proporcionaram maior estímulo ao desenvolvimento e produção de conídios da maior parte dos isolados de *C. perennans*. Em todos os meios de cultivos os isolados estudados apresentaram conídios fusiformes

Palavras-chave: podridão “olho-de-boi”, crescimento *in vitro*, desenvolvimento conidial.

INTRODUÇÃO

A podridão “olho-de-boi” de maçãs e o cancro de ramos da macieira, associados à infecção por *Cryptosporiopsis perennans* foram descritas no Brasil em 1996 e a posição taxonômica do agente causal foi confirmada pelo Instituto Micológico da Holanda (CBS) (Sanhueza *et al.*, 2006).

A infecção das maçãs ocorre no pomar, mas o patógeno permanece latente, vindo a desenvolver os sintomas somente no armazenamento. As lesões nos frutos são circulares, ligeiramente deprimidas, às vezes com halo marrom-avermelhado e o centro com a epiderme de cor amarelada. A polpa colonizada é marrom-avermelhada firme, ligeiramente seca e farinhenta no início e, às vezes, esse setor é circundado por tecidos úmidos de cor marrom, podendo a doença causar, no Brasil, até 16% de perdas na cultivar Fuji (Sanhueza, 2001).

Jong *et al.* (2001) demonstraram com técnicas moleculares que o complexo de espécies que causam cancros dos ramos e a podridão de frutos de maçãs conhecido como “olho-de-boi” é constituído por quatro espécies do gênero *Neofabraea*: *N. perennans* (Kienholz), *N. malicorticis* (H. Jacks.) (Nannf), *N. alba* (Guthrie) e *Neofabraea* spp. Os anamorfos relatados para *N. perennans* e *N. malicorticis* são *Cryptosporiopsis perennans* e *Cryptosporiopsis curvispora*, respectivamente. Para *N. alba* o anamorfo relatado é *Phlyctema vagabunda*, tendo como sinônimo *Gloesporium album*.

No Brasil, até o presente, somente foi constatada *C. perennans*, mas é provável que, como ocorre em outras regiões produtoras de maçãs do mundo, estudos mais

abrangentes dos isolados associados a esta doença possam mostrar a presença de outras espécies.

As características morfológicas e fisiológicas diferenciais dessas espécies são pouco claras. A identificação é baseada em critérios convencionais com diferenças tênues e isto juntamente com a alta variabilidade morfológica das espécies descritas interfere na definição precisa da posição taxonômica dos isolados associados ao sintoma originando relatos conflitantes (Gariépy *et al.*, 2003).

Estudos feitos por Kienholz (1939) e posteriormente por Dugan *et al.* (1993) compararam a morfologia de colônias e 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 . Foi observado pelos autores que os isolados de *C. curvispora* cultivados em BDA produziram grande quantidade de estromas pulverulentos quando as culturas ficaram mais velhas, sendo que somente a espécie *C. perennans* produziu sinêmios sem ápices expandidos no meio de cultura V8-aveia.

O uso de meio de cultura sintético na forma líquida foi considerado impraticável para *N. malicorticis* e para *G. perennans* (Kienholz, 1939). Quando inoculado diretamente no nutriente líquido ou sobre materiais boiantes designados para manter o fungo na superfície, o crescimento resultante ocorreu abaixo da superfície. Em ágar ou meios sintéticos solidificados com ágar, nos quais nenhum tipo de carboidrato foi adicionado, o fungo cresceu hialino, com colônias visíveis.

Diferenças no comportamento dos patógenos em meio de cultura pode ter significância taxonômica (Hawksworth, 1974, citado por Dugan *et al.*, 1993) e a caracterização de isolados de diferentes origens poderá contribuir na caracterização do patógeno no país. Assim, foi mostrado quando comparadas as espécies *G. perennans*, *G. album* e *G. fructigenum* em ágar extrato de malte 2% a maior taxa de crescimento foi observada pelo isolado de *G. fructigenum* (Wilkinson, 1945).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial e a produção de conídios de nove isolados de *C. perennans* associados à podridão “olho-de-boi” cultivados nos meios de cultura batata-dextrose-ágar acidificado (BDAac), ágar extrato de malte (AEM) e ágar suco V8 (V8).

MATERIAL E MÉTODOS

Meios de cultura utilizados: Foram preparados os meios de cultura: a) BDA - Batata-Dextrose-Ágar (10g de dextrose, 18g de ágar, 300 ml de caldo de batata e 700 ml de água destilada), acidificado com ácido lático a pH 4,5; b) V8 - meio de ágar com suco V8 (200 ml de V8, 3g de CaCO₃, 17g de ágar e 800ml de água destilada); c) AEM - extrato de malte (25 g de extrato de malte, 17g de ágar e 1000ml de água destilada).

Obtenção dos isolados: Os isolados foram obtidos de frutos com sintomas de podridão “olho-de-boi” em maçãs da cultivar Fuji de diferentes pomares e regiões do Sul do Brasil. Estes isolados pertencem à coleção da Embrapa Uva e Vinho (Tabela 1).

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 as que foram incubadas 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 preservados a 4°C.

TABELA 1. Origem dos isolados *de Cryptosporiopsis perennans* de maçãs ‘Fuji’

Origem dos isolados	Código	Ano da coleta
Tainhas/RS	Cp1	2002
Tainhas/RS	Cp2	2002
Tainhas/RS	Cp3	2002
Vacaria/RS	Cp4	2002
Fraiburgo/SC	Cp5	2003
Vacaria/RS	Cp6	2002
Vacaria/RS	Cp7	2003
Vacaria/RS	Cp8	2003
Fraiburgo/SC	Cp9	2002

Cultivo dos isolados nos diferentes meios de culturas: As colônias dos isolados do patógeno foram inicialmente cultivadas em BDA ácido 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 incubadas a 21°C com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações iniciais e finais do diâmetro das colônias foram feitas aos 3 e 13 dias de incubação. Esta medida constou do registro de dois diâmetros perpendiculares feitos com paquímetro digital (Mitutoyo). A produção de conídios pelos isolados nos diferentes meios de cultura foi determinada em um disco de micélio de 1,5 cm de

diâmetro retirado da região central de cada colônia. Os conídios foram retirados dos discos de meio de cultura com bastão de vidro, e suspensidos em 3 ml de água destilada esterilizada com Tween 80 (0,001%). Foi utilizado 0,5 ml desta suspensão para a contagem de conídios em câmara de Newbauer.

Delineamento experimental e análise dos dados: Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições, cada uma 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as análises estatísticas, foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$) para a produção de conídios e para o crescimento micelial dos nove isolados de *C. perennans* nos 3 meios de cultura avaliados: BDAac, AEM e V8. Os dados referentes ao crescimento micelial dos nove isolados de *C. perennans* nos diferentes meios de cultura são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

No meio de cultura V8 foi observado o maior tamanho das colônias após 3 dias de incubação para todos os isolados exceto para o isolado 6, que apresentou maior crescimento em meio BDA (Tabela 2). Aos 13 dias de incubação as colônias dos isolados 1, 4, 5, 7 e 8 foram maiores no meio V8. O menor tamanho de colônia neste período foi verificado no isolado 5 no meio de cultura BDA. Estudos prévios sobre desenvolvimento de *N. malicorticis* e *G. perennans* em meio BDA demonstraram que este meio propiciou crescimento regular para ambas as espécies, e que o pH do meio foi

importante no desenvolvimento dos fungos, pois o crescimento foi inibido quando utilizado meio BDA com pH abaixo de 3 ou acima de 11,8 (Miller, 1932).

Dos nove isolados avaliados somente os isolados 4, 5 e 8 não apresentaram diferença significativa no crescimento das colônias aos três dias de incubação nos meios BDA x AEM, e somente o isolado 6 não mostrou diferença no crescimento micelial inicial quando comparado nos meios de cultura AEM e V8 (Tabela 3). Os isolados 1, 2, 3, 7 e 9 apresentaram diferente crescimento micelial, aos três dias de incubação, entre os três meios de cultura avaliados.

Na avaliação final, os isolados 1, 2, 3, 5 e 9 não apresentaram diferenças no tamanho das colônias quando comparou-se os meios BDA x AEM (Tabela 3). Quando comparados os meios de cultura AEM x V8, os isolados 6 e 7 não mostraram diferenças significativas. Para os meios BDA x V8 somente o isolado 3 não apresentou diferença significativa no tamanho das colônias. Os resultados obtidos confirmam a variabilidade previamente citada para esta espécie em outros trabalhos (Dugan *et al.*, 1993) e mostram que o estímulo diferencial observado em alguns isolados por um dos meios de cultura nem sempre se mantém quando avaliado aos 13 dias de cultivo.

A produção de conídios no meio de cultura V8 foi maior nos isolados 3, 5, 6, 7 e 9 (Figura 2). O meio de cultura V8 apresenta grande riqueza nutricional e maior quantidade de carboidratos complexos. Estas características são consideradas capazes de induzir a reprodução de muitos fungos (Lukens, 1963). O meio de cultura extrato de malte proporcionou a maior produção de conídios para os isolados 1, 2, 4 e 8, sendo estatisticamente igual ao meio de cultura V8 para o isolado 2, não diferindo também do meio de cultura BDA para os isolados 3, 5, 6, 7 e 9 (Figura 2).

TABELA 2. Crescimento micelial médio (CMM) de nove isolados de *C. perennans* (Cp1 a Cp9) em três meios de cultura (BDA, AEM e V8), após 3 e 13 dias de incubação (CMM inicial e CMM final, respectivamente) a 21°C e fotoperíodo de 12 horas

Isolado	Meio de cultura	CMM inicial (mm)¹	CMM final (mm)
Cp1	BDA	11,3 ± 0,7 h ²	26,4 ± 1,7 hi
	AEM	10,2 ± 0,3 ij	28,5 ± 2,5 fgh
	V8	14,9 ± 0,2 bc	40,2 ± 3,1 abcd
Cp2	BDA	11,4 ± 0,7 h	26,8 ± 5,8 hi
	AEM	10,1 ± 0,4 ij	26,4 ± 1,2 hi
	V8	13,8 ± 0,8 de	37,1 ± 0,3 cde
Cp3	BDA	12,7 ± 0,3 fg	33,3 ± 3,2 efg
	AEM	10,7 ± 0,4 hi	27,9 ± 1,1 fghi
	V8	15,1 ± 0,2 b	35,3 ± 0,6 de
Cp4	BDA	12,6 ± 0,3 fg	27,2 ± 3,0 ghi
	AEM	13,2 ± 0,2 ef	36,1 ± 1,2 cde
	V8	17,0 ± 0,3 a	46,0 ± 12,2 a
Cp5	BDA	9,7 ± 0,7 j	18,9 ± 0,9 k
	AEM	10,5 ± 0,7 hij	21,7 ± 1,0 ijk
	V8	14,2 ± 0,3 cd	45,4 ± 15,3 a
Cp6	BDA	9,8 ± 0,5 j	24,4 ± 1,7 hijk
	AEM	8,6 ± 1,4 k	38,3 ± 2,4 bcde
	V8	8,4 ± 1,5 k	36,3 ± 2,9 cde
Cp7	BDA	10,1 ± 0,3 ij	21,9 ± 0,7 ijk
	AEM	12,3 ± 0,9 g	38,3 ± 2,0 bcde
	V8	17,6 ± 0,4 a	44,4 ± 0,8 ab
Cp8	BDA	10,9 ± 0,3 hi	25,6 ± 2,2 hij
	AEM	10,9 ± 0,4 hi	33,2 ± 1,8 efg
	V8	15,3 ± 0,6 b	42 ± 4,7 abc
Cp9	BDA	9,7 ± 0,3 j	19,5 ± 1,9 jk
	AEM	10,6 ± 0,4 hi	21,5 ± 1,1 ijk
	V8	13,2 ± 0,3 ef	34,2 ± 6,3 def

¹ N° médio ± esvio padrão.

² Médias segui das pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de contraste de médias ($P < 0,05$).

TABELA 3. Comparação do crescimento micelial médio (CMM) em mm de cada isolado de *C. perennans* (Cp1 a Cp9) em três meios de cultura (BDA, AEM e V8), após 3 e 13 dias de incubação (Valor p inicial e Valor p final, respectivamente) a 21°C e fotoperíodo de 12 horas

Isolado	Meio de cultura	Valor p inicial	Valor p final
Cp1	BDA x AEM	* ¹	0,51
	BDA x V8	*	*
	AEM x V8	*	*
Cp2	BDA x AEM	*	0,91
	BDA x V8	*	*
	AEM x V8	*	*
Cp3	BDA x AEM e	*	0,09
	BDA x V8	*	0,53
	AEM x V8	*	*
Cp4	BDA x AEM	0,14	*
	BDA x V8	*	*
	AEM x V8	*	*
Cp5	BDA x AEM	0,06	0,40
	BDA x V8	*	*
	AEM x V8	*	*
Cp6	BDA x AEM	*	*
	BDA x V8	*	*
	AEM x V8	0,65	0,53
Cp7	BDA x AEM	*	*
	BDA x V8	*	*
	AEM x V8	*	0,06
Cp8	BDA x AEM	0,93	*
	BDA x V8	*	*
	AEM x V8	*	*
Cp9	BDA x AEM	*	0,52
	BDA x V8	*	*
	AEM x V8	*	*

¹ Asterisco (*) indica diferença significativa entre os meios de cultura comparados para o mesmo isolado, pelo teste de contraste de médias ($P < 0,05$).

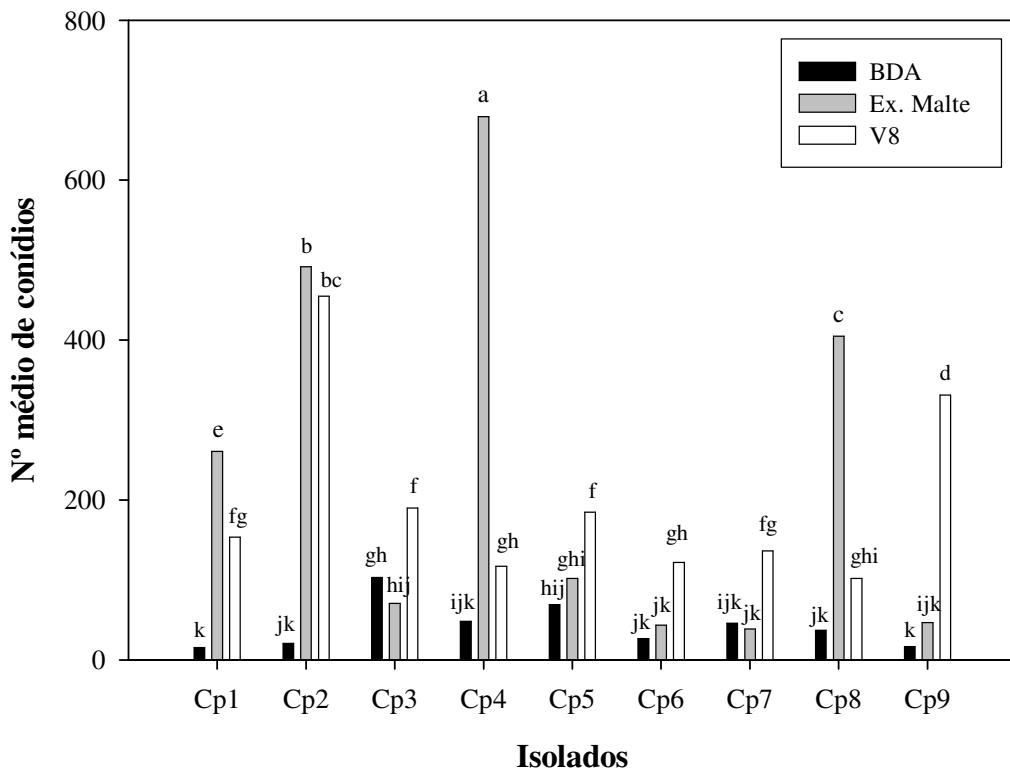


FIGURA 2. Número médio de conídios de nove isolados (Cp1 a Cp9) de *C. perennans* em três meios de cultura (BDA, Ext. de malte e V8) após 13 dias de incubação a 21°C e fotoperíodo de 12 horas, Vacaria, RS.

Comparando-se o crescimento micelial entre o 3° e o 13° dia, a maioria dos isolados apresentou maior crescimento micelial no meio de cultura V8 (Tabela 2). Contudo, diferentemente do relatado para *C. fructigenum* por Wilkinson (1945), os isolados estudados apresentaram conídios da forma fusiforme e quantidade variável de microconídios, o que concorda com a descrição da espécie *C. perennans* descrita em trabalhos prévios (Kienholz, 1939, Dugan *et al.*, 1993). Esses autores estabelecem que essa característica morfológica dos conídios de *C. perennans* se manteve mesmo usando meios de cultivo Leonian e V8 aveia.

Devido ao melhor desenvolvimento micelial e produção de conídios verificados nos meios de cultura V8 e AEM, recomenda-se o uso destes para estudos laboratoriais com o patógeno *C. perennans*.

4. EFEITO DE FUNGICIDAS NO CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE *Cryptosporiopsis perennans*

RESUMO

A podridão “olho-de-boi” causa perdas que podem atingir 15 % da fruta frigorificada e há poucas informações no Brasil sobre a sensibilidade de isolados deste patógeno aos fungicidas. Este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência *in vitro* de fungicidas no controle de *C. perennans*. Para tanto, discos de micélio de cada isolado foram transferidos ao meio de cultura com e sem os fungicidas e após 3 e 13 dias de incubação a 20°C foi medido o diâmetro das colônias. Os tratamentos incluíram uma testemunha sem fungicida e o meio de cultura BDA com as concentrações de 0,1, 1, 2,5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada produto. Os fungicidas testados foram: captan, dithianon, mancozeb, trifloxistrobin e o hidróxido de cobre. Todos os fungicidas apresentaram-se eficientes quando comparados a testemunha, porém os fungicidas que melhor controlaram o crescimento micelial tanto inicial quanto o final foram: dithianon e mancozeb.

Palavras-chave: podridão “olho-de-boi”, sensibilidade, micélio.

INTRODUÇÃO

A podridão “olho de boi” causada pelo fungo *C. perennans* vem causando perdas crescentes no Sul do Brasil, tanto nas cultivares tardias como nas de maturação precoce. O desenvolvimento de *C. perennans* é favorecido em anos com verões chuvosos, longos períodos de molhamento e temperaturas médias entre 15°C a 22°C, e seus sintomas podem ser constatados no campo, durante a frigoconservação e na comercialização da fruta.

A podridão 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 (Sanhueza *et al.*, 2006). A infecção do patógeno pode ser iniciada ao redor das lenticelas e rachaduras da epiderme, por ferimentos, ou ainda a partir da cavidade peduncular e calicinar e ao redor dos carpelos.

O controle químico inclui o uso de fungicidas cúpricos no inverno e de benzimidazóis e protetores em pré-colheita. Outros fungicidas citados na literatura internacional citam a eficácia do hidróxido de cobre em doses baixas e do euparen, captan, estrobilurinas, pirimethanil, iminoctadine, procimidone e o fluzilazole (Edney, 1970; Borecki *et al.*, 1971; Jones & Adlwinckle, 1990).

Dados de sensibilidade de isolados de *C. perennans*, coletados no Brasil, conduzidos sob condições controladas mostraram o controle do patógeno por *Cryptococcus laurentii*, de desinfestantes aos benzimidazóis (Sanhueza, 2001; Blum *et al.*, 2001).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de cinco fungicidas no controle do crescimento micelial *in vitro* do fungo *C. perennans*, agente etiológico da podridão “olho de boi”.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do isolado: O isolado foi obtido de frutos com sistomas de podridão “olho-de-boi” em maçã da cultivar Fuji e pertence à coleção da Embrapa Uva e Vinho. Os frutos foram desinfestados com álcool etílico hidratado 92° e lavados com água destilada estéril. Fragmentos de tecidos foram retirados das margens das lesões e transferidos ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e as placas incubadas em câmaras de germinação tipo BOD a 21°C com fotoperíodo de 12 horas. Uma cultura monospórica foi obtida e ela preservada em BDA acidificado a 4°C.

Bioensaios para avaliar a sensibilidade de *C. perennans* aos fungicidas: O bioensaio foi realizado incorporando-se os fungicidas ao meio de cultura. Para obtenção da solução concentrada, uma quantidade apropriada de cada fungicida foi dissolvida em 5 ml de álcool e em seguida acrescentado 95 ml de água esterilizada. A partir da solução estoque, procedeu-se a diluição em série e uma amostra da diluição foi incorporada ao meio de cultura BDA fundente (~45°C) e este foi agitado para homogeneizar seu conteúdo e se obter a concentração desejada. Os meios foram vertidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e após a solidificação do meio, discos de 5 mm de diâmetro foram retirados do meio de cultura com e sem fungicida e substituídos por discos contendo micélio do fungo retiradas de colônias desenvolvidas em BDA por 14 dias sob iluminação contínua com temperatura de 21°C. As placas foram incubadas, a 21°C, com fotoperíodo de 12 horas durante 13 dias. Na avaliação foram medidos o tamanho inicial

e final das colônias aos 3 e 13 dias após incubação registrando-se dois diâmetros perpendiculares usando paquímetro digital. Os tratamentos foram constituídos pelos seguintes fungicidas: captan (Captan 500 PM), hidróxido de cobre, dithianon (Delan), mancozeb (Dithane), trifloxistrobin (Flint), em 6 concentrações (0,1, 1, 2., 5, 5, 10 e 20 ppm) e a testemunha sem fungicida. O ingrediente ativo dos fungicidas, seu modo de ação e concentrações, encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4. Fungicidas utilizados nos ensaios do controle *in vitro* de *C. perennans*.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Grupo químico	Modo de ação	CIA¹
Captan	Captan 500PM	Dicarboximida	Contato	500 g/kg
Hidróxido de cobre	Garra 450PM	Inorgânico	Contato	691 g/kg
Dithianon	Delan	Quinona	Contato	750 g/kg
Mancozeb	Dithane PM	Ditiocarbamato	Contato	800 g/kg
Trifloxistrobin	Flint WG	Estrobilurina	Parcialmente sistêmico	500 g/kg

¹Concentração do ingrediente ativo

Delineamento experimental e análise dos dados: O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições e parcelas experimentais constituídas por uma placa de Petri. Os dados foram submetidos a análise de variância e quando significativo, à análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tamanho inicial das colônias de *C. perennans* foi afetado de forma diferencial pelos fungicidas avaliados, exceto pelo trifloxistrobin (Figuras 3 e 4).

O captan teve uma resposta quadrática às doses utilizadas para o crescimento micelial inicial de *C. perennans* (Figura 3), diferente para o crescimento final que não apresentou diferença estatística significativa nas diferentes doses (Figura 4). A inibição do crescimento micelial inicial foi maior a partir da dose de 2,5 ppm e manteve-se constante para as demais doses (Figura 3), resultado semelhante ao obtido por Sanhueza *et al.* (2006) para cinco isolados de *C. perennans*.

Para o hidróxido de cobre foi observada uma resposta linear para o crescimento inicial de *C. perennans*, enquanto que para o crescimento final não houve diferença estatística significativa nas diferentes doses (Figuras 3 e 4). O menor crescimento micelial inicial e final foi observado na dose de 10 ppm. A baixa eficiência apresentada por oxicloreto de cobre foi observada por Fernandes e Santos (1996) para o fungo hiperparasita de fungos, *Ampelomyces quisqualis*, e por Tavares e Souza (2005) para o fungo da antracnose do mamoeiro, *Colletotrichum gloeosporioides*.

Para o dithianon e o mancozeb foi observada uma resposta linear às doses utilizadas, tanto para o crescimento micelial inicial quanto para o final de *C. perennans* (Figuras 3 e 4). Houve diminuição do crescimento micelial com o aumento da dose destes fungicidas, sendo as concentrações de 10 e 20 ppm as mais eficientes. Em testes de eficiência de fungicidas no controle da *C. perennans* em frutos cv Golden Delicious, dithianon e mancozeb foram eficazes, porém o mancozeb foi superior ao dithianon (Sanhueza *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos com o fungicida trifloxistrobin demonstraram que não houve diferença entre as doses utilizadas, mas que o fungicida foi eficiente no controle do crescimento micelial de *C. perennans* quando comparado a testemunha (Figuras 3 e 4).

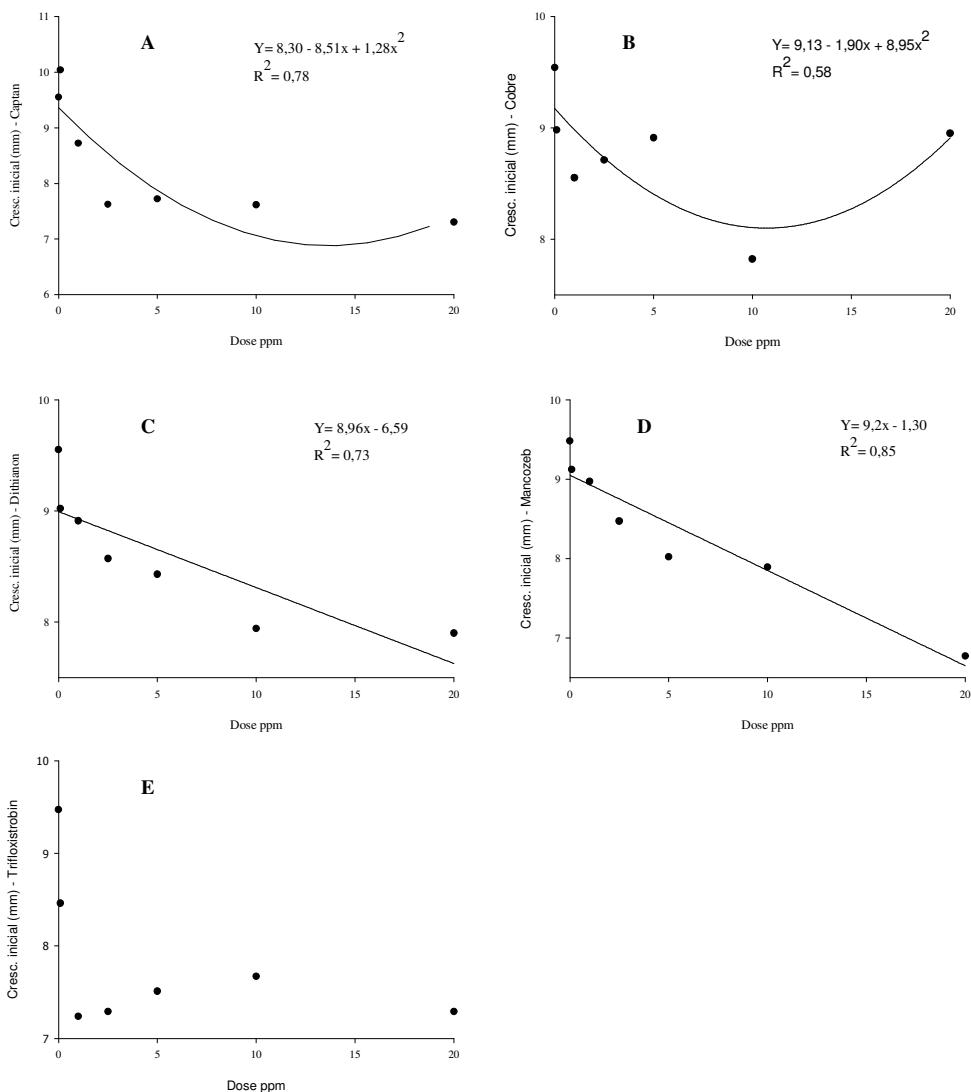


FIGURA 3. Efeito de diferentes doses dos fungicidas A (captan), B (cobre), C (dithianon), D (mancozeb) e E (trifloxystrobin) no crescimento micelial (mm) de *C. perennans* após 3 dias de incubação a 21°C e fotoperíodo de 12 horas, Vacaria, RS.

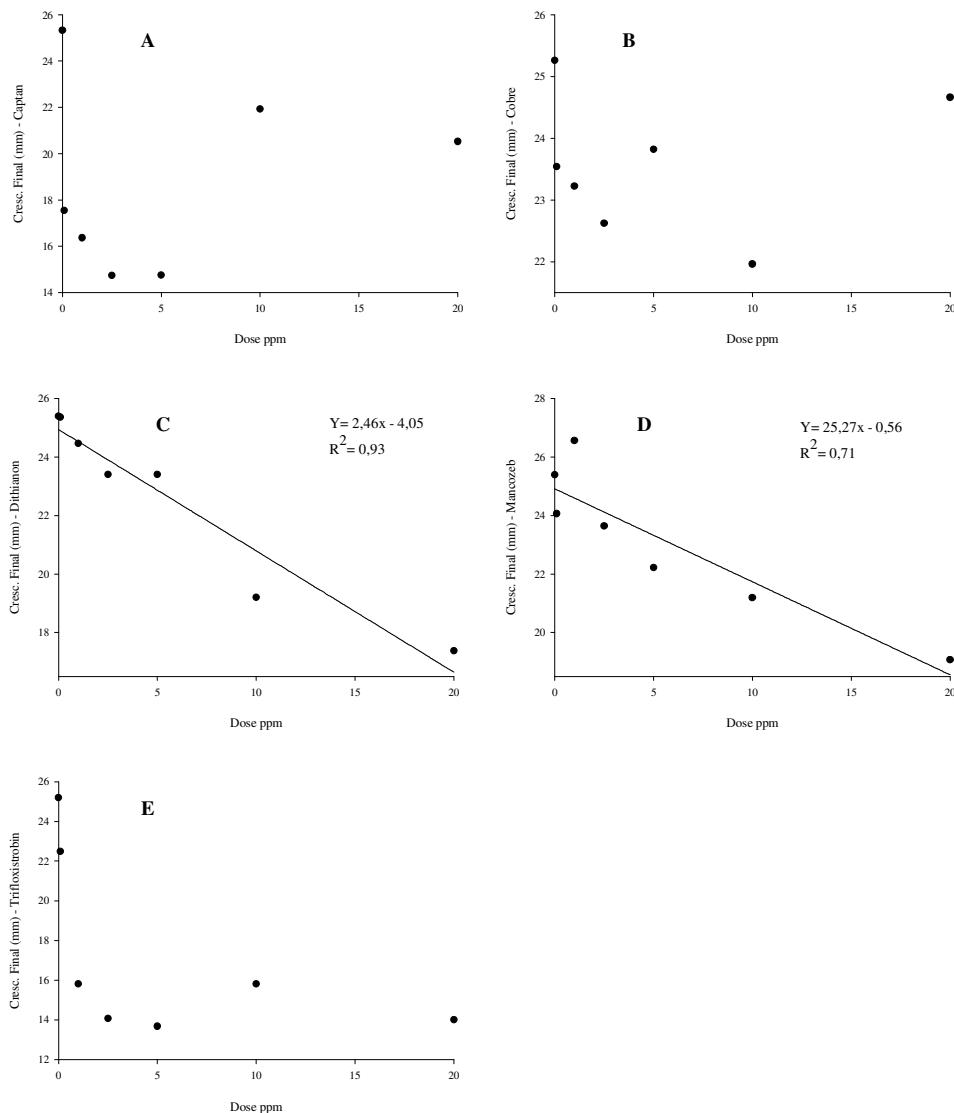


FIGURA 4. Efeito de diferentes doses dos fungicidas A (captan), B (cobre), C (dithianon), D (mancozeb) e E (trifloxistrobin) no crescimento micelial (mm) de *C. perennans* após 13 dias de incubação a 21°C e fotoperíodo de 12 horas, Vacaria, RS.

Estudos realizados em frutos cv Fuji indicaram que a eficiência dos fungicidas captan (0,24, 0,26 e 0,3%), dithianon (0, 075, 0,085 e 0,1%), hidróxido de cobre (0,05, 0,06 e 0,07%), mancozeb (0,21, 0,25 e 0,3%), e trifloxistrobin (0,0075, 0,0012 0,02%) na incidência e severidade de *C. perennans* foi igual para as diferentes doses testadas

(Sanhueza *et al.*, 2006). Quando testados em pré-colheita em macieiras cv Fuji para controlar a incidência de *C. perennans*, os fungicidas dithianon (0,075%), hidróxido de cobre (0,07%) e mancozeb (2,4%) apresentaram a mesma eficiência, porém houve tendência de menor eficácia para o hidróxido de cobre (Sanhueza *et al.*, 2006).

A partir do comportamento apresentado pelo isolado de *C. perennans* em relação aos fungicidas e concentrações testados, é possível estimar que esses produtos, em condições de campo, demonstrem resultados diferentes aos obtidos em laboratório.

5. EFEITO DA TEMPERATURA E PERÍODO DE INCUBAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE *Cryptosporiopsis perennans* EM MAÇÃS CV FUJI

RESUMO

A podridão “olho-de-boi”, causada por *Cryptosporiopsis perennans*, é uma das principais causas de perda de maçãs em pós-colheita. Diante deste fato, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e do período de incubação sobre o desenvolvimento do patógeno. Frutos da cv Fuji foram inoculados com uma suspensão de conídios de *C. perennans* e submetidos a incubação em câmara úmida por 8, 12, 16, 20 e 24 horas a temperaturas de 20, 22 e 24°C. Após 20 dias de incubação, avaliou-se a incidência e severidade da doença. Houve interação significativa entre a temperatura e o período de incubação para os índices de incidência e severidade da podridão “olho-de-boi” nos frutos inoculados. A temperatura e o período de incubação que proporcionaram maior incidência e severidade do patógeno foi de 22°C e 20 horas de incubação.

Palavras-chave: podridão “olho-de-boi”, incidência, severidade, infecção.

INTRODUÇÃO

Dentre as principais causas da redução na produtividade da cultura da maçã destacam-se as doenças. A podridão “olho-de-boi”, causada pelo fungo *Cryptosporiopsis perennans*, tem assumido importância nos últimos anos, podendo causar perdas de até 16% na cultivar Fuji no Brasil em frutos armazenados (Sanhueza, 2001).

A temperatura e a umidade na superfície do fruto são os fatores ambientais que afetam mais intensamente o início e o progresso de doenças infecciosas em plantas. Os patógenos diferem em suas preferências por alta ou baixa temperatura, uma vez que a mesma afeta a germinação dos esporos fúngicos. A umidade é indispensável para a germinação da maioria dos esporos e para a penetração do tubo germinativo no hospedeiro, além de aumentar a suscetibilidade a certos patógenos, afetando a incidência e a severidade da doença (Agrios, 1997).

Nos pomares, *C. perennans* sobrevive em cancros, e a infecção dos frutos pode ocorrer a temperaturas entre 10 e 26°C, mas o melhor para esse processo é ao redor de 20°C (Sanhueza, 2001). As chuvas freqüentes, além de eliminar a proteção química, disponibiliza e dispersa o inóculo e ainda aumenta a suscetibilidade das maçãs à infecção (Sanhueza, 2001). A doença é geralmente mais severa em anos com chuvas freqüentes e temperaturas moderadas durante o outono e períodos chuvosos durante a colheita (Kienholz, 1956).

Dessa forma, torna-se necessário estudar melhor a interação patógeno-hospedeiro e as condições ambientais que predispõem os frutos ao patógeno. As variáveis temperatura e tempo de incubação exercem importância crucial tanto na

infecção quanto na colonização do patógeno, constituindo as variáveis mais correlacionadas com resposta biológica (Sutton, 1980; Agrios, 1997).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho estudar a influência da temperatura e do período de incubação no desenvolvimento da podridão “olho-de-boi” em frutos de maçã cv Fuji.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do isolado: O isolado foi obtido de frutos com sintomas de podridão “olho-de-boi” em maçã da cultivar Fuji e pertence à coleção da Embrapa Uva e Vinho. Os frutos foram desinfestados superficialmente com álcool etílico hidratado 92° e lavados com água destilada esterilizada. Fragmentos de tecidos foram retirados das margens das lesões e plaqueados em meio de cultura BDA e as placas incubadas em câmaras de germinação tipo BOD a 21°C com fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento do isolado, o mesmo foi repicado para tubos de ensaio com BDA e, posteriormente, conservado em geladeira para os estudos subsequentes.

Desinfestação dos frutos: Foi utilizado frutos da cv Fuji, previamente desinfestados com álcool etílico 92°. As bandejas onde os frutos foram acondicionados foram lavadas e igualmente desinfestadas com álcool etílico 92°.

Obtenção da suspensão conidial: Foram adicionados 10 ml de água destilada estéril sobre a superfície da cultura desenvolvida em placas de Petri com BDA durante 10 a 15 dias em câmara de germinação tipo BOD a 22°C, com fotoperíodo de 12 horas, cujos conídios foram removidos mediante a fricção de uma espátula. A suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze esterilizada e, a seguir, procedeu-se sua calibração através de

hemocitômetro tipo Neubauer. A concentração da suspensão foi ajustada para 1×10^6 conídios/ml.

Inoculação dos frutos: a inoculação consistiu na pulverização dos frutos e, para isso, foi usado uma bomba de vácuo (aerógrafo). Após a inoculação os frutos foram submetidos a incubação em câmara úmida por 8, 12, 16, 20 e 24 horas a 20°C, 22°C e 24°C. A seguir os frutos foram incubados durante 20 dias à temperatura de 22°C. Para formação da câmara úmida, as bandejas contendo os frutos foram colocadas em sacos plásticos transparentes com jornal umedecido em seu interior. Nos frutos correspondentes à testemunha procedeu-se apenas a pulverização com água destilada estéril. Na avaliação foi determinado o número de frutos com sintomas (incidência) e o número de lesões por fruto (severidade).

Delineamento experimental e análise dos dados: foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, constituído de 15 tratamentos com 3 repetições de 8 frutos. A comparação de médias foi realizada pelo Teste F para modelos lineares generalizados Poisson (Demétrio, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa entre as diferentes temperaturas utilizadas para os índices de incidência e severidade da podridão “olho-de-boi” em frutos de maçãs cv Fuji ($P < 0,05$, teste Poisson).

A temperatura e período de incubação com o maior índice de incidência (1,67) de *C. perennans* foi de 22°C e 20 horas de incubação (Tabela 5). Na comparação entre todos os tratamentos temperatura vs. horas de incubação, a maior incidência sempre ocorreu para 22°C e 20 horas (Tabela 6).

TABELA 5. Valores médios transformados (MT) e não transformados (MNT) da incidência de *C. perennans* em frutos de maçãs cv. Fuji, submetidos a diferentes temperaturas e tempo de incubação. Vacaria, RS

Temperatura (°C)	Horas incubação	MT ¹ incidência	MNT ² incidência
20	8	0,98 ^{*3}	2,66
	12	0,98*	2,66
	16	0,28*	1,33
	20	0,84*	2,33
	24	1,54*	4,66
22	8	1,29*	3,66
	12	1,20*	3,33
	16	0,51*	1,66
	20	1,67*	5,33
	24	1,46*	4,33
24	8	0,98*	2,66
	12	0,98*	2,66
	16	0,98*	2,66
	20	1,46*	4,33
	24	1,29*	3,66

¹ médias transformadas log (x) – Poisson

² médias não transformadas

³ indica diferença estatística entre médias na mesma coluna pelo teste de Poisson ($P > 0,05$)

TABELA 6. Efeito da interação entre temperatura e tempo de incubação na incidência de *C. perennans* em frutos de maçãs cv. Fuji, Vacaria/RS

Interação	Temp. (°C)	Horas	Temp. (°C)	Horas	Diferença entre médias	P
Temp*horas	20	8	20	12	0	ns ¹
Temp*horas	20	8	20	16	0,6931	*
Temp*horas	20	8	20	20	0,1335	*
Temp*horas	20	8	20	24	-0,5596	*
Temp*horas	20	8	22	8	-0,3185	*
Temp*horas	20	8	22	12	-0,2231	*

Temp*horas	20	8	22	16	0,4700	*
Temp*horas	20	8	22	20	-0,6931	*
Temp*horas	20	8	22	24	-0,4855	*
Temp*horas	20	8	24	8	0	ns
Temp*horas	20	8	24	12	-0,0000	ns
Temp*horas	20	8	24	16	0	ns
Temp*horas	20	8	24	20	-0,4855	*
Temp*horas	20	8	24	24	-0,3185	*
Temp*horas	20	12	20	16	0,6931	*
Temp*horas	20	12	20	20	0,1335	*
Temp*horas	20	12	20	24	-0,5596	*
Temp*horas	20	12	22	8	-0,3185	*
Temp*horas	20	12	22	12	-0,2231	*
Temp*horas	20	12	22	16	0,4700	*
Temp*horas	20	12	22	20	-0,6931	*
Temp*horas	20	12	22	24	-0,4855	*
Temp*horas	20	12	24	8	0	ns
Temp*horas	20	12	24	12	-0,0000	*
Temp*horas	20	12	24	16	0	ns
Temp*horas	20	12	24	20	-0,4855	*
Temp*horas	20	12	24	24	-0,3185	*
Temp*horas	20	16	20	20	-0,5596	*
Temp*horas	20	16	20	24	-1,2528	*
Temp*horas	20	16	22	8	-1,0116	*
Temp*horas	20	16	22	12	-0,9163	*
Temp*horas	20	16	22	16	-0,2231	*
Temp*horas	20	16	22	20	-1,3863	*
Temp*horas	20	16	22	24	-1,1787	*
Temp*horas	20	16	24	8	-0,6931	*
Temp*horas	20	16	24	12	-0,6931	*
Temp*horas	20	16	24	16	-0,6931	*
Temp*horas	20	16	24	20	-1,1787	*
Temp*horas	20	16	24	24	-1,0116	*
Temp*horas	20	20	20	24	-0,6931	*
Temp*horas	20	20	22	8	-0,4520	*
Temp*horas	20	20	22	12	-0,3567	*
Temp*horas	20	20	22	16	0,3365	*
Temp*horas	20	20	22	20	-0,8267	*
Temp*horas	20	20	22	24	-0,6190	*
Temp*horas	20	20	24	8	-0,1335	*
Temp*horas	20	20	24	12	-0,1335	*
Temp*horas	20	20	24	16	-0,1335	*
Temp*horas	20	20	24	20	-0,6190	*
Temp*horas	20	20	24	24	-0,4520	*
Temp*horas	20	24	22	8	0,2412	*
Temp*horas	20	24	22	12	0,3365	*
Temp*horas	20	24	22	16	1,0296	*

Temp*horas	20	24	22	20	-0,1335	*
Temp*horas	20	24	22	24	0,0741	*
Temp*horas	20	24	24	8	0,5596	*
Temp*horas	20	24	24	12	0,5596	*
Temp*horas	20	24	24	16	0,5596	*
Temp*horas	20	24	24	20	0,0741	*
Temp*horas	20	24	24	24	0,2412	*
Temp*horas	22	8	22	12	0,0953	*
Temp*horas	22	8	22	16	0,7885	*
Temp*horas	22	8	22	20	-0,3747	*
Temp*horas	22	8	22	24	-0,1671	*
Temp*horas	22	8	24	8	0,3185	*
Temp*horas	22	8	24	12	0,3158	*
Temp*horas	22	8	24	16	0,3185	*
Temp*horas	22	8	24	20	-0,1671	*
Temp*horas	22	8	24	24	-0,0000	ns
Temp*horas	22	12	22	16	0,6931	*
Temp*horas	22	12	22	20	-0,4700	*
Temp*horas	22	12	22	24	-0,2624	*
Temp*horas	22	12	24	8	0,2231	*
Temp*horas	22	12	24	12	0,2231	*
Temp*horas	22	12	24	16	0,2231	*
Temp*horas	22	12	24	20	-0,2624	*
Temp*horas	22	12	24	24	-0,0953	*
Temp*horas	22	16	22	20	-1,1632	*
Temp*horas	22	16	22	24	-0,9555	*
Temp*horas	22	16	24	8	-0,4700	*
Temp*horas	22	16	24	12	-0,4700	*
Temp*horas	22	16	24	16	-0,4700	*
Temp*horas	22	16	24	20	-0,9555	*
Temp*horas	22	16	24	24	-0,7885	*
Temp*horas	22	20	22	24	0,2076	*
Temp*horas	22	20	24	8	0,6931	*
Temp*horas	22	20	24	12	0,6931	*
Temp*horas	22	20	24	16	0,6931	*
Temp*horas	22	20	24	20	0,2076	*
Temp*horas	22	20	24	24	0,3747	*
Temp*horas	22	24	24	8	0,4855	*
Temp*horas	22	24	24	12	0,4855	*
Temp*horas	22	24	24	16	0,4855	*
Temp*horas	22	24	24	20	-0,0000	ns
Temp*horas	22	24	24	24	0,1671	*
Temp*horas	24	8	24	12	-0,0000	ns
Temp*horas	24	8	24	16	0	ns
Temp*horas	24	8	24	20	-0,4855	*
Temp*horas	24	8	24	24	-0,3185	*

Temp*horas	24	12	24	16	0	ns
Temp*horas	24	12	24	20	-0,4855	*
Temp*horas	24	12	24	24	-0,3185	*
Temp*horas	24	16	24	20	-0,4855	*
Temp*horas	24	16	24	24	-0,3185	*
<u>Temp*horas</u>	<u>24</u>	<u>20</u>	<u>24</u>	<u>24</u>	<u>0,1671</u>	<u>*</u>

¹(ns): não houve diferença estatística entre os tratamentos, (*): houve diferença estatística pelo teste de Poisson ($P > 0,05$)

Para o fator severidade no desenvolvimento de *C. perennans*, o tratamento 22°C e 20 horas de incubação também apresentou as maiores médias quando comparado com os outros tratamentos (Tabelas 7 e 8).

TABELA 7. Valores médios transformados (MT) e não transformados (MNT) da severidade de *C. perennans* em frutos de maçãs cv. Fuji. Vacaria/RS

Temperatura	Horas incubação	MT severidade	MNT severidade
20	8	1,09 ^{*1}	3,00
20	12	1,84*	6,33
20	16	0,28*	1,33
20	20	1,09*	3,00
20	24	1,79*	6,00
22	8	1,99*	7,33
22	12	1,29*	3,66
22	16	1,29*	3,66
22	20	2,12*	8,33
22	24	1,67*	5,33
24	8	1,54*	4,66
24	12	1,54*	4,66
24	16	1,46*	4,33
24	20	1,79*	6,00
24	24	1,84*	6,33

¹indica diferença estatística entre os tratamentos, na mesma coluna, pelo teste de Poisson ($P > 0,05$)

Diversos autores descrevem que as condições ideais para a infecção e o desenvolvimento da podridão “olho-de-boi” ocorrem entre as temperaturas de 10 - 26°C, principalmente entre 20 - 22°C (Rotem, 1978; Dugan *et al.*, 1993; Sanhueza, 2001). Estudos desenvolvidos com *Gloeosporium perennans* e *N. malicorticis* mostraram que a germinação de esporos das espécies em frutos de maçã aumentou com o aumento da temperatura de 0 a 15°C, e que o maior crescimento ocorreu a 15, 20 e 25°C, não havendo diferença entre as temperaturas para ambas as espécies (Miller, 1932). A infecção por *Pezicula malicortis* nas lenticelas em frutos de maçã mostrou-se mais rápida ao redor de 20°C, mas o desenvolvimento ocorreu até mesmo a 0°C (Ogawa e English, 1991).

TABELA 8. Efeito da interação entre temperatura e tempo de incubação na severidade de *C. perennans* em frutos de maçãs cv. Fuji. Vacaria/RS

Interação	Temp. (°C)	Horas	Temp. (°C)	Horas	Diferença entre médias	P
Temp*horas	20	8	20	12	-0,7472	* ¹
Temp*horas	20	8	20	16	0,8109	*
Temp*horas	20	8	20	20	0	ns ²
Temp*horas	20	8	20	24	-0,6931	*
Temp*horas	20	8	22	8	-0,8938	*
Temp*horas	20	8	22	12	-0,2007	*
Temp*horas	20	8	22	16	-0,2007	*
Temp*horas	20	8	22	20	-1,0217	*
Temp*horas	20	8	22	24	-0,5754	*
Temp*horas	20	8	24	8	-0,4418	*
Temp*horas	20	8	24	12	-0,4418	*
Temp*horas	20	8	24	16	-0,3677	*
Temp*horas	20	8	24	20	-0,6931	*
Temp*horas	20	8	24	24	-0,7472	*
Temp*horas	20	12	20	16	1,5581	*
Temp*horas	20	12	20	20	0,7472	*
Temp*horas	20	12	20	24	0,0541	*
Temp*horas	20	12	22	8	-0,1466	*
Temp*horas	20	12	22	12	0,5465	*
Temp*horas	20	12	22	16	0,5465	*

Temp*horas	20	12	22	20	-0,2744	*
Temp*horas	20	12	22	24	0,1719	*
Temp*horas	20	12	24	8	0,3054	*
Temp*horas	20	12	24	12	0,3054	*
Temp*horas	20	12	24	16	0,3795	*
Temp*horas	20	12	24	20	0,0541	*
Temp*horas	20	12	24	24	-0,0000	ns
Temp*horas	20	16	20	20	-0,8109	*
Temp*horas	20	16	20	24	-1,5041	*
Temp*horas	20	16	22	8	-1,7047	*
Temp*horas	20	16	22	12	-1,0116	*
Temp*horas	20	16	22	16	-1,0116	*
Temp*horas	20	16	22	20	-1,8326	*
Temp*horas	20	16	22	24	-1,3863	*
Temp*horas	20	16	24	8	-1,2528	*
Temp*horas	20	16	24	12	-1,2528	*
Temp*horas	20	16	24	16	-1,1787	*
Temp*horas	20	16	24	20	-1,5041	*
Temp*horas	20	16	24	24	-1,5581	*
Temp*horas	20	20	20	24	-0,6931	*
Temp*horas	20	20	22	8	-0,8938	*
Temp*horas	20	20	22	12	-0,2007	*
Temp*horas	20	20	22	16	-0,2007	*
Temp*horas	20	20	22	20	-1,0217	*
Temp*horas	20	20	22	24	-0,5754	*
Temp*horas	20	20	24	8	-0,4418	*
Temp*horas	20	20	24	12	-0,4418	*
Temp*horas	20	20	24	16	-0,3677	*
Temp*horas	20	20	24	20	-0,6931	*
Temp*horas	20	20	24	24	-0,7472	*
Temp*horas	20	24	22	8	-0,2007	*
Temp*horas	20	24	22	12	0,4925	*
Temp*horas	20	24	22	16	0,4925	*
Temp*horas	20	24	22	20	-0,3285	*
Temp*horas	20	24	22	24	0,1178	*
Temp*horas	20	24	24	8	0,2513	*
Temp*horas	20	24	24	12	0,2513	*
Temp*horas	20	24	24	16	0,3254	*
Temp*horas	20	24	24	20	-0,0000	*
Temp*horas	20	24	24	24	-0,0541	*
Temp*horas	22	8	22	12	0,6931	*
Temp*horas	22	8	22	16	0,6931	*
Temp*horas	22	8	22	20	-0,1278	*
Temp*horas	22	8	22	24	0,3185	*
Temp*horas	22	8	24	8	0,4520	*
Temp*horas	22	8	24	12	0,4520	*
Temp*horas	22	8	24	16	0,5261	*

Temp*horas	22	8	24	20	0,2007	*
Temp*horas	22	8	24	24	0,1466	*
Temp*horas	22	12	22	16	0	ns
Temp*horas	22	12	22	20	-0,8210	*
Temp*horas	22	12	22	24	-0,3747	*
Temp*horas	22	12	24	8	-0,2412	*
Temp*horas	22	12	24	12	-0,2412	*
Temp*horas	22	12	24	16	-0,1671	*
Temp*horas	22	12	24	20	-0,4925	*
Temp*horas	22	12	24	24	-0,5465	*
Temp*horas	22	16	22	20	-0,8210	*
Temp*horas	22	16	22	24	-0,3747	*
Temp*horas	22	16	24	8	-0,2412	*
Temp*horas	22	16	24	12	-0,2412	*
Temp*horas	22	16	24	16	-0,1671	*
Temp*horas	22	16	24	20	-0,4925	*
Temp*horas	22	16	24	24	-0,5465	*
Temp*horas	22	20	22	24	0,4463	*
Temp*horas	22	20	24	8	0,5798	*
Temp*horas	22	20	24	12	0,5798	*
Temp*horas	22	20	24	16	0,6539	*
Temp*horas	22	20	24	20	0,3285	*
Temp*horas	22	20	24	24	0,2744	*
Temp*horas	22	24	24	8	0,1335	*
Temp*horas	22	24	24	12	0,1335	*
Temp*horas	22	24	24	16	0,2076	*
Temp*horas	22	24	24	20	-0,1178	*
Temp*horas	22	24	24	24	-0,1719	*
Temp*horas	24	8	24	12	0	ns
Temp*horas	24	8	24	16	0,0741	*
Temp*horas	24	8	24	20	-0,2513	*
Temp*horas	24	8	24	24	-0,3054	*
Temp*horas	24	12	24	16	0,0741	*
Temp*horas	24	12	24	20	-0,2513	*
Temp*horas	24	12	24	24	-0,3054	*
Temp*horas	24	16	24	20	-0,3254	*
Temp*horas	24	16	24	24	-0,3795	*
Temp*horas	24	20	24	24	-0,5141	*

¹(ns): não houve diferença estatística entre os tratamentos, (*): houve diferença estatística pelo teste de Poisson ($P > 0,05$)

Nas condições climáticas do sul do Brasil, este patógeno encontra condições favoráveis para a infecção de frutos nos pomares, pois a temperatura média encontra-se

próxima a 22°C. Temperaturas extremas ou limítrofes são responsáveis por aumentar o tempo para iniciar a infecção ou ainda atuam de maneira direta nos seus componentes, como por exemplo, aumentando o período latente e de incubação (Rotem, 1978).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a metodologia pode ser adotada por produtores de maçã como uma forma de previsão da incidência de *C. perennans* nos frutos. A constatação prévia de alta incidência da podridão “olho-de-boi” permite ao produtor antecipar a comercialização dos frutos, evitando o armazenamento por longo período.

6. CONCLUSÕES GERAIS

1. Os meios de cultura AEM e V8 podem ser indicados para a produção de micélio e para induzir a esporulação de *Cryptosporiopsis perennans* em laboratório.
2. Existe diferença entre isolados de *C. perennans* no que diz respeito a produção de inóculo.
3. Os fungicidas dithianon e mancozeb proporcionaram maior inibição do crescimento micelial de *C. perennans*.
4. Temperatura de 22°C e período de incubação de 20 horas são requeridos para haver infecção de frutos por *C. perennans* em câmaras de incubação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. New York: Academic Press, 1997, 636 p.
- ABELN, E.C.A.; DE PAGTER, M.A.; VERKLEY, G.J.M. Phylogeny of Pezicula, Dermae and Neofabraea inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. **Mycologia**. v. 93, n. 4, p. 685-693, 2000.
- AN ONLINE GUIDE TO PLANT DISEASE CONTROL. Oregon State University Extension. 2006. Disponível em: <<http://plant-disease.ippc.orst.edu>>. Acesso em: 15 fev. 2006.
- BLEICHER, J. História da macieira. In: **A cultura da Macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002, p. 29-36.
- BLUM, L.E.B.; AMARANTE, C.V.T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; GUIMARÃES, L.S.; DEZANET, A.; SCHEIDT, F.; HACK NETO, P. Redução das podridões (*Glomerella cingulata* e *Pezicula malicorticis*) da maçã através da aplicação de levedura. **Fitopatologia Brasileira**. v. 26, p. 317, 2001.
- BONETI, J.I.S.; KATSURAYAMA, Y.; SANHUEZA, R.M.V. Manejo da Sarna na Produção Integrada de Maçã. **Circular Técnica**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2001. n. 30.
- BORECKI, H.; BORECKI, Z.; MILLIKAN, D.F. Control of apple scab, bitter rot and sawfly in Poland with the use of some newer fungicides. **Plant Disease reporter**. Beltsville, v. 55, p. 828-831, 1971.
- DEMÉTRIO, C.G.B. Modelos lineares generalizados em experimentação agronômica. Piracicaba: ESALQ-USP, 2001, 113 p.
- 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.
- EDNEY, K.L. Some experiments with thiabendazole and benomyl as post harvest treatments for the control of storage rots of apples. **Plant Pathology**, v. 19, p. 189-193, 1970.
- 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.
- FERNANDES, M.C., SANTOS, A.S. Cultivo de *Ampelomyces quisqualis* e interferência de fungicidas no seu crescimento, “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**. v. 21, p. 26-29, 1996.

GROVE, G.G. Anthracnose and perennial canker. In: JONES, A.L.; Aldwinckle, S. (Ed.). **Compendium of Apple and Pear Disease**. St. Paul: MN, 1990. p. 36-38.

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. 75, p. 1109-1114, 1992.

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

JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H.L. **Compendium of apple and pear diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1990. 100 p.

JONG, S.N. de; 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**, v. 105, n. 6, p. 658-669, 2001.

KIENHOLZ, J.R. Comparative study of the apple anthracnose and perennial canker fungi. **Journal of Agricultural Research**, v. 59, p. 635-665, 1939.

KIENHOLZ, J.R. Control of Bull's-eye rot on apple and pear fruits. **Plant Disease Reporter**, v. 40, n. 10, p. 872-877. 1956.

LUKENS, R.J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 7, p. 721-724, 1963.

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

MILLER, E.V. Some physiological studies of *Gloesporium perennans* and *Neofabraea malicorticis*. **Journal of Agricultural Research**, v. 45, n. 2, p. 65-77, 1932.

OGAWA, J.M.; ENGLISH, H. Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops. California, 1991.

ROTEM, J. Climate and weather influence on epidemics. In: HORSFALL, J.G.; DIMOND, A.E. (Ed.). **Plant Disease: how disease develops in populations**. New York: Academic Press, 1978. p. 317-436.

SANHUEZA, R.M.V. **Podridões de maçãs frigorificadas, guia para diagnóstico**. Bento Golçalves: EMBRAPA, 1993. 20 p.

SANHUEZA, R.M.V. Recomendações para o controle pós-colheita das podridões de maçã. **Circular Técnica**. Bento Golçalves: EMBRAPA, 1996. n. 21.

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

SANHUEZA, R.M.V. In: EMBRAPA. **Frutas do Brasil: Maçã – Fitossanidade**. Bento Golçalves: EMBRAPA Informações Tecnológicas, n. 38, p. 34-60, 2004.

SANHUEZA, R.M.V.; MAFFIOLETTI, M.; COMPARIM, C.C.; KRASNIAK, J.; BOGO, A.; ARCARI, R. Características e controle da podridão “olho de boi” nas maçãs do Sul do Brasil. **Circular Técnica**. Bento Golçalves: EMBRAPA, 2006. n. 66.

Species fungorum. Disponível em: <<http://indexfungorum.org/names/synspecies.asp>> Acesso em: 15 fev. 2006.

SPOTTS, R.A. Compendium of Apple and Pear Diseases. In: JONES, A.L.; ALDWINCKLE, S. (Ed.). **Compendium of Apple and Pear Disease**. St. Paul: MN, 1990. p. 56.

SUTTON, B.C. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute Kew. 1980.

TAVARES, G.M.; SOUZA, P.E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloesporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya L.*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

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

WILKINSON, E.H. Fungal rot of apples with specail reference to *Gloeosporium* spp. **Annual Applied Biology**, v. 41, p. 354-358, 1954.