

Influência da Temperatura e da Luminosidade no Desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, Agente Causal da Mancha Preta dos Frutos Cítricos

Adriano J. Timossi^{1*}, Antonio de Goes^{1**}, Katia C. Kupper^{2,3}, Ricardo B. Baldassari¹ & Renato F. dos Reis¹

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil; ²Embrapa- Meio ambiente, Jaguariúna, SP

(Aceito para publicação em 28/04/2003)

Autor para correspondência: Antonio de Goes

TIMOSSI, A.J., GOES, A. de, KUPPER, K.C., BALDASSARI, R.B. & REIS, R.F. dos. Influência da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. Fitopatologia Brasileira 28:489-494. 2003.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar sob condições de laboratório, o efeito de temperatura (15, 18, 20, 21, 24, 25, 27, 30, 33 e 35 ± 1 °C) nas condições escuro, luz contínua e fotoperíodo 12/12 h, na produção de pseudotécios de isolados de *Guignardia citricarpa*, provenientes de regiões cítricas dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Discos de folhas de limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*), de 12 mm de diâmetro, foram autoclavados e depositadas (parte abaxial) na superfície do meio de cultura constituído por ágar-água 2%. Foram colocados quatro discos de folhas por placa onde, de forma conjunta e intercalar aos mesmos, depositaram-se dois discos obtidos de colônias de *Phyllosticta citricarpa*, com 21 dias de incubação. Foi, também, estudado o efeito da temperatura e do tempo de incubação (2, 8 e 16 h) na germinação dos ascósporos. Após 21 dias de incubação, a ótima

temperatura ajustada pela função beta generalizada, para produção de pseudotécios deu-se a 26 e 22,5 a 27,5 °C, sob condição de escuro e de luz, respectivamente. Observou-se também produção de pseudotécios a 27 °C em fotoperíodo 12/12 h. Em estudo complementar foi verificado que, aos 19 dias, a 27 °C, cerca de 90% dos pseudotécios haviam alcançado a maturidade, com abundante produção de ascósporos. A maior porcentagem de ascósporos germinados foi constatada na temperatura de 24 °C, após 16 h de incubação. Dentre as vantagens alcançadas, incluem-se a possibilidade (i) da produção massal de ascósporos em curto período de tempo, e (ii) da padronização do inóculo, tanto qualitativa, quanto quantitativa.

Palavras-chave adicionais: *Citrus sinensis*, *Phyllosticta citricarpa*, pseudotécios.

ABSTRACT

Influence of temperature and light on the development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot

Four experiments were carried out at the FCAV-UNESP-Campus of Jaboticabal to evaluate the effect of temperature (15, 18, 20, 21, 24, 25, 27, 30, 33 and 35 ± 1 °C), and three light regimes (dark, continuous light and a 12/12 hour photoperiod) on the production of *Guignardia citricarpa* pseudothecia in citrus (*Citrus* sp.) areas of the States of São Paulo and Rio de Janeiro. In addition, the effects of those temperatures and periods of incubation (2, 8 and 16 h) on ascospore germination were also studied. Disks of Rangpur lime (*Citrus limonia*) leaves measuring 12 mm in diameter were autoclaved and transferred to Petri dishes containing 2% water-agar with the

abaxial surface facing the medium. Four disks were placed in each plate equally spaced from each other. Two disks from colonies of *Phyllosticta citricarpa* with 21 days of incubation were deposited in the center of each plate and incubated at the different temperatures. The effect of temperature on the photoperiod of 12/12 in the germination of ascospore of *G. citricarpa* was also evaluated. The generalized beta function was at 26, 22.5 and 27.5 °C for conditions of darkness and light respectively. Pseudothecium production was observed in the photoperiod of 12/12 h. Mature ascospores were observed after 14 days of incubation, at 27 °C. The highest percentage of germinated ascospores was obtained at temperatures around 24 °C, after 16 h of incubation.

INTRODUÇÃO

A mancha preta dos frutos cítricos (*Citrus* spp.) foi relatada, inicialmente, em 1895 na Austrália, causando perdas consideráveis na variedade Valência, tanto nos frutos ainda nos pomares ou em fase de pós-colheita (Sutton & Waterston, 1966). Desde então, a doença vem causando prejuízos intensos à cultura em várias regiões produtoras do mundo. Nos pomares da Austrália e África do Sul, esta doença foi responsável por

perdas superiores a 80% (Klotz, 1978). A doença encontra-se espalhada por quase todos os continentes como na África (Moçambique, Zimbábue, África do Sul), Ásia (China, Coréia, Hong - Kong, Filipinas, Taiwan, Japão), Oceania (Austrália) e América do Sul (Argentina, Uruguai, Peru e Brasil) (Kotzé, 1988).

No Brasil, a mancha preta foi descrita inicialmente no Estado de São Paulo, a partir de frutas cítricas coletadas em uma feira livre do município de Piracicaba, em 1940 (Averna-Saccá, 1940). A doença, por vários anos, não teve grande importância, certamente devido a uma temporária redução do

*Bolsista da FAPESP

**Bolsista do CNPq

inóculo, resultante da epidemia da tristeza do citros, que redundou na eliminação aproximada de 11 milhões de árvores nas décadas de 1930 e 1940 (Goes, 1998). Na década de 1980, a mancha preta foi relatada no Estado do Rio de Janeiro (Baixada Fluminense), causando perdas consideráveis em tangerina do 'Rio' (*Citrus deliciosa* Ten.) [Robbs *et al.*, 1980] e, posteriormente, em laranjas (*Citrus* spp.) 'Lima', 'Seleta', 'Folha Murcha', 'Natal', 'Pêra-Rio' e 'Valência' (Goes *et al.*, 1990). Em 1992, foram observadas em São Paulo novas constatações do fungo, causando severos prejuízos em pomares localizados nos municípios de Conchal e Mogi-Guaçu (Goes & Feichtenberger, 1993). No Estado do Rio Grande do Sul, a doença foi descrita em 1986, no Vale do Caí, onde, atualmente, causa sérios prejuízos para a citricultura desse Estado (Feichtenberger & Goes, 1998). Recentemente, essa doença foi também descrita em Minas Gerais (Pinta preta, 2001).

A mancha preta dos frutos é causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, cuja fase anamórfica corresponde a *Phyllosticta citricarpa* Van der Aa, anteriormente descrita como *Phoma citricarpa* McAlp. (Kiely, 1948b). O teleomorfo desenvolve-se em folhas de citros caídas no chão, onde são produzidos os ascósporos, principal órgão de disseminação do patógeno (Kiely, 1948a; 1948b; 1949; McOnie 1964a; 1964b; 1965; 1967; Kotzé, 1981; 1988; 1996; Schutte *et al.*, 1997).

De acordo com a literatura, existem dois variantes de *G. citricarpa* que ocorrem em citros, sendo um patogênico e um outro endofítico (McOnie, 1964; Kotzé, 1981). Essas duas formas apresentam padrões distintos quanto à taxa de desenvolvimento vegetativo em meios de cultura, coloração de colônias e morfologia de conídios (Baayen, *et al.* 2002). Sob condições axênicas, o teleomorfo é facilmente produzido pela forma endofítica (*Guignardia mangiferae* A.J. Roy) (Kotzé, 1981), enquanto a forma patogênica o produz com dificuldade (Schüepp, 1961), o que se constitui em grande entrave aos testes de patogenicidade e aos estudos relacionados à interação citros-*G. citricarpa*. Dessa forma, considerando a importância dessa doença e a necessidade de melhor compreensão desse patossistema, avaliou-se o efeito da temperatura, de condições de luminosidade e do tempo de incubação na produção e germinação de ascósporos de diferentes isolados de *G. citricarpa*, sob condições de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram implantados e conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP.

Os isolados de *P. citricarpa* utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir de frutos com sintomas da mancha preta, provenientes de diferentes municípios do Estado de São Paulo e também de Itaboraí, Estado do Rio de Janeiro. Para o isolamento foram utilizados fragmentos de tecidos das bordas das lesões, abrangendo a zona de transição entre a parte doente e sadia, seguido de desinfestação superficial em álcool 50% por 30 s e imersão em solução na diluição do produto

comercial de hipoclorito de sódio em água (1:3), durante 1 min, com enxágüe em água destilada esterilizada. Os tecidos foram depositados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubados à temperatura de 27 °C. A caracterização e identificação dos isolados foram realizadas de acordo com as descrições originais de McOnie (1964a), Sutton & Waterston (1966) e Punithalingam (1974). As culturas estoques do fungo foram mantidas em tubos de ensaios contendo BDA, recobertos com óleo mineral Nujol® esterilizado, seguido de armazenamento em câmara fria à temperatura média de 12 ± 1 °C.

Influência da temperatura na produção de pseudotécios de *Guignardia citricarpa*

Para determinar a influência da temperatura na produção de pseudotécios de *G. citricarpa* sob condições de laboratório, no escuro, foram utilizadas três isolados designados PC1, PC2 e PC3 (Tabela 1). Utilizou-se placas de Petri contendo, aproximadamente, 20 ml de meio ágar-água a 2%. Em cada placa de Petri previamente preparada, foram justapostos quatro discos (12 mm de diâmetro) de folhas de limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). Os discos foram autoclavados a 120 °C, durante 20 min e depositados com a superfície abaxial em contato com o meio. Lateralmente, entre dois discos de folhas, foi depositado um disco de 4 mm de diâmetro contendo meio de cultura + colônia do fungo. Após a deposição, o fungo foi colocado em incubadora do tipo B.O.D. nas temperaturas 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 ± 1 °C, no escuro. Em um outro experimento, utilizaram-se apenas os isolados PC2 e PC3, onde se avaliou a influência das temperaturas 15, 20, 25, 30 35 ± 1 °C na produção de pseudotécios de *G. citricarpa*, sob luz contínua. Ambos experimentos foram avaliados após 21 dias de incubação e consistiu na contagem do número de pseudotécios ou corpos de frutificação contido nos quatro discos foliares justapostos no meio de cultura. No experimento realizado no escuro, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em um esquema fatorial sendo, sete temperaturas, três isolados e cinco repetições. Para o experimento realizado sob luz contínua, utilizou-se um esquema fatorial, porém, com dois isolados, onde cada unidade experimental foi representada por uma placa de Petri. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$), usando a transformação $\sqrt{x+0,5}$. Em função da temperatura, foi ajustado o modelo beta generalizado, $y = b^1((x - b_2)^{b_4})((b_3 - x)^{b_5})$, descrito por Hau & Kranz (1990), onde y representa a produção de pseudotécios, x , a temperatura, b_2 e b_3 representam respectivamente, as temperaturas mínima e máxima, e b^1 b^4 b^5 são parâmetros sem significado biológico. Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTIC para Windons versão 6.0.

Influência da luminosidade na produção de pseudotécios de *Guignardia citricarpa*

Além dos isolados utilizados no Experimento anterior (PC1, PC2 e PC3), foram também empregados os isolados PC4 e PC5 (Tabela 1).

O experimento constou da utilização da mesma metodologia descrita, sendo porém avaliado o efeito de três

condições de luminosidade: claro (iluminação contínua obtida através de duas lâmpadas fluorescentes de 20 W), escuro (ausência total de luz a partir do momento da incubação) e fotoperíodo de 12/12 h. Pelo fato de a temperatura de 27 °C ter se mostrado a mais favorável para a produção de pseudotécios e ascósporos, conforme ensaios prévios, a incubação dos isolados do fungo deu-se nessa temperatura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial sendo três condições de luminosidade e cinco isolados, com cinco repetições. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri contendo quatro discos de folhas de limoeiro 'Cravo'. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se a transformação $\log(x+1)$.

Cronologia das fases de produção de ascósporos de *Guignardia citricarpa*

Para realização do presente experimento, quatro discos de 12 mm de diâmetro, obtidos de folhas de limoeiro 'Cravo', previamente autoclavados a 120 °C, por 20 min, foram justapostos com a face abaxial sobre a superfície do meio de cultura constituído por ágar-água 2%, acrescido de 5 g de dextrose. Posteriormente, entre os discos de folhas, foram colocados discos contendo meio de cultura e colônias do isolado PC4, depositados de forma equidistantes entre si, em relação aos discos foliares. Em seguida, procedeu-se a sua incubação em incubadora do tipo B.O.D., à 27 ± 1 °C, sob fotoperíodo 12/12 h.

A partir do oitavo dia de incubação, e sempre em intervalo de dois dias, foram retiradas duas placas para avaliação da produção de pseudotécios, ascos e ascósporos. Nesta ocasião, as estruturas semelhantes a pseudotécios foram removidas e depositadas em lâminas para microscopia, as quais foram analisadas sob microscópio ótico. Posteriormente, essas estruturas foram esmagadas e analisadas quanto à presença de ascósporos. As avaliações consistiram da mesma metodologia empregada no experimento anterior, com exceção de que as contagens dos ascósporos foram realizadas aos 14 dias da incubação.

Influência da temperatura e tempo de incubação na germinação de ascósporos de *Guignardia citricarpa*

Para a produção dos pseudotécios, utilizou-se o isolado PC4, o qual foi cultivado em meio ágar-água 2% acrescido de 5 g de dextrose, em placas de Petri, sob luz contínua.

Aos 22 dias de incubação a 27 °C, sob ambiente de luz contínua, as placas foram submetidas à temperatura de 6 °C, por 4 h, no escuro, retornando à temperatura de 27 °C, por mais 4 h, sob luz contínua. Para a coleta dos ascósporos ejetados e determinação do percentual de germinação dos mesmos, foram utilizadas lâminas com ágar-água 2%, fixadas na superfície interna da tampa das placas, antes que as culturas fossem submetidas ao choque de temperatura para formação e liberação dos ascósporos. Após cada intervalo de 30 min, as lâminas foram analisadas quanto à presença de ascósporos.

No intervalo em que se verificara a ejeção dos ascósporos, as lâminas foram transferidas para incubadora do tipo B.O.D., calibradas às temperaturas de 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 ± 1 °C, e mantidas no escuro. As avaliações do percentual de germinação foram realizadas em intervalos de 2, 8 e 16 h após incubação, pela leitura dos 100 primeiros ascósporos visualizados sob microscópio óptico, com aumento de 400 vezes. Os ascósporos foram enquadrados em duas categorias: germinados - quando o tubo germinativo apresentava comprimento igual ou superior à largura mediana dos ascósporos, em sua porção mais larga, e não germinados, caracterizados pela ausência de alteração na morfologia dos mesmos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial, sendo três intervalos de tempo e sete temperaturas, com oito repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($p=0,01$), sendo ajustado também segundo um modelo polinomial quadrático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência da temperatura na produção de pseudotécios de *Guignardia citricarpa*

Foi verificada diferença estatisticamente significativa na interação temperatura versus isolados ($p=0,05$) quanto ao número de pseudotécios produzidos em ambas condições estudadas. A temperatura influenciou no número de pseudotécios produzidos em ambos experimentos, cujos efeitos encontram-se representados através da função beta generalizada, para condições no escuro e luz contínua (Tabela 2), conforme demonstrado nas Figuras 1 e 2, respectivamente. O maior número de pseudotécios produzidos no escuro, foi obtido nas temperaturas de 26 a 27 °C para os três isolados (Figura 1 A, B e C). Conforme ajuste da função beta generalizada, as temperaturas mínimas e máximas para a produção de pseudotécios nesta condição foram 15 e 33 °C, respectivamente (Tabela 2). Na condição de luz contínua, a maior produção de pseudotécios foi obtida na temperatura de 27,5 °C para o isolado PC2, enquanto que para o isolado PC3, a melhor temperatura foi verificada a 22,5 °C, conforme ilustrado nas Figuras 2 A e 2 B, respectivamente. O ajuste da função beta generalizada para a determinação da estimativa da produção mínima de pseudotécios, para o isolado PC2, na condição de luz contínua, foi menos preciso pelo fato do modelo subestimar a temperatura.

TABELA 1 - Caracterização de isolados de *Phyllosticta citricarpa* utilizados nos experimentos

Isolado	Procedência	Hospedeiro	Tecido	Data de isolamento
PC1	Conchal SP	Laranja 'Pera-Rio'	Folhas	08/97
PC2	Itaboraí RJ	Laranja 'Dancy'	Frutos	09/97
PC3	Mogi-Guaçu/SP	Laranja 'Natal'	Frutos	09/97
PC4	Itaboraí RJ	Laranja 'Valência'	Frutos	01/98
PC5	Itaboraí/RJ	Laranja 'Pamkan'	Frutos	04/98

TABELA 2 - Coeficiente de determinação (R^2) e parâmetros estimados pelo modelo beta generalizado, $y = b_1((x-b_2)b_4)/((b_3-x)b_5)$, onde y = a produção de pseudotécios, x = temperatura, b_2 e b_3 = temperaturas mínima e máxima, e b_1 b_4 b_5 = parâmetros sem significado biológico para os isolados de *Guignardia citricarpa* avaliados, ajustada para diferentes isolados nas condições no escuro e luz contínua

Isolado	Parâmetros do modelo beta generalizado											
	Escuro						Luz					
	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	R^2	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	R^2
PC1	0,00008	15,00	33,00	3,854	2,542	0,98	-	-	-	-	-	-
PC2	0,00009	15,00	33,00	3,772	2,472	0,77	0,001	5,95	35,17	3,236	1,261	0,90
PC3	0,00029	15,00	33,00	3,591	1,847	0,95	0,00005	14,58	40,29	1,658	4,275	0,99

A maior produção de pseudotécios, em condições de laboratório, ocorreu sob luz contínua independente dos isolados avaliados. Tais dados demonstram que esse fungo encontra boas condições para seu desenvolvimento nas regiões de clima tropical, especialmente no Estado de São Paulo, reforçando prognósticos sobre as suas potencialidades destrutivas nas condições do Brasil (Kotzé, 1981).

Influência da luminosidade na produção de pseudotécios de *Guignardia citricarpa*

Houve influência da luminosidade na produção de pseudotécios (Tabela 3), onde, através da luz contínua ou fotoperíodo de 12/12 h, à 27 °C, obteve-se o maior número dessas estruturas. Essa resposta quanto à influência da luz contínua, mostra-se convergente àquela obtida por Aguilar-Vildoso (C.I. Aguilar-Vildoso, comunicação pessoal, 1999), o qual verificou que, em ambiente semelhante, houve grande produção de ascósporos do fungo. Tais dados também se assemelham aos obtidos por Moran Lemir *et al.* (2001), os quais obtiveram produção expressiva de ascósporos, quando a cultura foi submetida a 27 °C, em fotoperíodo de 12/12 h, por oito dias e, em seguida, transferida para o escuro a 6 °C, durante 21 dias.

Quanto às demais alternativas avaliadas, não há nenhum registro pertinente na literatura, de tal forma que o presente trabalho constituiu-se no primeiro a fazer tal abordagem.

Cronologia das fases de produção de ascósporos de *Guignardia citricarpa*

Para o estudo da cronologia das fases de produção de ascósporos de *G. citricarpa*, foram realizadas três avaliações. A primeira avaliação foi realizada após oito dias de incubação na temperatura de 24 °C, e consistiu no rompimento de dez pseudotécios. Nesta fase, observou-se apenas a presença de ascos imaturos e de forma alongada. Na segunda avaliação, realizada aos dez dias de incubação, não foram constatadas diferenças marcantes quanto às estruturas observadas por ocasião da primeira avaliação. Na terceira avaliação, aos 12 dias de incubação, foram observados ascos ainda imaturos que, nessa ocasião mostravam-se de forma alongada e continham ascósporos ainda em processo de formação. Aos 14 dias de incubação, foi observada a presença de ascósporos característicos, embora com predomínio de ascos imaturos. Entretanto, aos 19 dias, 90% dos pseudotécios continham a

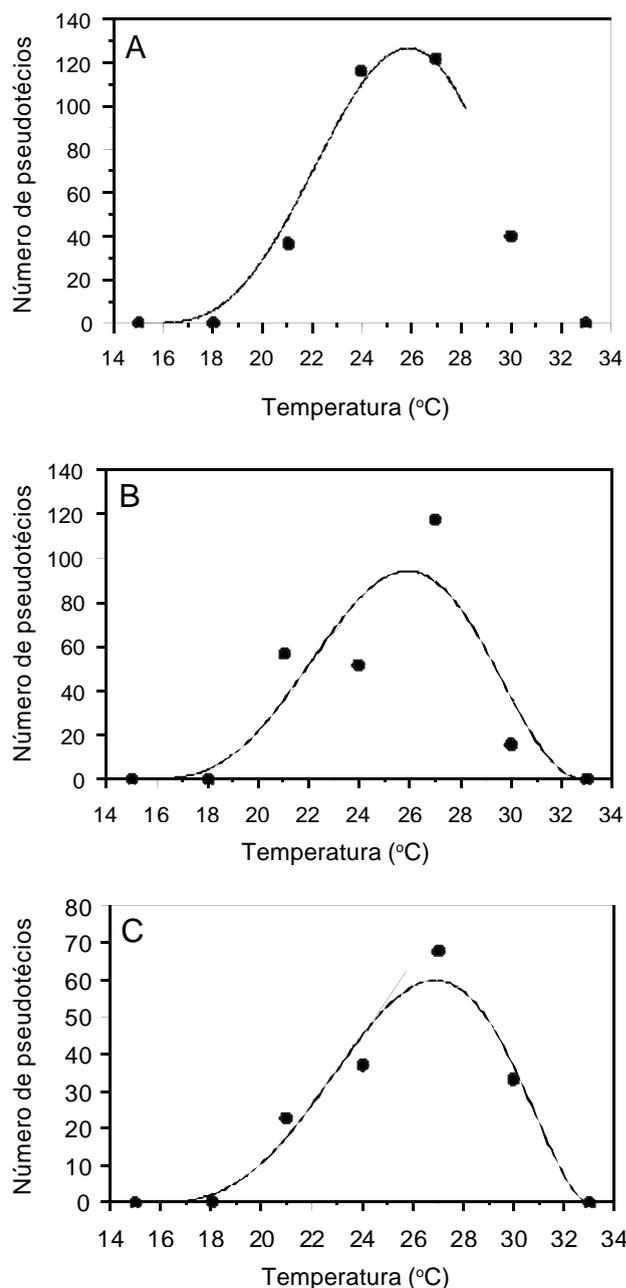


FIG. 1 - Produção de pseudotécios (círculos cheios) dos isolados de *Guignardia citricarpa* PC1 (A), PC2 (B) e PC3 (C) no escuro, em função da temperatura, modelo de ajuste (linha contínua) e em função beta generalizada.

presença de ascos maduros, acompanhados de ascósporos. Nas avaliações subseqüentes, a presença de pseudotécios ainda imaturos foi desprezível, sendo predominante a presença de ascos maduros, contendo ascósporos em abundância.

Influência da temperatura e tempo de incubação na germinação de ascósporos de *Guignardia citricarpa*

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($\alpha=0,001$ e $R^2=0,71$) entre as diferentes temperaturas e o tempo de incubação na germinação dos ascósporos de *G. citricarpa*. Os dados obtidos ajustaram-se de forma mais adequada segundo o seguinte modelo polinomial quadrático:

$$Z = -113,428 + 10,711 * X + 1,439 * Y - 0,224 * X^2 - 0,021 * X * Y - 0,004 Y^2$$

onde, Z = porcentagem de ascósporos germinados, X = temperatura (°C), e Y = tempo de incubação (h)

O percentual de germinação dos ascósporos de *G. citricarpa* aumentou à medida em que se estendeu o tempo de incubação, numa faixa entre 2 e 16 h (Figura 3). Com relação às diferentes temperaturas, observou-se que, na faixa entre 15 a 24 °C, houve um aumento progressivo no percentual de

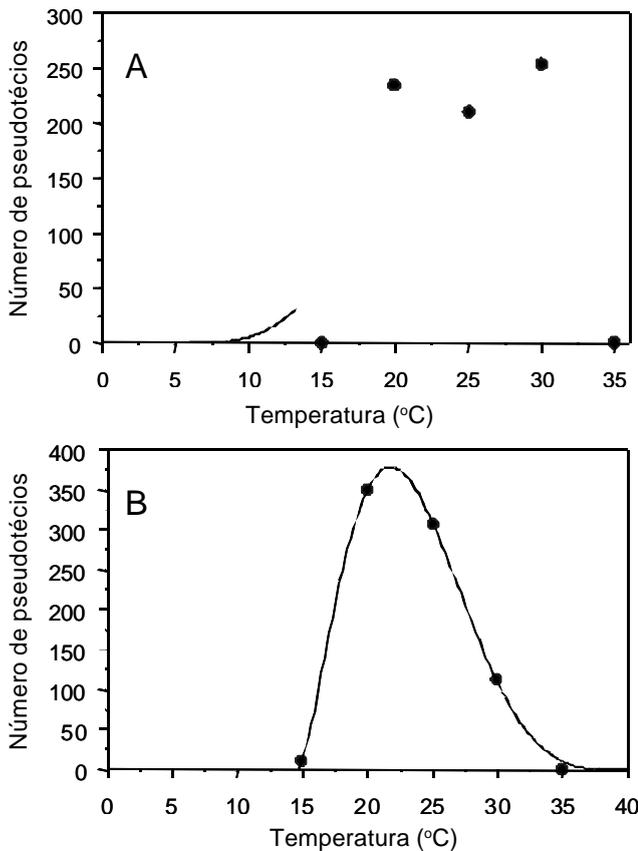


FIG. 2 - Produção de pseudotécios (círculos cheios) dos isolados de *Guignardia citricarpa* PC2 (A) e PC3 (B) sob luz contínua, em função da temperatura, modelo de ajuste (linha contínua) e em função beta generalizada.

TABELA 3 - Efeito da luminosidade no número de pseudotécios produzidos por cinco isolados de *Guignardia citricarpa* na temperatura de 27 °C

Luminosidade	Isolados					Média
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	
Fotoperíodo	147,29	170,35	146,06	120,60	146,84	146,23a ¹
Claro	129,77	214,82	175,51	164,73	143,30	165,63a
Escuro	25,69	8,70	29,07	11,30	39,87	22,92b
Médias	160,91	131,29	116,88	98,89	110,00	

¹Dados transformados em log (x+1); ²Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $\alpha=0,05$).

ascósporos germinados, seguido de decréscimo a partir das temperaturas superiores a 27 °C. As maiores médias de germinação foram obtidas em temperatura próxima de 24 °C, enquanto que, em temperaturas extremas, 15 e 33 °C, foram constatados os menores percentuais de germinação.

De um modo geral, verificou-se que houve resposta à influência da temperatura e tempo de incubação na germinação dos ascósporos de *G. citricarpa*, constatando-se que a mesma foi mais expressiva a 24 °C, após 16 h de incubação. Esses resultados demonstram que, essa temperatura, além de se mostrar favorável à produção dos ascósporos, mostra-se também como a mais viável para a sua germinação.

Embora, de acordo com a literatura, a produção de pseudotécios de *G. citricarpa* em cultivo artificial seja ausente (McOnie, 1967), os resultados obtidos no presente trabalho, juntamente àqueles publicados por Moran Lemir *et al.* (2001), constituem-se em alternativas importantes na obtenção do teleomorfo do fungo e, conseqüentemente, à produção de ascósporos. Dentre algumas das vantagens do presente trabalho incluem-se a possibilidade (i) da produção massal de ascósporos em curto período de tempo, ao contrário de métodos anteriores que levavam 50 a 180 dias e (ii) da padronização do inóculo de forma qualitativa e quantitativa.

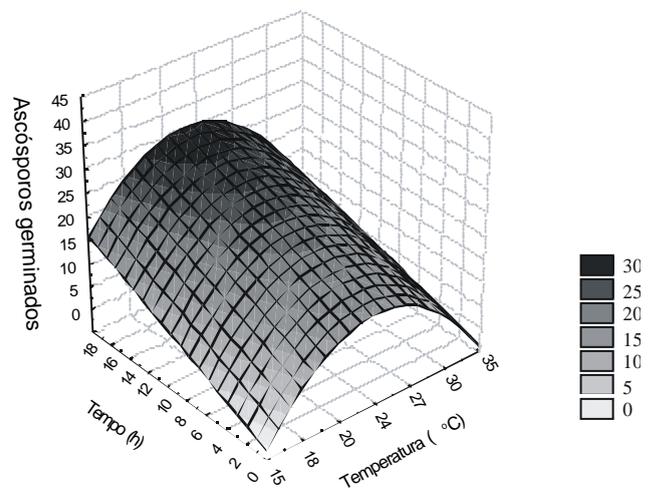


FIG. 3 - Efeito de diferentes temperaturas e tempo de incubação na germinação de ascósporos de *Guignardia citricarpa*.

LITERATURA CITADA

- AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo *Phoma citricarpa*. Revista de Agricultura 15:668-674. 1940.
- BAAYEN, R.P., BONANTS, P.J.M., VERKLEY, G., CARROLL, G.C., van der Aa, H. A., de WEERDT, M., van BROUWERSHAVEN, I.R., SCHUTTE, G.C., MACCHERONI, W., Jr., GLIENK de BLANCO, C. & AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of wood plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). Phytopathology 92:464-477. 2002.
- FEICHTENBERGER, E. & GOES, A. de. Manual técnico sobre pinta preta. Araraquara:Fundecitrus, 1998.
- GOES, A. de & FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira 18:318. 1993 (Resumo).
- GOES, A. de, GRAÇA, J., BARROS, J.C. da S.M. de & PINHEIRO, J.E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina 'Rio' (*Citrus deliciosa*), ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa* Kiely). Fitopatologia Brasileira 15:73-75. 1990.
- GOES, A. de. Controle da mancha preta dos frutos cítricos. Revista Laranja 19:305-320. 1998
- HAU, B. & KRANZ, J. Mathematics and statistics for analyses in epidemiology. In: Kranz, J. (Ed). Epidemics of plant diseases. Berlin. Springer. 1990. pp.12-52.
- KIELY, T.B. Control and epiphytology of black spot of citrus on the central coast of New South Wales. New South Wales:Department of Agriculture Science Bulletin, 1948a.
- KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp. the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales 73:249-92. 1948b.
- KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard. In: Reuther, W., Calavan, E.C & Carman, G.E. (Eds.) The Citrus Industry. Riverside:University of California. 1978. pp.1-66.
- KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. Plant Disease 65:945-950. 1981.
- KOTZÉ, J.M. Black spot. In:Whiteside, J.O., Garnsey, S.M & Timmer, L.W. (Eds). Compendium of Citrus Disease. St Paul. APS Press. 1988. pp.10-12.
- KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. Proceeding International Society of Citriculture, 1996. pp.1296-1299.
- McONIE, K.C. Orchard development and discharge of ascospores of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation the control of citrus black spot. Phytopathology 54:1448-1453. 1964a.
- McONIE, K.C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. Phytopathology 54:64-67. 1964b.
- McONIE, K.C. Source of infection for black spot of citrus. The South African Citrus Journal. june:5-9. 1965.
- McONIE, K.C. Germination and infection of citrus and other hosts of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. Phytopathology 57:743-746. 1967.
- MOREIRA, C.S. & MOREIRA, S. História da Citricultura no Brasil. Citricultura Brasileira 1:1-4. 1991.
- MORAN LEMIR, A.H., STADNIK, M.J., BUCHENAUER, H. & CANTON, N.V. In vitro production of ascospores and pathogenicity of *Guignardia citricarpa*, causal agent of citrus black spot. Summa Phytopathologica 26:374-376. 2000.
- PUNITHALINGAM, E. Studies on sphaeropsidales in culture. II. Mycological papers 136:1-63. 1974.
- PINTA PRETA EM MG. Informativo Centro de Citricultura 79:2. 2001.
- ROBBS, C.F., PIMENTEL, J.P. & RIBEIRO, R.L.D. A mancha preta dos frutos cítricos causada por *Phoma citricarpa*. Anais, 13^o Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Itaguaí, RJ. 1980. p.455.
- SCHÜEPP, H. Untersuchungen über *Guignardia citricarpa* Kiely, den Erreger der Schwarzfleckenkrankheit auf Citrus. Phytopathologische Zeitschrift 40:258-271. 1961.
- SCHUTTE, G.C., BEETON, K.V. & KOTZÉ, J.M. Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. Plant Disease 81:851-854. 1997.
- SUTTON, B.C. & WATERSTON, J.M. *Guignardia citricarpa* Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Surrey, England, Kew:Commonwealth Mycological Institute n^o.85. 1966.