



# Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento

Ana R. Soares, Silvia A. Lourenço & Lilian Amorim

Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, ESALQ, Universidade de São Paulo, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Autor para correspondência: Lilian Amorim, e-mail: liamorim@esalq.usp.br

## RESUMO

A antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, é uma das principais doenças pós-colheita em goiabas. Este trabalho teve por objetivo determinar a influência de fatores ambientais na germinação e na formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum* e na infecção de goiabas 'Kumagai' por estes patógenos. A germinação e a formação de apressórios *in vitro* foram determinadas sob temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C, com períodos de molhamento de 6, 12 e 24 horas. A infecção de goiabas foi determinada sob temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C e período de molhamento de 24 horas. Não houve germinação a 40°C em nenhuma das duas espécies. A germinação e formação de apressórios foram bastante elevadas no intervalo de 15 a 30°C para *C. gloeosporioides*, com máximo a 25°C. Para a espécie *C. acutatum*, a germinação e a formação de apressórios foram mais sensíveis a variações da temperatura, com máximo a 20°C. Os períodos de molhamento testados pouco influenciaram a germinação de *C. gloeosporioides*, enquanto que em *C. acutatum* a germinação foi significativamente menor com 6 horas de molhamento em relação a 12 e 24 horas. A infecção de goiabas, pelas duas espécies fúngicas, foi crescente com a temperatura, diferentemente da germinação de conídios e formação de apressórios. Incidências de 100% de frutos doentes ocorreram a 30°C, para ambas as espécies, aos 10 dias após a inoculação.

**Palavras-chave:** *Psidium guajava*, antracnose, germinação, formação de apressórios, doenças pós-colheita.

## ABSTRACT

**Infection of guava by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* under different temperatures and wetting periods**

Anthrax, caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum*, is one of the main post-harvest diseases in guavas. This study aimed to determine the influence of environmental variables on germination and appressorium formation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* and infection of "Kumagai" guavas by these pathogens. The germination rate and the appressorium formation rate *in vitro* were determined under temperatures of 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40°C, with wetting periods of 6, 12 and 24 hours. The infection of guavas was determined under temperatures of 15, 20, 25 and 30°C and wetting period of 24 hours. There was no germination at 40°C for either species. The germination and appressorium formation rate were rather high in the range of 15 to 30°C for *C. gloeosporioides*, with a maximum at 25°C. For the species *C. acutatum*, germination and appressorium formation rates were more sensitive to variations in temperature, with a maximum at 20°C. The wetting periods tested somewhat influenced the germination of *C. gloeosporioides*, whereas in *C. acutatum* the germination was significantly lower with 6 hours of wetting than 12 and 24 hours. The infection of guavas, for both fungal species, increased with the temperature, unlike conidium germination and appressorium formation. Incidences of 100% occurred with 30°C, at 10 days after the inoculation.

**Keywords:** *Psidium guajava*, anthracnose, germination, appressorium formation, post-harvest diseases.

## INTRODUÇÃO

A antracnose, também conhecida como mancha chocolate, é a principal doença pós-colheita em goiaba (*Psidium guajava* L.) no Brasil (Piccinin *et al.*, 2005). *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. foi, por muito tempo, considerado o único agente causal da doença (Piccinin *et al.*, 2005; Junqueira & Costa., 2002). Mais recentemente, no entanto, baseados em técnicas moleculares de identificação de espécies de *Colletotrichum*, Peres *et al.* (2002) identificaram *Colletotrichum acutatum*

J.H. Simmonds associado a lesões de antracnose em goiaba. Assim a antracnose da goiaba pode ser causada por infecções simples ou múltiplas dessas duas espécies fúngicas.

As espécies de *Colletotrichum* apresentam uma ampla distribuição geográfica, particularmente em ambientes quentes e úmidos dos trópicos, onde causam danos em culturas diversas, os quais são principalmente severos em frutas. Em São Paulo, a incidência de antracnose varia com a época do ano em que a goiaba é produzida. A incidência média da doença em pomares da região de Campinas foi de 5% de frutos doentes, com picos de 10% nos frutos colhidos

no final do verão (Amaral *et al.*, 2007). Levantamento realizado no mercado atacadista paulistano também mostrou que a antracnose é uma das principais doenças da goiaba, sendo mais freqüente em frutos que foram ensacados na árvore, em relação àqueles que não receberam essa proteção (Martins *et al.*, 2007). Como a comercialização no mercado atacadista é feita com frutos muito verdes, a incidência média da doença, nesse segmento da cadeia produtiva, é sempre baixa, menor que 1%.

Espécies de *Colletotrichum* infectam goiabas em diferentes estádios fenológicos, mesmo na ausência de ferimentos, permanecendo quiescentes até a maturação (Barkai-Golan, 2001; Moraes *et al.*, 2008). Os sintomas da antracnose são caracterizados por áreas de formato mais ou menos circulares e de coloração escura. Em condições de umidade elevada, é possível observar, sobre as lesões, uma massa de esporos de cor alaranjada, correspondendo à matriz mucilaginosa do fungo. *C. gloeosporioides* pode sobreviver na superfície dos frutos de qualquer estágio fenológico na forma de apressório. A infecção, no entanto, só ocorre em frutos próximos à maturação (após 85 dias a contar da queda das pétalas), quando o “peg” de penetração se forma e uma vesícula invagina nas células superficiais da epiderme do fruto (Moraes *et al.*, 2008). As condições de ambiente favoráveis à germinação e à formação de apressórios não foram determinadas para isolados de *Colletotrichum* causadores de antracnose em goiaba. Por sua vez, experimentos realizados com isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, causadores de antracnose em abacate, mostraram que as temperaturas mínimas para a germinação e formação de apressórios foram sempre maiores em *C. gloeosporioides* que em *C. acutatum*. Enquanto a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* foi inibida em temperaturas inferiores a 13,7°C, após incubação por 24 horas, a germinação de *C. acutatum* só foi inibida em temperaturas menores que 7,1°C (Everett, 2003). Informações sobre os fatores ambientais que favorecem os processos de pré-penetração e de infecção são valiosos no desenvolvimento de sistemas de previsão de doenças e podem contribuir para direcionar ações de controle. Essas informações são desconhecidas no patossistema *Colletotrichum*-goiaba.

O controle da antracnose, no campo, é feito basicamente com métodos culturais e químicos. O controle cultural é feito por meio de poda de ramos com sintomas, plantios em espaçamento que permitam um bom arejamento das plantas, colheitas freqüentes sem deixar frutos na planta, adubações equilibradas controlando doses de nitrogênio. O controle químico é realizado com pulverização de fungicidas cúpricos quando os frutos estão com menos de 3 cm de comprimento (Piccinin *et al.*, 2005), seguido de ensacamento ou de pulverização durante todo o crescimento do fruto (Junqueira & Costa, 2002). Entretanto, devido aos efeitos prejudiciais dos fungicidas ao meio ambiente e à saúde humana, e na tentativa de enquadramento dos cultivos ao sistema PIF (Produção Integrada de Frutas), a tendência é a redução no uso de agroquímicos, associada ao uso de sistemas de previsão e estratégias alternativas de controle.

Considerando a importância da antracnose em goiaba pós-colheita e a necessidade de redução no uso de agroquímicos com a implantação de sistemas de previsão de doenças, o objetivo deste trabalho foi determinar as condições ambientais favoráveis à pré-penetração e à infecção de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* em goiabas ‘Kumagai’.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção e preparo da suspensão fúngica

Os isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* foram obtidos de frutos doentes, da variedade Kumagai (polpa branca) e cultivados em meio de aveia-água (Tuite, 1969), o qual favorece a esporulação (Dhingra & Sinclair, 1985). As placas foram mantidas sob luz contínua e temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ). Para a diferenciação segura das espécies, realizou-se um teste de PCR utilizando-se os pares de primers CgInt/ITS4 e CaInt2/ITS4 e a metodologia descrita por Adaskaveg & Hartin (1997).

A suspensão de conídios foi obtida com inóculo produzido em dois frutos (um para cada espécie), sete dias após a inoculação. Conídios foram transferidos dos frutos, juntamente com a massa mucilaginosa, com agulha histológica, para um becker contendo 10 mL de água destilada esterilizada. Realizou-se a contagem de conídios em câmara de Neubauer e, em seguida, a suspensão foi ajustada para  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

### Influência da temperatura e do período de molhamento na germinação e na formação de apressórios de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, *in vitro*

A germinação dos conídios foi determinada após a deposição de três gotas, eqüidistantes, de 50  $\mu\text{L}$  de suspensão de conídios, na concentração de  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>, em cada placa de poliestireno. As placas abertas foram colocadas dentro de uma caixa plástica tipo gerbox contendo papel filtro umedecido com 20 mL de água destilada e foram mantidas em câmaras de crescimento (Ação científica, modelo AC 71) nas temperaturas constantes de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C e 6, 12 e 24 horas de molhamento, sob escuro contínuo. Para a interrupção do processo de germinação, após o período de molhamento pré-determinado, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de lactoglicerol à gota da suspensão fúngica. A avaliação da porcentagem de germinação consistiu na contagem dos 100 primeiros conídios encontrados em cada gota, considerando germinado, o conídio que apresentou tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento do mesmo, ou aquele que mesmo apresentando tubo germinativo menor formou apressório. Contou-se também o número de apressórios formados, e calculou-se a porcentagem relativa ao número de conídios germinados.

Uma vez determinada a combinação de temperatura e molhamento ideal para a germinação de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, ensaio semelhante foi realizado, sob temperaturas de 20 e 25 °C, utilizando períodos descontínuos de molhamento, sendo (i) 6 horas de câmara úmida + 18

horas sem câmara úmida, (ii) 6 horas de câmara úmida + 12 horas sem câmara úmida + 6 horas de câmara úmida, (iii) 12 horas de câmara úmida + 12 horas sem câmara úmida e (iv) 24 horas de câmara úmida. Em todos os tratamentos, as placas foram mantidas destampadas dentro do gerbox contendo papel filtro umedecido em 20 mL de água destilada durante o período de molhamento inicial. Em seguida, as placas foram retiradas de dentro do gerbox, colocadas na câmara de exaustão para secagem da gota, durante 30 minutos, permanecendo pelo tempo pré-determinado de secagem dentro das câmaras de germinação, tampadas e sem o gerbox. O período de molhamento foi restabelecido, colocando-se 50 µL de água destilada e esterilizada sobre os conídios. As placas de poliestireno foram novamente colocadas dentro do gerbox destampadas em câmara úmida pelo período de tempo restante.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente ao acaso. Foram utilizadas três placas, contendo três gotas cada uma, para cada combinação de temperatura e molhamento, totalizando nove repetições por tratamento. O experimento foi realizado duas vezes, simultaneamente para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

#### **Influência da temperatura na infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* em goiabas 'Kumagai'**

Para a realização dos experimentos *in vivo*, goiabas 'Kumagai', em ponto de comercialização, foram obtidas da propriedade de Ricardo Kumagai, em Campinas, SP. Os frutos foram higienizados em solução de hipoclorito de sódio 0,5% por cinco minutos e posteriormente lavados em água corrente para retirar o excesso do produto. Em seguida, os frutos secaram em temperatura ambiente e então foram colocados em embalagens plásticas individuais. Colocou-se uma porção de algodão úmido em cada recipiente e realizou-se o ferimento com uma agulha histológica na superfície do fruto.

A suspensão de conídios foi semelhante à utilizada nos experimentos *in vitro*, porém ajustada para  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Alíquotas de 50 µL desta suspensão foram depositadas sobre o ferimento realizado. Os recipientes foram tampados e incubados em câmaras de crescimento (Ação científica, AC 71) sob temperaturas constantes de 15, 20, 25 e 30°C e 24 horas de molhamento, sendo o algodão umedecido retirado após este período. Em ensaios preliminares, testou-se o armazenamento a 10°C.

Diariamente, a incidência da doença foi avaliada, a partir do aparecimento da primeira lesão até a senescência dos frutos. Realizou-se o cálculo da área abaixo da curva da incidência (Berger, 1988) para determinar a influência da temperatura no comportamento dessa variável no tempo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para cada tratamento utilizaram-se 10 frutos (repetições) totalizando 240 frutos para cada experimento. Foram realizados dois experimentos, simultaneamente, para as duas espécies de *Colletotrichum*.

#### **Análise dos dados**

Os resultados dos experimentos *in vitro* foram analisados estatisticamente por meio de regressões não-lineares, utilizando o software STATÍSTICA 6.0 (Statsoft, Tulsa). Os dados de germinação e formação de apressórios foram ajustados ao modelo beta-monomolecular (Hau & Kranz 1990), descrito pela equação  $Z=(b_1*((T-b_2)^{b_3}))*((b_4-T)^{b_5})*(b_6*(1-b_7*\exp(-b_8*M)))$ , onde Z corresponde a germinação de conídios (%) ou formação de apressórios (% relativa ao número de conídios germinados), T corresponde à temperatura (°C), M corresponde ao período de molhamento (horas),  $b_2$  e  $b_4$  representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima,  $b_5$  representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica,  $b_8$  está relacionada à velocidade de aumento da variável dependente em função do molhamento e  $b_1, b_3, b_6$  e  $b_7$  são parâmetros do modelo. A adequação do modelo aos dados foi analisada pelos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), obtidos da regressão não-linear. Para cada experimento foi feito um ajuste e todos os parâmetros de cada experimento foram comparados com o de sua repetição. Como não houve diferença estatística significativa entre eles, novo ajuste foi realizado utilizando os dados dos dois experimentos. Os parâmetros  $b_2, b_4, b_5$  e  $b_8$ , obtidos para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* foram comparados pelo "teste t" para verificar se houve diferença significativa destes parâmetros entre as espécies.

A análise estatística do período de molhamento descontínuo foi realizada através da análise de variância (teste F), utilizando-se a transformação arco seno da proporção da germinação, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o software STATÍSTICA 6.0.

O progresso da incidência da doença no tempo foi expresso graficamente e as áreas abaixo da curva de cada tratamento foram calculadas por integração trapezoidal (Berger, 1988). A curva da área abaixo da curva da incidência em função da temperatura foi analisada por meio de regressão não-linear utilizando uma generalização do modelo beta (Hau & Kranz, 1990), descrito pela equação  $Y=(b_1*((T-b_2)^{b_3})*((b_4-T)^{b_5}))$ , onde Y corresponde a área abaixo da curva de incidência, T corresponde à temperatura (°C),  $b_2$  e  $b_4$  representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima,  $b_5$  representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica,  $b_1$  e  $b_3$  são parâmetros do modelo.

## **RESULTADOS**

#### **Influência da temperatura e do período de molhamento contínuo na germinação e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, *in vitro***

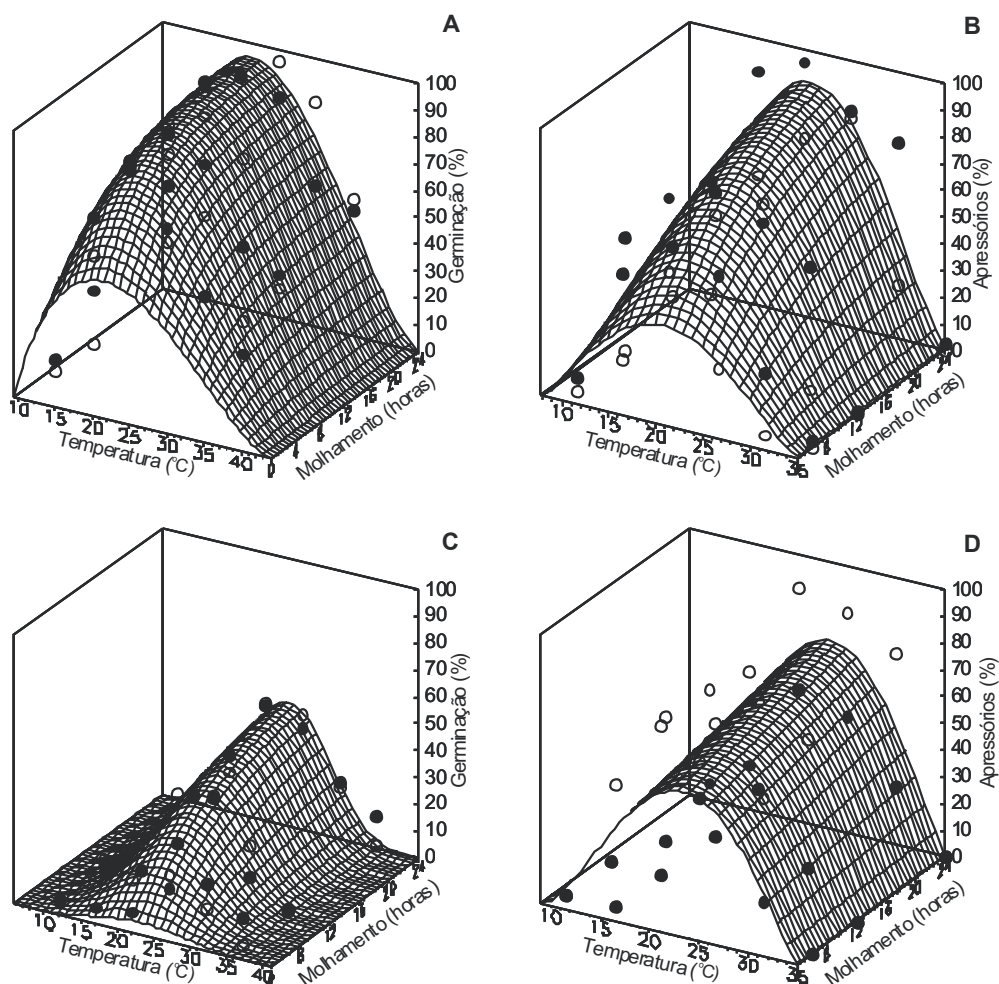
O fungo *C. gloeosporioides* germinou em todas as temperaturas e períodos de molhamento avaliados, exceto a 40°C. A faixa favorável à germinação de *C. gloeosporioides* estimada pelo modelo Beta monomolecular ocorreu sob temperaturas de 20 a 25°C acima de 6 horas de molhamento,

correspondendo a germinações acima de 50,0% (Figura 1A). Porém, acima de 12 horas, essa faixa se estendeu de 15 a 30°C. As temperaturas mínima e máxima para germinação do fungo, previstas pelo ajuste do modelo, foram de 9,5 e 44,1 °C, respectivamente (Tabela 1). O período de molhamento mínimo foi de 6 horas.

Conídios de *C. gloeosporioides* formaram apressórios em todas as combinações de temperaturas e períodos de molhamento, exceto a 40°C. Porém, a 10°C com 6 horas de molhamento e a 35°C, independentemente do período de molhamento, os valores foram muito baixos com médias entre 2,6 e 1,5% de apressórios formados, considerando apenas os conídios germinados. Na temperatura de 10°C, em média, apenas 2,2% dos conídios germinaram e destes observou-se, em média, 2,6% de apressórios. A faixa mais favorável à formação de apressórios (relativa aos conídios germinados), estimada pelo ajuste do modelo Beta

monomolecular, ocorreu no intervalo de temperaturas de 15 a 30°C acima de 6 horas, com germinações superiores a 50%, exceto a 30°C e 6 horas de molhamento (Figura 1B). A formação de apressórios aumentou com o aumento dos períodos de incubação para todas as temperaturas. As temperaturas mínima e máxima para formação de apressórios previstas pelo ajuste do modelo beta monomolecular foram de 7,8°C e 35,4°C, respectivamente (Tabela 1). O período de molhamento mínimo foi de 6 horas.

*Colletotrichum acutatum* germinou em todas as temperaturas e períodos de molhamento, exceto a 40 °C. Porém, as germinações a 10°C com 6 e 12 horas de molhamento e a 35°C em todos os períodos de molhamento foram abaixo de 5,0%. A faixa favorável à germinação de *C. acutatum*, estimada pelo ajuste do modelo Beta monomolecular, ocorreu sob temperaturas de 20 a 25°C acima de 12 horas, correspondendo a germinações acima de



**FIG. 1** - Superfície de resposta da germinação (%) de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (a) e *Colletotrichum acutatum* (c) e formação de apressórios (% relativa ao número de conídios germinados) em conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (b) *Colletotrichum acutatum* (d), em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela equação geral  $Z=(b_1*((T-b_2)^{b_3})*((b_4-T)^{b_5})*(b_6*(1-b_7*\exp(-b_8*M))))$ , onde Z é a variável analisada (%), T é a temperatura (°C) e M é a duração do período de molhamento (h).

40% (Figura 1C). As temperaturas mínima e máxima para a germinação do fungo, previstas pelo ajuste do modelo beta-monomolecular foram de 6,3°C e 42,5°C, respectivamente (Tabela 1). O período de molhamento mínimo foi de 6 horas.

Os conídios de *C. acutatum* formaram apressórios em todas as temperaturas e períodos de molhamento, exceto a 35 e 40°C e a 10°C nos períodos de molhamento de 6 e 12 horas. A faixa favorável à formação de apressórios de *C. acutatum*, estimada pelo ajuste do modelo Beta monomolecular, ocorreu sob temperaturas de 20 e 25°C acima de 6 horas de molhamento, com média acima de 40,0% (Figura 1D). Porém, nas temperaturas de 20 a 30°C acima de 12 horas houve formação de apressórios (relativa ao número de conídios germinados) acima de 40%. As temperaturas mínima e máxima para formação de apressórios previstas pelo ajuste do modelo foram de 9,2°C e 35,1°C, respectivamente (Tabela 1). O período de molhamento mínimo foi de 6 horas.

Não houve diferença significativa pelo teste t ( $P \leq 0,05$ ) entre os parâmetros  $b_2$ ,  $b_4$  e  $b_3$ , correspondentes à temperatura mínima, máxima e faixa de amplitude da superfície, respectivamente, quando se compararam as variáveis germinação e formação de apressórios de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*.

O parâmetro  $b_8$  do modelo reflete a velocidade de aumento da variável dependente (germinação ou formação de apressórios) em função do período de molhamento. Ele foi significativamente diferente de zero apenas na germinação de conídios de *C. acutatum*. Assim, o aumento do período de molhamento implicou em significativo aumento na germinação de conídios de *C. acutatum*, mas não teve influência na germinação de *C. gloeosporioides*. Em ambas as espécies fúngicas a formação de apressórios foi indiferente ao período de molhamento (Tabela 1).

**Influência da temperatura e do período de molhamento descontínuo na germinação e formação de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, in vitro**

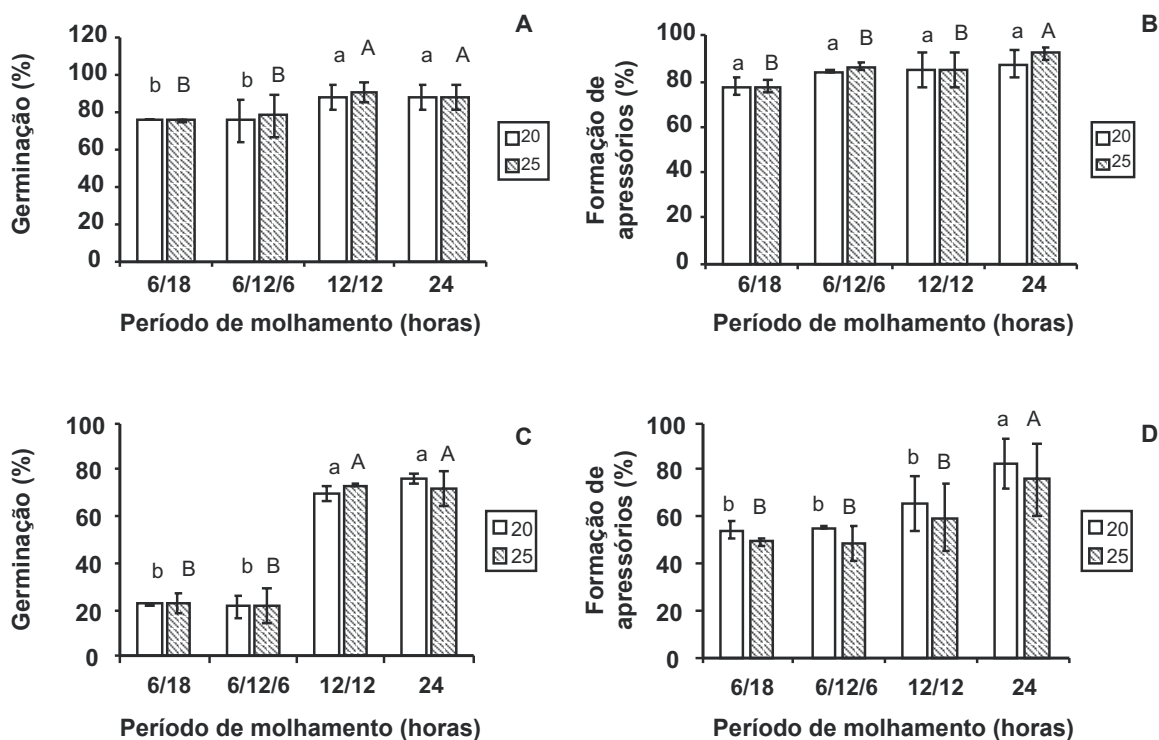
A germinação de conídios de *C. gloeosporioides* submetidos a períodos de seca mostrou que o fungo não suportou interrupções no molhamento e que períodos de molhamento superiores a 12 horas não provocam incrementos na germinação nem na formação de apressórios (Figura 2A-B). Os tratamentos 12 horas de molhamento seguido de 12 horas de seca (12h/12h) e 24 horas de molhamento proporcionaram os maiores valores, com médias entre 87,6 e 90,4% e diferiram estatisticamente dos demais tratamentos pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) nas temperaturas testadas. Os demais tratamentos não diferiram entre si (Figura 2A). Tendência semelhante foi encontrada na formação máxima de apressórios. Nesse caso, porém, a formação máxima de apressórios foi obtida com apenas 6 horas de molhamento (Figura 2B), não havendo diferenças entre os tratamentos a 20°C. Apenas com períodos de molhamento de 24 horas e temperatura de 25°C houve incremento significativo, proporcionando a máxima formação de apressórios (92,2%).

A germinação de conídios de *C. acutatum* foi mais sensível aos períodos sem molhamento que *C. gloeosporioides*. As maiores porcentagens de germinação (médias entre 69,5 e 76,0%) foram observadas no tratamento 12h/12h e 24 horas, as quais diferiram estatisticamente dos demais tratamentos, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 2C). Os tratamentos 6h/12h/6h e 6h/18h não diferiram entre si e as médias de germinação foram de 21,4 a 23,0%. Não houve diferença estatística entre as temperaturas testadas. Na formação de apressórios não houve diferença estatística entre as temperaturas e o tratamento 24 horas de molhamento apresentou os maiores

**TABELA 1** - Parâmetros ( $b_1$  a  $b_8$ ), erros padrão dos parâmetros e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) da função beta-monomolecular\* ajustada aos dados de germinação (%) e formação de apressórios (%) sob diferentes temperaturas (10 a 35 °C) e períodos de molhamento (6 a 24 h), para as espécies avaliadas (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*) isoladas de goiaba 'Kumagai'

Variáveis analisadas		$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$	$b_5$	$b_6$	$b_7$	$b_8$	$R^2$
		(erro)	(erro)	(erro)	(erro)	(erro)	(erro)	(erro)	(erro)	
<i>C. gloeosporioides</i>	Germinação	0,37	9,5	0,85	44,1	1,59	0,21	0,46	0,18	0,94
		(-)	(0,71)	(0,47)	(11,86)	(1,67)	(-)	(0,55)	(0,22)	
<i>C. gloeosporioides</i>	Formação de apressórios	1,70	7,8	1,32	35,4	1,48	0,04	0,89	0,09	0,87
		(-)	(3,2)	(0,99)	(2,68)	(0,89)	(-)	(0,5)	(0,13)	
<i>C. acutatum</i>	Germinação	$2 \times 10^{-8}$	1,84	6,35	42,5	5,78	$3 \times 10^{-7}$	1,52	0,13	0,94
		(0,06)	(5,1)	(2,15)	(10,6)	(5,5)	(0,06)	(0,49)	(0,04)	
<i>C. acutatum</i>	Formação de apressórios	9,39	9,2	1,57	35,1	1,28	0,44	0,99	0,001	0,81
		(0)	(3,6)	(1,1)	(1,87)	(0,74)	(0)	(24,5)	(0,39)	

$Z = (b_1 * ((T - b_2) / b_3) * ((b_4 - T) / b_5)) * (b_6 * (1 - b_7 * \exp(-b_8 * M)))$ , onde  $b_2$  e  $b_4$  representam, respectivamente, as temperaturas mínima e máxima,  $b_3$  representa a amplitude da curva em sua faixa assintótica,  $b_1$ ,  $b_3$ ,  $b_6$ ,  $b_7$  e  $b_8$  são parâmetros da equação, Z é a germinação (%) ou formação de apressórios (%), T é a temperatura (°C) e M, o período de molhamento (horas).



**FIG. 2** - Germinação (%) em conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (a) e *Colletotrichum acutatum* (c) e formação de apressórios (% relativa ao número de conídios germinados) em conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (b) *Colletotrichum acutatum* (d) sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento descontínuos, sendo um período de molhamento seguido de um período de interrupção molhamento (6+18, 6+12+6, 12+12 e 24 horas). Média de dois experimentos (barras brancas - 20 °C e barras hachuradas - 25 °C). Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si a 20 °C e médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si a 25 °C, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

valores (médias entre 75,9 e 82,6%), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 2D).

#### Influência da temperatura na infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* em goiabas 'Kumagai'

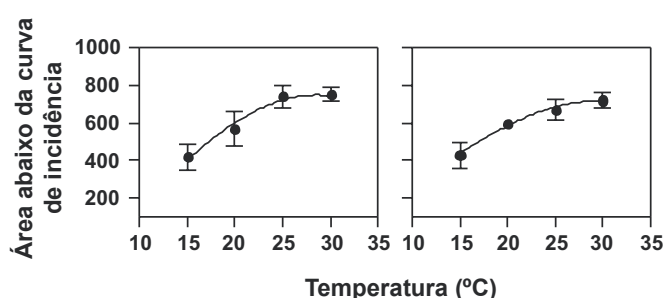
A incidência de frutos doentes foi crescente com o aumento da temperatura. A maior incidência da doença (100%) ocorreu, 10 dias após a inoculação, sob temperatura de 30°C para ambos os patógenos. Sob temperatura de 15°C, as máximas incidências, alcançadas 14 dias após a inoculação, foram, em média, de 50 e 55%, para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, respectivamente. Em testes preliminares, não houve infecção sob temperatura de 10°C para nenhuma das espécies de *Colletotrichum* testada. As curvas das áreas abaixo das curvas de progresso da incidência de doença aumentaram com o aumento da temperatura até 30°C, de forma semelhante para ambos os fungos (Figura 3). Os parâmetros  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_4$  e  $b_5$  das equações do modelo Beta ajustados aos dados da área abaixo da curva de incidência para *C. gloeosporioides* foram 0,19, 4,5, 1,5, 47,2, 1,18 e para *C. acutatum* foram 0,78, 1,2, 1,4, 45,0,

0,77, respectivamente. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) dos ajustes para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* foram de 0,98 e 0,99, respectivamente

#### DISCUSSÃO

De modo geral, os requerimentos para o crescimento *in vitro* de ambos os fungos são similares. É importante observar que, embora a temperatura e molhamento favoráveis à germinação e formação de apressórios para *C. gloeosporioides* estejam entre 20 e 25°C acima de 6 horas de molhamento, com 15 e 30°C e 6 horas de molhamento obtêm-se médias em torno de 40% de germinação, significativa para a doença em campo.

Diferentemente de isolados causadores de antracnose em abacate, para os quais demonstrou-se mais tolerância de *C. acutatum* a temperaturas baixas, significativamente diferente de *C. gloeosporioides* (Everett, 2003), neste trabalho não foi constatada diferença estatística entre as espécies. A rápida germinação e formação de apressórios em ampla faixa de temperatura indicam habilidade das duas espécies em explorar condições noturnas, com temperaturas mais



**FIG. 3** - Relação entre a área abaixo da curva de incidência de antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (a) e *Colletotrichum acutatum* (b) em goiabas 'Kumagai' e diferentes temperaturas, após 14 dias de incubação. O período de molhamento após a inoculação foi de 24 horas para todos os tratamentos. Valores relativos à média de dois experimentos.

amenas e prolongado período de orvalho e diurnas, com altas temperaturas, que são características de situações de campo durante o verão.

Além da temperatura, o período de molhamento mostrou influência na germinação, principalmente de *C. acutatum*. Comparando-se com *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* é mais sensível a períodos de molhamento mais curtos. Por outro lado, Estrada *et al.* (2000) constataram que a formação de apressórios de isolados de *C. gloeosporioides* de manga era altamente inibida em curtos períodos de molhamento e mostraram incremento significativo quando o período passava de 12 para 24 horas de molhamento. A duração do período de molhamento influencia o estabelecimento da infecção. Assim, molhamentos curtos podem impedir a ocorrência do fenômeno. A temperatura, por sua vez, determina rapidez e extensão da infecção, sendo, portanto, de influência quantitativa (Leite & Amorim, 2002).

Com 24 horas de molhamento e temperaturas acima de 30 °C observou-se a formação de ramificações do tubo germinativo e formação de mais de um apressório por tudo germinativo somente em *C. gloeosporioides*. Dinh *et al.* (2003) também observaram, em estudo *in vivo* com mangas, que conídios de *C. gloeosporioides* apresentaram ramificações no tubo germinativo e produziram mais de um apressório após 48 horas de molhamento.

Nenhum dos patógenos recuperou a germinação após interrupção do molhamento. O efeito da interrupção do período de molhamento no desenvolvimento da doença depende de quando o período seco ocorre durante a infecção. A infecção pode não ocorrer se o período seco sobrevir o início da germinação, antes da formação de apressórios. Para *Mycosphaerella pinodes*, a umidade é essencial para a germinação, mas a formação de apressórios, a penetração e o desenvolvimento da doença podem progredir durante períodos secos (Roger *et al.*, 1999).

O conhecimento das condições que favorecem a germinação e formação de apressórios *in vitro* é importante para se comparar com o que ocorre no fruto. Os frutos apresentam composição muito variável e por ser um fruto climatérico (Azzolini, 2002; Mercado-Silva *et al.*, 1998), a goiaba passa por diversas transformações durante o amadurecimento, as quais podem influenciar no desenvolvimento do patógeno. Durante o amadurecimento ocorre a conversão de carboidratos insolúveis em açúcares solúveis necessários ao desenvolvimento do fungo, que sai da quiescência e entra em atividade patogênica (Barkai-Golan, 2001; Prusky, 1996).

Os patógenos apresentaram comportamento semelhante para as variáveis testadas, desenvolvendo-se melhor nos frutos sob altas temperaturas. Em temperaturas elevadas, com apenas 10 dias de incubação, 100% dos frutos mostraram sintomas. A redução na temperatura reduziu a incidência de 100 para 50% no mesmo período, conseqüentemente, prolongando o tempo de incubação, o que ocorreu com frutos armazenados a 15°C.

A faixa favorável à doença foi bastante ampla coincidindo com as temperaturas que ocorrem nos campos de produção e com a presença de frutos no pomar. Porém, o período de molhamento favorável foi a partir de 6 horas, nos experimentos *in vivo*. Esta combinação permite a elaboração de sistemas de previsão, pois limita a época favorável de ocorrência da doença. Considerando que, através da poda e irrigação, os produtores de fruta de mesa colhem a goiaba o ano todo, poder-se-ia propor um sistema de previsão para realizar a aplicação de agroquímicos apenas nas épocas favoráveis à doença, associando a outros métodos de controle como recolhimento de frutos com sintomas do pomar, bem como manter os frutos sob refrigeração, logo após a colheita, entre 10 e 15°C, dependendo do período tempo entre armazenamento e consumo. Segundo Jacomino *et al.* (2003), goiabas 'Kumagai' armazenadas a 10 ou 12°C podem ser conservadas por 14 dias e se armazenadas a 8°C podem ser conservadas por 21 dias. Como já mencionado, o armazenamento em baixas temperaturas logo após a colheita retarda o aparecimento e reduz o desenvolvimento de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, podendo aumentar o tempo de comercialização, bem como reduzir a perda de frutos.

#### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de estudos (Processo 05/57751-1) e financiamento da pesquisa (03/10025-9).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adaskaveg JE, Hartin RJ (1997) Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in

California. *Phytopathology* 87:979-987.

Amaral CS, Salvaia A, Ferreira AFG, Martins MC, Amorim L (2007) Condições favoráveis à germinação e avaliação de meios de cultura e da idade da colônia na esporulação de *Guignardia psidii*. *Summa Phytopathologica* 33(Supl.):32.

Azzolini M (2002) Fisiologia pós-colheita de goiabas 'Pedro Sato': estádios de maturação e padrão respiratório. Dissertação de Mestrado. Piracicaba SP. ESALQ, Universidade de São Paulo.

Barkai-Golan R (2001) Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control. Amsterdam. Elsevier.

Berger RD (1988) The analysis of the effects of control measures on the development of epidemics. In: Kranz J, Rotem J. (Eds.) *Experimental techniques in plant disease epidemiology*. Heidelberg. Springer Verlag. pp. 137-151.

Cavalini FC (2004) Índices de maturação, ponto de colheita e padrão respiratório de goiabas 'Kumagai' e 'Paluma'. Dissertação de Mestrado. Piracicaba SP. ESALQ, Universidade de São Paulo.

Dhingra OD, Sinclair JB (1985) *Basic Plant Pathology Methods*. Boca Raton FL. CRC Press.

Dinh SQ, Chongwungse J, Pongam P, Sangchote S (2003) Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. *Australasian Plant Pathology* 32:533-538.

Estrada AB, Dodd JC, Jeffries P (2000) Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology* 49:608-618.

Everett KR (2003) The effect of low temperatures on *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing body rots of avocados in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 32:441-448.

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

Jacomino AP, Ojeda RM, Kluge RA, Scarpere Filho JA (2003) Conservação de goiabas tratadas com emulsões de cera de carnaúba.

*Revista Brasileira de Fruticultura* 25:401-405.

Junqueira NTV, Costa H (2002) Controle das doenças da goiabeira In: Zambolim L, Vale FXR, Monteiro AJA, Costa H (Eds.) *Controle de Doenças de Plantas: Fruteiras*. Vol. 2 Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. pp. 1247-1277.

Leite RMVBC, Amorim L (2002) Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de *Alternaria* em girassol. *Summa Phytopathologica* 28:14-19.

Martins MC, Amorim L, Lourenço SA, Gutierrez ASD, Watanabe HS (2007) Incidência de danos pós-colheita em goiabas no mercado atacadista de São Paulo e sua relação com a prática de ensacamento de frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 29:245-248.

Mercado-Silva E, Bautista PB, Garcia-Velasco MA (1998) Fruit development, harvest index ripening changes of guavas produced in central Mexico. *Postharvest Biology and Technology* 13:143-150.

Moraes SRG, Massola Jr. NS, Tanaka FAO (2008) Estudos ultraestruturais da penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiabas com diferentes idades. *Summa Phytopathologica* 34(Supl.):27.

Peres NAR, Kuramae EE, Dias MSC, Souza NL (2002) Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology* 150:128-134.

Piccini E, Pascholati SF, di Piero RM (2005) Doenças da goiabeira (*Psidium guajava* L.). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª. Ed. São Paulo SP. Ceres. pp. 401-405.

Prusky D (1996) Pathogen quiescence in post-harvest diseases. *Annual Review of Phytopathology* 34:413-434.

Roger C, Tivoli B, Huber L (1999) Effects of interrupted wet periods and different temperatures on the development of ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*) seedlings. *Plant Pathology* 48:10-18.

Tuite J (1969) *Plant Pathological Methods*. Fungi and Bacteria. Minneapolis MN. Burgess Publishers.

---

Recebido 18 Fevereiro 2008 - Aceito 11 Agosto 2008 - TPP 8017  
 Editor Associado: Marcos P.S. Câmara