

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Sobrevivência, colonização, detecção e monitoramento de
Colletotrichum acutatum em folhas de citros**

Wagner Vicente Pereira

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2013**

Wagner Vicente Pereira
Engenheiro Agrônomo

Sobrevivência, colonização, detecção e monitoramento de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Pereira, Wagner Vicente

Sobrevivência, colonização, detecção e monitoramento de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros / Wagner Vicente Pereira.- - Piracicaba, 2013.
118 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. *Citrus sinensis* 2. Podridão Floral dos Citros 3. *Colletotrichum gloeosporioides*
4. PCR em tempo real I. Título

CDD 634.3
P436s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

Dedico

À minha mãe, Rute, pessoa iluminada, exemplo de dedicação, amor e zelo incondicionais à família e àqueles que cruzam seu caminho. Passou toda sua vida ensinando os filhos a serem pessoas boas e fazer o bem. Não há anjo no céu que se compare a você ...

Ao meu pai, José, pessoa bondosa, símbolo de integridade, exemplo de honestidade, retidão de caráter e compromisso com seus valores. Você é quem eu gostaria de ser quando crescer ...

Às minhas irmãs, Eliane e Ivone, que me ensinaram tudo o que não se aprende na escola e, com certeza, eu sou muito mais feliz graças a isso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida. Que minhas atitudes sejam, diariamente, o reflexo desse sentimento de gratidão.

À todos os meus familiares, pelo apoio, compreensão e constantes estímulos.

Ao professor Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior pela orientação, paciência, pelos ensinamentos, amizade e, pelo agradável convívio.

Aos meus primos, Manuel e Cecília, pelo apoio constante e agradável convivência em Piracicaba.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pela oportunidade de realização do doutorado.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pelos valiosos ensinamentos nas disciplinas, por todas as conversas enriquecedoras e experiências compartilhadas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP: Ananias Cruz, Carolina Pani, Carlos Bragança, Flávia Rogério, Gustavo Ogasawara, Hugo Tozze, Juliana Ramiro, Maria Eugenia, Paulo Santos, Roberto Chapola, Sérgio Pérez, Sylvia Moraes pela amizade e pelos bons momentos de descontração.

Aos amigos da pós graduação, pelo convívio diário e por todos os bons momentos compartilhados, em especial à Ana Alves, Greicy Sarria, Maria Cândida, Mauro Bonfim e Rafaela Roma.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, sempre prestativos quando necessários, em especial à Fabiana Wolak.

Ao Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Espanha, pela a oportunidade de realização do estágio.

Ao amigo Dr. Edson Bertolini, pela orientação, paciência e pelo agradável convívio durante minha permanência em Valencia.

Ao Dr. Mariano Cambra, por sua seriedade profissional, pela amizade e por todos os momentos de descontrações convividos.

À Dr.^a María Milagros, pela excelente recepção e convívio durante minha estadia em Valencia.

Aos amigos Dr. Antônio Olmos, Msc. Aline Sauer e a técnica Maricarmen, pela amizade e por todos os bons momentos de descontração.

Ao Dr. Antônio Vicent, por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Micologia do IVIA, para que fossem conduzidos os ensaios de detecção.

A mis amigos del IVIA: Belén Álvarez, Dissolu Daniel, Gabriela Teresani, Josep Navarro, Pablo Lopez, Silvia Barbé, Vanessa Kava, Tahise Magalhães, Mariana Vidal, Aline Sauer. Los echo de menos!

Ao pesquisador Dr. Geraldo J. S. Júnior, do Fundecitrus, pelas dicas, colaborações e coletas das amostras para condução dos ensaios de monitoramento.

Ao prof. Dr. Francisco Tanaka pelo auxílio na condução dos ensaios de colonização.

Ao biólogo Gilmar Valente e a Farmacêutica Karla Ribeiro, pelo auxílio e bom convívio, durante as análises realizadas ao microscópio confocal, no Núcleo de Microscopia e Microanálise, da Universidade Federal de Viçosa.

Ao prof. Luis Aranha pela disponibilidade de uso do termociclador em tempo real.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PDSE-CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

...

Um dia você aprende que o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.

[...]

Aprende a construir todas as suas estradas no hoje ... o amanhã é incerto...

[...]

Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha...

[...]

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

[...]

William Shakespeare

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	19
Referências	21
2 SOBREVIVÊNCIA E COLONIZAÇÃO DE <i>Colletotrichum acutatum</i> EM FOLHAS DE CITROS.....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	24
2.1 Introdução	24
2.2.1 Revisão Bibliográfica.....	26
2.2.2 Material e métodos.....	30
2.2.2.1 Sobrevivência de <i>Colletotrichum acutatum</i> em folhas de citros	30
2.2.2.1.1 Obtenção, condições de crescimento e manutenção das culturas fúngicas	30
2.2.2.1.2 Extração do DNA e condições da PCR	31
2.2.2.1.3 Obtenção da água de lavagem de pétalas (ALP).....	32
2.2.2.1.4 Condução dos ensaios	33
2.2.2.1.4.1 Ensaio em ambiente controlado	33
2.2.2.1.4.2 Ensaio em casa de vegetação.....	35
2.2.2.1.4.3 Ensaio sob condições do ambiente	36
2.2.2.2 Colonização de <i>Colletotrichum acutatum</i> em folhas de citros	37
2.2.2.2.1 Condução do ensaio.....	38
2.2.2.2.2 Preparo das amostras para análise ao microscópio de luz	38
2.2.2.2.3 Preparo das amostras para análise ao microscópio eletrônico de transmissão	39
2.2.2.2.4 Preparo das amostras para análise ao microscópio confocal	40
2.2.3 Resultados	40
2.2.3.1 Sobrevivência de <i>Colletotrichum acutatum</i> em folhas de citros	40
2.2.3.1.1 Sobrevivência de <i>Colletotrichum acutatum</i> em condições controladas	40
2.2.3.1.2 Sobrevivência de <i>Colletotrichum acutatum</i> em condições de casa de vegetação com e sem molhamento foliar	46

2.2.3.1.3 Sobrevivência de <i>Colletotrichum acutatum</i> em condições ambientais.....	47
2.2.3.2 Colonização de <i>Colletotrichum acutatum</i> em folhas de citros.....	52
2.2.4 Discussão	56
2.3 Conclusões	59
Referências.....	60
3 DETECÇÃO E MONITORAMENTO DE <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EM FOLHAS DE CITROS.....	65
Resumo	65
Abstract.....	66
3.1 Introdução.....	67
3.2 Material e métodos	70
3.2.1 Detecção e quantificação de <i>C. acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i> em folhas de citros	70
3.2.1.1 Coleção de isolados e obtenção do DNA	70
3.2.1.2 Iniciadores, sondas TaqMan® e condições da PCR convencional, Nested-PCR, PCR em tempo real e PCR multiplex em tempo real	73
3.2.1.3 Especificidade dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizados na PCR em tempo real.....	75
3.2.1.4 Sensibilidade comparativa entre a PCR convencional, Nested-PCR e PCR em tempo real.....	75
3.2.1.5 Sensibilidade dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizados na PCR em tempo real e PCR multiplex em tempo real	76
3.2.1.6 - Avaliação de distintos métodos de preparo de amostras e de obtenção do DNA para a detecção e quantificação de <i>C. acutatum</i> em folhas de citros	77
3.2.1.7 Sensibilidade dos métodos de obtenção do DNA.....	79
3.2.1.8 Avaliação e validação de métodos para a detecção de <i>C. acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i>	79
3.2.2 Monitoramento quantitativo de <i>C. acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i> em folhas de citros oriundas de pomares de laranjeira no Estado de São Paulo	81
3.2.2.1 Seleção das áreas de estudo	81
3.2.2.2 Amostragem	81
3.2.2.3 Preparo das amostras.....	81
3.2.2.4 Obtenção do DNA, análises das amostras pela PCR multiplex em tempo real e avaliação dos dados	82

3.3 Resultados	82
3.3.1 Especificidade dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizados na PCR em tempo real	82
3.3.2 Sensibilidade comparativa entre a PCR convencional, Nested-PCR e PCR em tempo real	84
3.3.3 Sensibilidade e eficiência dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizados para a PCR em tempo real e PCR multiplex em tempo real	86
3.3.4 Avaliação de distintos métodos de preparo de amostras e de obtenção do DNA para a detecção e quantificação de <i>C. acutatum</i> em folhas de citros	91
3.3.5 Sensibilidade de métodos de obtenção do DNA	93
3.3.6 Avaliação e validação de métodos para a detecção de <i>C. acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i>	94
3.7 Monitoramento quantitativo de <i>C. acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i> em folhas de citros em pomares de laranjeira no Estado de São Paulo.....	99
3.4 Discussão.....	104
3.5 Conclusões.....	112
Referências	112

RESUMO

Sobrevivência, colonização, detecção e monitoramento de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros

A migração da citricultura paulista das regiões norte e central para a região sudoeste, tem submetido a cultura à clima mais chuvoso e, conseqüentemente, à maior ocorrência da podridão floral dos citros (PFC). A PFC, cujo agente causal é *C. acutatum*, induz a abscisão de frutos jovens e pode causar perdas de 100%. Alguns componentes do monociclo dessa doença ainda encontram-se indefinidos. Os processos de sobrevivência e colonização têm sido sustentados por evidências oriundas de experimentos não conclusivos. Até o momento, os métodos de detecção não têm sido eficazes para detectar o patógeno em folhas assintomáticas de citros, além de não serem capazes de quantificá-lo. Diante dessas lacunas, esse trabalho buscou avaliar o período de sobrevivência do patógeno na superfície de folhas assintomáticas entre as floradas; verificar se o patógeno coloniza os tecidos das folhas de citros; estabelecer um método sensível para detecção e quantificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* na superfície foliar e; monitorar quantitativamente os patógenos em campos de produção de citros no Estado de São Paulo. A sobrevivência do patógeno foi avaliada em condições controladas, casa de vegetação e condições ambientais. Foi notado que o patógeno sobreviveu até sete meses em condições controladas, até dez meses em casa de vegetação e até seis meses sob condições ambientais. Chuvas regulares associadas ao molhamento foliar prolongado, auxiliaram na manutenção e sobrevivência do inóculo na superfície foliar. O processo de colonização do patógeno foi investigado por microscopia de luz, transmissão e confocal. Não foi observada colonização do patógeno em tecidos foliares. O *peg* de penetração proveniente dos apressórios penetrou a cutícula e ficou restrito numa camada péctica, acima da parede periclinal da epiderme. Diferentes métodos foram avaliados para a detecção e quantificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em folhas de citros. Foi desenvolvida uma PCR em tempo real (qPCR) e uma PCR multiplex em tempo real (qPCR multiplex), ambas específicas e altamente sensíveis à detecção dos patógenos. O DNA da planta não influenciou na amplificação da qPCR. As qPCR foram muito mais sensíveis que a PCR convencional e Nested-PCR. Distintos métodos para processamento das amostras e para obtenção do DNA foram avaliados. O método do congelamento e a maceração do tecido foliar, foram os mais eficazes para o processamento da amostras e, a extração do DNA (CTAB ou Qiagen) foi melhor método de obtenção do DNA para quantificação dos patógenos. O spot e extração do DNA foram validados para a detecção dos patógenos tanto para a qPCR quanto para a qPCR multiplex. O monitoramento dos patógenos foi realizado em áreas localizadas em duas distintas regiões do Estado de São Paulo. Foi notado considerável aumento na quantidade de inóculo quando ocorreram chuvas regulares, com muitos dias com chuvas. O inóculo se concentrou no interior da copa em épocas com baixo volume de chuvas. A quantidade de inóculo de *C. acutatum* na área localizada em Santa Cruz do Rio Pardo foi consideravelmente maior que na área de Barretos e ambas apresentaram quantidades similares de *C. gloeosporioides*.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Podridão Floral dos Citros; *Colletotrichum gloeosporioides*; PCR em tempo real

ABSTRACT

Survival, colonization, detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* on citrus leaves

The migration of the citrus culture in São Paulo State from the northern and central regions to the south-western region submitted the culture to a wetter climate and, consequently, a higher incidence of postbloom fruit drop (PFD). PFD, whose causal agents are *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*, induces the abscission of young fruits and can cause loss of 100% of the culture. Some monocycle components of this disease are still undetermined. The survival and colonization processes are supported by evidences from inconclusive experiments. To date, the detection methods have not been effective in detecting and quantifying the pathogen in asymptomatic citrus leaves. This study aimed to assess the survival period of *C. acutatum* on the surface of asymptomatic leaves between the flowering seasons, to verify whether the pathogen colonizes the tissues of citrus leaves of citrus, to establish a sensitive method for detection and quantification of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* on leaves surface and to monitor quantitatively the pathogens in citrus orchards in the State of São Paulo in Brazil. The survival of the pathogen was evaluated under controlled conditions, in a greenhouse and in environmental conditions. The pathogen survived for seven months under controlled conditions, ten months in a greenhouse and six months under environmental conditions. Regular rainfall associated with the prolonged leaf wetness favored the maintenance and survival of the inoculum on the leaf surface. The colonization process of the pathogen was investigated by light, confocal and transmission microscopy. Pathogen colonization was not observed on leaf tissues. The penetration peg from appressoria penetrated the cuticle and was restricted in a pectic layer on the periclinal epidermal wall. Different methods were evaluated for the detection and quantification of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* on leaves of citrus plants. It was developed a real-time PCR (qPCR) and a real-time multiplex PCR (qPCR multiplex), both specific and highly sensitive in the detection of pathogens. The plant DNA did not influence the qPCR amplification. The qPCRs were much more sensitive than the conventional PCR and Nested-PCR. Different methods for sample processing and for DNA extraction were evaluated. The freezing and maceration methods of foliar tissue were the most effective for sample processing and the DNA extraction (CTAB or Qiagen) was best method for extracting the DNA for pathogen quantification. The Spot and DNA extraction were validated for the detection of pathogens for both qPCR and multiplex qPCR. The monitoring of pathogens was carried out in two separate regions of the State of São Paulo in Brazil. It was observed a considerable increase in the number of inoculum when regular rainfall occurred, with many rainy days. The inoculum was concentrated within the tree canopy in seasons with low volume of rainfall. The number of inoculum of *C. acutatum* the at region of Santa Cruz do Rio Pardo was considerably higher than in the region of Barretos and both showed similar amounts of *C. gloeosporioides*.

Keywords: *Citrus sinensis*; Postbloom Fruit Drop; *Colletotrichum gloeosporioides*; Real-time PCR

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país. O Brasil tem sido líder mundial de produção de laranjas, com 18.564 milhões de toneladas (safra 2012/2013), seguido pelos Estados Unidos, com 8.014 milhões de toneladas (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2013). No Brasil, o Estado de São Paulo se destaca como o maior produtor nacional de cítricos, com aproximadamente 74% da produção nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013). As regiões Norte, Nordeste e Centro do Estado de São Paulo respondem por 60 a 70% da produção de citros do Estado (NEVES et al., 2007). Entretanto, nos últimos anos, tem-se verificado a migração da citricultura dessas tradicionais regiões de plantio de citros para novas áreas ao sudoeste. Essa migração, deve-se, sobretudo, a melhor distribuição de chuvas nessa região, que reflete em redução nos custos de produção, devido à redução nos gastos com irrigação (NEVES et al., 2010). No entanto, o clima dessa região é favorável à ocorrência da podridão floral dos citros (PFC).

Os agentes causais da PFC são *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Os sintomas da PFC caracterizam-se pela presença de lesões necróticas de coloração róseo-alaranjadas nas pétalas das flores abertas. Após a infecção das flores, os frutos recém formados podem cair e os cálices ficam aderidos ao disco floral e, comumente, são chamados de “estrelinhas” (TIMMER et al., 1994).

Para melhorar o manejo da doença, é fundamental que se tenham definidos claramente, os processos que compõe o monociclo da doença. No entanto, alguns desses processos, ainda encontram-se indefinidos.

Experimentos realizados sob condições controladas, mostraram que o patógeno pode sobreviver na própria planta, aderido às folhas, na forma de apressórios. No entanto, como os ensaios foram conduzidos por até um mês, não foi esclarecido se essa forma de sobrevivência é eficiente para manter o patógeno viável durante períodos mais prolongados, de cerca de um ano, que corresponde ao intervalo entre as floradas (AGOSTINI; TIMMER, 1992; ZULFIQAR; BRLANSKY;

TIMMER, 1996; TIMMER; BROWN, 2000). Dessa forma, determinar a fonte e quantificar o tempo de sobrevivência do inóculo é indispensável na definição de estratégias de manejo da doença, uma vez que a eliminação do inóculo como tática de controle só pode ser executada se o mesmo for bem conhecido, o que não é o caso até o momento, para a podridão floral dos citros.

Trabalhos sugerem que os apressórios formados na superfície foliar, podem emitir uma hifa infectiva capaz de colonizar as células epidérmicas. Essa hifa estaria restrita dentro das células da epiderme, local onde o apressório retiraria nutrientes para a manutenção da sua viabilidade por um longo período. Essas evidências partiram de ensaios baseados no isolamento do patógeno após desinfestação superficial do tecido foliar e, pela constatação, ao microscópio, de um poro na base do apressório, por onde seriam emitidas as estruturas infectivas nas células da epiderme (AGOSTINI; TIMMER, 1994; ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996; PERES et al., 2005; MACKENZIE et al., 2010). No entanto, até o momento, apenas indícios sustentam essa hipótese, não existem estudos que analisaram secções da interação entre apressório e tecidos foliares.

A detecção e identificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* tem sido realizada por meio da associação entre métodos de diagnose clássicos, como o isolamento do patógeno em meio de cultivo semi-seletivo, métodos moleculares, por meio da PCR convencional utilizando iniciadores específicos e, métodos sorológicos, utilizando anticorpos específicos em um ensaio imunoenzimático (ELISA) (MILLS et al., 1992; SREENIVASAPRASAD et al., 1996; WARD et al., 2003; GARRIDO et al., 2009). Atualmente, esses métodos tradicionais têm sido substituídos pela PCR em tempo real e da PCR multiplex em tempo real, por serem mais sensíveis, mais rápidos, menos laboriosos e por serem capazes de quantificar o DNA do patógeno. Além disso, um grande desafio no manejo da PFC é a detecção precoce de *C. acutatum* em campo, ou seja, antes da florada. Assim, detectar e quantificar o patógeno em folhas assintomáticas é de fundamental importância para a programação de estratégias de controle, além de amparar estudos epidemiológicos e outros estudos envolvendo o patossistema.

Diante de tantas lacunas observadas nesse patossistema, este trabalho tem como objetivo, avaliar o período de sobrevivência do patógeno na superfície de folhas assintomáticas no período entre as floradas; verificar se o patógeno coloniza os tecidos foliares dos citros; estabelecer um método eficiente e sensível para

detecção e quantificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* na superfície foliar e monitorar quantitativamente os patógenos em campos de produção de citros no Estado de São Paulo.

Referências

AGOSTINI, P.J.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of *Colletotrichum gloeosporioides*, the cause of citrus postbloom fruit drop. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 1084, 1992.

_____. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 420-425, 1994.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 239-269.

GARRIDO, C.; CARBÚ, M.; FERNÁNDEZ-ACERO, F.J.; BOONHAM, N.; COLYER, A.; CANTORAL, J.M.; BUDGE, G. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. **Plant Pathology**, London, v. 58, n. 1, p. 43-51, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática produção agrícola**. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 nov. 2013.

MACKENZIE, S.J.; PERES, N.A.; TIMMER, L.W. Colonization of citrus leaves and secondary conidiation response to citrus flower extracts by non-postbloom fruit drop strains of *Colletotrichum acutatum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 333-342, 2010.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 137-143, 1992.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR, 2010. 137 p.

PERES, N.A.R.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 784-796, 2005.

SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v. 45, p. 650-655, 1996.

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Host specificity, pathology, and host-pathogen interactions of *Colletotrichum***. Saint Paul: American Phytopathological Society Press. 2000. p. 300-316.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p. 329-334, 1994.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Citrus world markets and trades**. Disponível em: <<http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/tropprod/tropprod-12-13-2012.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2013.

WARD, E.; FOSTER, S.J.; FRAAIJE, B.A.; MCCARTNEY, H.A. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 145, n. 1, p. 1-16, 2004.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, New York, v. 88, n.1, p. 121-128, 1996.

2 SOBREVIVÊNCIA E COLONIZAÇÃO DE *Colletotrichum acutatum* EM FOLHAS DE CITROS

Resumo

A podridão floral dos citros, causada por *C. acutatum*, tem gerado sérios prejuízos em diversos países do continente americano. A doença atinge principalmente as flores cítricas, causando lesões necróticas de coloração róseo-alaranjadas. Os frutos formados podem cair, enquanto que os cálices e os pedúnculos ficam firmemente aderidos aos ramos, formando estruturas típicas da doença que recebem o nome de “estrelinhas”. Relatos sugerem que a sobrevivência do patógeno, entre os períodos de florescimento da planta, ocorra na forma de apressórios aderidos à superfície foliar. Outras evidências também apontam que os apressórios podem emitir uma hifa infectiva, capaz de infectar e colonizar as células da epiderme foliar. Entretanto, essas evidências foram baseadas em ensaios não conclusivos. Diante das lacunas encontradas no patossistema, esse trabalho teve a finalidade de avaliar, o período de sobrevivência do patógeno na superfície foliar e analisar se o patógeno coloniza os tecidos foliares dos citros. Para estudar a sobrevivência do patógeno na superfície foliar, distintos ensaios foram conduzidos em: I- condições controladas, a 21°C e 27 °C; II- casa de vegetação, na presença e ausência do molhamento foliar; III- condições ambientais do campo experimental do departamento de Fitopatologia e Nematologia da Esalq/USP. Para estudar a colonização de *C. acutatum* em folhas de citros, folhas provenientes de mudas de laranjeira ‘Pêra’ foram inoculadas com conídios do patógeno e incubadas em câmara úmida por 72 horas. Amostras foram coletadas 72 e 168 horas após a inoculação e preparadas para as análises ao microscópio de luz, transmissão e confocal. Em condições controladas, 21°C e 27 °C, o patógeno sobreviveu de quatro a sete meses após a inoculação. Em condições de casa de vegetação notou-se uma expressiva diferença entre as plantas exposta ou não ao molhamento foliar. Foi notada a viabilidade do patógeno até seis ou dois meses, nas amostras expostas ou não ao molhamento foliar, respectivamente. Nos ensaios conduzidos sob condições ambientais, foi verificado que o patógeno sobreviveu por um período maior em épocas com alto índice pluviométrico associados a muitos dias com chuvas (DCCH). Não foi observada colonização das células epidérmicas, entretanto, notou-se que o patógeno foi capaz de emitir o *peg* de penetração através da camada cuticular. Esse *peg* de penetração ficou restrito numa camada péctica, entre a cutícula e a parede periclinal externa das células epidérmicas. Diante das constatações obtidas, podemos inferir que o patógeno pode sobreviver nas folhas, mediante as constantes propagações de suas estruturas, proporcionadas pelo molhamento foliar e, que o *peg* de penetração formado a partir do apressório, fica restrito a uma camada abaixo da cutícula, de onde o patógeno pode retirar nutrientes para sua manutenção, durante seu período de sobrevivência na superfície foliar.

Palavras-chave: Apressório; Molhamento foliar; *peg* de penetração

Abstract

The postbloom fruit drop caused by *C. acutatum* is responsible for great losses to citrus groves in several countries of the American continent. The disease affects primarily citrus flowers, causing necrotic lesions of pinkish-orange color. The fruits may drop, while the chalice and the stems are firmly adhered to the branches, forming structures typical of the disease named "little stars". Reports suggest that the survival of the pathogen, between periods of plant flowering, occurs as appressoria adhered to the leaf surface. Other evidences show that the appressoria may emit an infective hypha, able to infect and colonize the epidermal cells of the leaf. However, these evidences were based on inconclusive tests. Due to the gaps in the pathosystem, this study aimed at assessing, the survival period of the pathogen on leaf surface and analyzing whether the pathogen colonizes leaf tissues of citrus. For that purpose, different tests were conducted in: I – controlled conditions at 21°C and 27°C; II – in a greenhouse, in the presence or absence of foliar wetness; III – environmental conditions at the experimental field of the Plant Pathology and Nematology Department of ESALQ/USP. To study the colonization of *C. acutatum* on citrus leaves, leaves from seedlings of "Pera" variety with conidia of the pathogen were inoculated and incubated in a humid chamber for 72 hours. The samples were collected 72 and 168 h after inoculation and prepared for the analysis under a light, transmission and confocal microscope. Under controlled conditions, 21°C and 27°C, the pathogen survived from four to seven months after inoculation. In greenhouse conditions, there was a significant difference between plants exposed or not to leaf wetness. The viability of the pathogen up to six or two months was observed in samples exposed or not to the leaf wetness, respectively. In trials conducted under environmental conditions, the pathogen survived for a longer period in seasons with high precipitation associated with many rainy days. Colonization of the epidermal cells was not observed; however, the pathogen was capable of emitting the penetration peg through the cuticular layer. This penetration peg was restricted in a pectic layer, between the cuticle and the external periclinal wall of epidermal cells. These findings show that the pathogen can survive on the leaves, using the constant of spreads its structures provided by the leaf wetness. The penetration peg formed from the appressorium is restricted to a layer below the cuticle.

Keywords: Apressorium; Leaf wetness; Penetration *peg*

2.1 Introdução

A podridão floral dos citros (PFC), cujo principal agente causal é *C. acutatum*, tem causado importante prejuízo à produção de cítricos em diversos países do continente americano (FAGAN, 1979; PORTO; ROSSETI; DORNELLES, 1979; SONODA; HEBB, 1991).

Os sintomas dessa doença são caracterizados pela presença de lesões necróticas de coloração róseo-alaranjada, geralmente nas pétalas, comprometendo

todos seus tecidos. Os frutos recém-formados apresentam descoloração amarelada e caem rapidamente, enquanto os discos basais, os cálices e os pedúnculos podem ficar firmemente aderidos aos ramos, formando estruturas típicas da doença que recebem a denominação de “estrelinhas”. Essas estruturas podem permanecer fixadas aos ramos por até 18 meses (FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER et al., 1994).

Trabalhos revelam que os apressórios de *C. acutatum* podem sobreviver aderidos à superfície das folhas, de forma assintomática, durante o intervalo entre as floradas, período que pode corresponder a um ano, principalmente naquelas variedades de florescimento uniforme e curto (AGOSTINI; TIMMER, 1994; ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996). Zulfiqar, Brlansky e Timmer (1996), estudando a sobrevivência de *C. acutatum* em folhas de citros, em condições controladas, notaram que o patógeno sobreviveu até um mês aderido à superfície das folhas, na forma de apressórios. Entretanto, não se sabe se essa forma de sobrevivência é eficiente para manter o patógeno viável por períodos mais prolongados, considerando que o intervalo entre floradas pode ser de até um ano. Dessa forma, novos ensaios devem ser conduzidos para avaliar essa estratégia de sobrevivência do patógeno por períodos maiores, e que melhor represente o períodos entre as floradas.

Outras evidências apontam que os apressórios formados na superfície foliar podem emitir uma hifa infectiva capaz de colonizar as células epidérmicas (PERES et al., 2005). Essa hifa estaria restrita dentro das células da epiderme, local onde o apressório retiraria nutrientes para a manutenção da sua viabilidade por um longo período (PERES et al., 2005). Baseados no isolamento do patógeno após assepsia do tecido foliar e pela constatação de um poro no apressório visualizado em microscopia de luz, alguns autores concluíram que o patógeno seria capaz de colonizar os tecidos epidérmicos foliares (AGOSTINI; TIMMER, 1994; ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996; PERES et al., 2005; MACKENZIE, 2010). Entretanto, tais conclusões parecem prematuras, uma vez que não existem estudos mostrando a interação do apressório com os tecidos foliares.

Diante das lacunas observadas nesse patossistema, este trabalho foi proposto, com a finalidade de avaliar o período de sobrevivência do patógeno na superfície foliar e analisar se ocorre a colonização do patógeno em tecidos foliares de citros.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de citros, com a produção estimada de 18.564 milhões de toneladas de laranja, seguido pelos Estados Unidos, com 8.014 milhões de toneladas (USDA, 2013). No Brasil, a região responsável pela maior parte da produção é a sudoeste, tendo o Estado de São Paulo aproximadamente 74% da produção nacional, seguido pela Bahia (IBGE, 2013). O cinturão citrícola paulista está dividido em quatro regiões produtoras: norte, nordeste, sudoeste e sudeste. As regiões norte e nordeste são as mais produtivas com 60% da produção e 70% da área plantada do cinturão citrícola. No entanto, entre 2005 e 2009, houve expansão de 89% no número total de árvores em novas áreas da região sudoeste. A migração das regiões norte e central, tradicionais regiões citrícolas, para novas áreas ao sudoeste, deve-se ao menor custo da terra, maior ocorrência de chuvas, menor incidência de doenças como o huanglongbing (HLB) e à clorose variegada dos citros (CVC) que, nessa nova fronteira, não ameaça os pomares. A melhor distribuição de chuvas nessa região reflete-se em redução nos custos de produção, devido à redução nos gastos com irrigação (NEVES et al., 2010). No entanto, favorece a ocorrência da podridão floral dos citros (PFC). Essa doença é esporádica na região norte do Estado de São Paulo, porém, é de grande importância econômica no sudoeste do Estado, devido a sua frequente ocorrência (FEICHTENBERGER et al., 2005).

A PFC caracteriza-se pela presença de lesões necróticas de coloração róseo-alaranjada nas pétalas e subsequentemente, amarelecimento dos frutos recém formados e posterior queda, deixando os cálices e os pedúnculos retidos nos ramos, formando estruturas que recebem o nome de “estrelinhas”. Essas estruturas são típicas da doença e podem permanecer fixadas aos ramos por até 18 meses. Ramos que permanecem com essas estruturas (cálices e pedúnculo) aderidas, no ano seguinte não florescem e respondem como se estivessem suportando frutos. As folhas ao redor da inflorescência doente são frequentemente pequenas, deformadas, com nervuras grossas e dão aos ramos aparência de roseta (FEICHTENBERGER et al., 2005; TIMMER, et al., 1994). Sintomas também podem ocorrer no pistilo

(estigma e estilete), onde são formadas lesões de coloração marrom ou negra (LIN et al., 2001).

Segundo Agostini e Timmer (1994) Conídios produzidos em acérvulos de pétalas de flores infectadas podem ser deslocados por respingos de chuvas e atingirem a superfície das folhas. Nesse órgão vegetal, os conídios podem germinar formando apressório, que, por sua vez, podem formar um *peg* de penetração que atravessa a cutícula e forma uma hifa infectiva dentro das células epidérmicas. Na próxima florada, a água da chuva ao entrar em contato com as pétalas e atingir a superfície foliar podem fornecer substâncias que estimulam a germinação dos apressórios, formando novos conídios na superfície foliar. Estes conídios são dispersos por respingos de chuva para novas flores reiniciando ciclo da doença.

A sobrevivência do inóculo é uma fase que garante a perpetuação do fitopatógeno em situações adversas, tais como ausência do tecido hospedeiro e/ou condições climáticas desfavoráveis. Para tanto, os fitopatógenos desenvolveram grande variedade de estratégias de sobrevivência, como por exemplo, a produção de estruturas especializadas de resistência, atividade saprofítica e permanência em plantas hospedeiras (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Colletotrichum acutatum é considerado um patógeno bastante versátil pela sua grande capacidade de sobreviver de diferentes maneiras. Esse patógeno pode sobreviver na própria planta hospedeira, em outros hospedeiros alternativos, no solo, em restos culturais da planta hospedeira ou produzir apressórios como estruturas de sobrevivência (EASTBURN; GUBLER, 1990; ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996; FREEMAN; SHALEV; KATAN, 2002; PERES et al., 2005; FREEMAN, 2008).

Em *Citrus sinensis* (laranja doce), o único órgão suscetível a *C. acutatum* é a flor. Como o florescimento de *Citrus sinensis* dura poucos meses, a planta apresenta tecido suscetível por um curto período de tempo. Dessa forma, na ausência de tecido suscetível, o patógeno deve lançar mão de estratégias de sobrevivência. A literatura relata que o patógeno pode sobreviver aderido aos cálices retidos na planta, em plantas daninhas e em folhas da própria planta (ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996; CINTRA, 2009; FRARE, 2011).

Cintra (2009) constatou que o cálice retido na planta é uma importante fonte de inóculo, uma vez que o patógeno consegue sobreviver aderido a essas estruturas florais. Por outro lado, Silva-Júnior (2011) afirmou que estas estruturas vegetais não representavam fontes de inóculo importantes para a podridão floral dos citros,

considerando que o inóculo pode estar presente em folhas e ramos da planta. Nesse mesmo trabalho, o autor percebeu que a poda dos cálices da planta não resultou em redução da doença no campo e que nas áreas onde foi realizada a poda dos cálices persistentes, antes do florescimento, a doença ocorreu após períodos de chuvas e molhamento foliar, atingindo até 100% das plantas.

Frare (2011) relatou a sobrevivência do patógeno em plantas daninhas frequentemente associadas às áreas citricolas. Nesse trabalho, o autor observou a sobrevivência do patógeno até três meses após a inoculação das plantas daninhas avaliadas e concluiu que tais plantas podem servir como hospedeiras alternativas de *C. acutatum*, resultando em fonte de inóculo primário e secundário para a cultura dos citros.

Agostini e Timmer (1994), estudando a sobrevivência de *C. acutatum* em folhas de citros, em condições controladas, observaram que o patógeno sobreviveu até 28 dias aderido à superfície das folhas, na forma de apressórios. Entretanto, não se sabe se essa forma de sobrevivência é eficiente para manter o patógeno viável por períodos mais prolongados, uma vez que esse ensaio foi conduzido por somente um mês após a inoculação.

A colonização de patógenos nos tecidos da planta hospedeira inicia-se após o seu estabelecimento da relação parasitária estável com a mesma. Nessa fase, o patógeno passa a se distribuir nos tecidos da planta e diversos processos fisiológicos podem ser alterados, resultando em sintomas (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Conídios de *C. acutatum*, ao entrar em contato com a planta, sob condições favoráveis, podem germinar, dando origem aos tubos germinativos, que poderão iniciar a formação de apressórios (PERES et al., 2005). A penetração desse fitopatógeno no tecido de pétalas de citros pode ocorrer tanto pelo ingresso de uma hifa infectiva através dos estômatos, como por meio do *peg* de penetração formado a partir do apressório (ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996; MARQUES, 2012).

Segundo Marques (2012), essa segunda forma de penetração está mais frequentemente relacionada à infecção de *C. acutatum* em pétalas de citros. Esse *peg* de penetração pode invadir diretamente a cutícula e a parede das células epidérmicas (BAILEY; JEGER, 1992). Após a penetração, esse patógeno pode crescer de modo subcuticular entre as paredes periclinais e anticlinais da epiderme ou de maneira intracelular, através das células da epiderme (MARQUES, 2012).

A colonização de *C. acutatum* nos tecidos foliares tem sido relatada por alguns autores (ZULFIQAR; BRLANSKY; TIMMER, 1996; PERES et al., 2005; MACKENZIE; PERES; TIMMER, 2010). Entretanto, os resultados obtidos nesses trabalhos são baseados em evidências indiretas de tais processos.

Zulfiqar, Brlansky e Timmer (1996) relataram penetração e colonização dos tecidos foliares por *C. acutatum*. Nesse trabalho, utilizando a técnica do esmalte para remoção das estruturas formadas pelo patógeno na superfície foliar, os autores evidenciaram um poro na parede do apressório e concluíram que se tratava de uma abertura por onde *peg* de penetração saíria para infectar e posteriormente colonizar o tecido foliar.

Baseados nessas evidências, Peres et al. (2005) descreveram o ciclo da doença considerando que uma possível hifa infectiva formada a partir do apressório, coloniza os tecidos da epiderme, sendo capazes de retirar nutrientes para sua manutenção durante o período de sobrevivência na superfície foliar.

MacKenzie, Peres e Timmer (2010), relataram que isolados de *C. acutatum* provenientes de outros hospedeiros foram capazes de colonizar folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*). Para chegar a essa conclusão, os autores, inocularam o patógeno na superfície foliar e, após a incubação das folhas em câmara úmida, avaliaram a colonização do patógeno em seus tecidos por meio do isolamento do patógeno em meio de cultivo semi-seletivo, a partir de segmentos foliares previamente submetidos à desinfestação superficial.

Assim, observa-se que as conclusões obtidas por esses autores a respeito da colonização dos tecidos foliares partiram de evidências indiretas dos processos de penetração e colonização. Nenhum desses trabalhos avaliou secções transversais do tecido visando observar a interação do patógeno com o tecido foliar, o que seria imprescindível para se chegar a tais conclusões.

2.2.2 Material e métodos

2.2.2.1 Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros

2.2.2.1.1 Obtenção, condições de crescimento e manutenção das culturas fúngicas

Os isolados utilizados para a condução dos experimentos foram obtidos a partir do isolamento de pétalas de plantas cítricas sintomáticas, oriundas do município de Santa Cruz do Rio Pardo-SP. Fragmentos dos tecidos sintomáticos foram desinfestados em álcool 70% durante 30 segundos, hipoclorito de sódio 1,5% durante 60 segundos e sucessivas lavagens em água destilada para remoção do hipoclorito de sódio. Os fragmentos foram transferidos para meio Agar-Água (AA) e mantidos a 25 °C, com regime de luz contínua, durante dez dias. Posteriormente, porções das hifas formadas foram transferidas para o meio de cultivo Batata-Dextrose-Ágar (BDA), para cultivo e obtenção das culturas puras, as quais foram mantidas a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Para confirmar se os isolados de fato eram *C. acutatum*, foi realizado uma Reação da polimerase em cadeia (PCR) com o iniciador específico Calnt2 em conjunto com o iniciador ITS4, para amplificação da região do Espaço Interno Transcrito (ITS) do DNA ribossômico dos isolados analisados. As análises foram conduzidas no Centro de Diagnóstico de Pragas e Doenças de Citros do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Dentre os isolados obtidos, o isolado LFN-1, por apresentar maior agressividade, foi selecionado para a condução dos ensaios. A partir da transformação genética, pela inserção aleatória do gene 'Green Fluorescent Protein' (GFP), no genoma do isolado LFN-1, foi obtido o isolado transformado LFN-1T.

Os isolados foram cultivados em meio de Aveia-Ágar (60g de aveia, 12g de Ágar e 1L de água) para a produção de conídios. Quando necessário, para o isolamento do patógeno, foi utilizado meio semi-seletivo constituído de meio BDA, 10 µg mL⁻¹ de carbendazim e 0,3 mg mL⁻¹ de estreptomicina (SONODA; PELLOSI, 1988; GOES; KIMATI, 1998; PERES et al., 2002). Os isolados foram preservados pelo método da dessecação em papel de filtro. Para isso, fragmentos de

aproximadamente 4 cm² de papel-de-filtro esterilizado foram distribuídos na superfície do meio BDA contido em placas de Petri e um disco de micélio foi depositado no centro da placa. Após o desenvolvimento da colônia, cada fragmento de papel de filtro contendo as estruturas do fungo foi retirado da placa de Petri e transferido para outra placa de Petri esterilizada. Essa placa foi mantida em um dessecador até completa secagem do material. Os fragmentos de papéis secos contendo as estruturas do isolado foram transferidos para microtubos esterilizados contendo sílica gel esterilizada e armazenados a -22 °C.

2.2.2.1.2 Extração do DNA e condições da PCR

O DNA genômico dos isolados obtidos nos ensaios foi extraído utilizando a metodologia descrita por Dellaporta, Wood e Hicks (1983) adaptada. Todos os isolados foram cultivados em meio BDA a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Cerca de 50 mg de micélio aéreo do fungo foram transferidos assepticamente para microtubos de 1,5 mL, contendo 600 µL de tampão de extração (NaCl 0,5 M; EDTA 0,05 M; Tris-HCl 0,1 M; pH 8,0; β-mercapoetanol 0,2%). Com auxílio de um pistilo de plástico, o micélio foi macerado no tampão de extração. Após maceração, foi adicionado em cada microtubo 50 µL de SDS 20%, seguindo-se agitação durante um minuto e incubação a 60 °C por 15 minutos. Posteriormente adicionou-se 300 µL de acetato de potássio 5 M, agitou-se por um minuto e a mistura obtida foi submetida à centrifugação a 18.625 g durante 10 minutos. Em seguida, 400 µL do sobrenadante, foram transferidos para novos microtubos contendo 400 µL de isopropanol. Uma breve agitação foi realizada nos microtubos e em seguida submetidos à centrifugação a 18.625 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente do microtubo e ao precipitado foram adicionados 500 µL de etanol 70% em cada microtubo. Os microtubos foram submetidos à nova centrifugação a 14.243 g durante 5 minutos. Por fim, todo o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q autoclavada. O DNA genômico obtido foi armazenado sob temperatura de -20 °C.

Para a PCR foi utilizado o iniciador Calnt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3'), específico para *C. acutatum* (SREENIVASAPRASAD et al., 1996) em conjunto

com o iniciador ITS4, para amplificação da região ITS do DNA ribossômico dos isolados analisados. A reação foi realizada utilizando-se 25 µL de solução, em água Milli-Q, contendo 2 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão 10x para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador (Calnt2 e ITS4) e 0.04 U Taq DNA polimerase. Para a reação, o termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C, finalizando com 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C. Após a PCR, os produtos foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe™ DNA gel Stain (Invitrogen Corporation). A corrida foi realizada em corrente constante de 5 volts/cm por 1 h. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de ultravioleta e fotografadas.

2.2.2.1.3 Obtenção da água de lavagem de pétalas (ALP)

Flores assintomáticas provenientes de mudas de laranjeira 'Valência' foram utilizadas para a obtenção da água de lavagem das pétalas. Essas pétalas foram destacadas das outras estruturas florais e acondicionadas em um funil contendo papel 'Whatman' número 1. O funil foi acoplado em um erlenmeyer e água Milli-Q foi vertida sobre as pétalas que estavam dispostas no interior do funil. Foi utilizada a proporção de uma parte de pétalas para três partes de água Milli-Q (1:3; v/v). A água de lavagem dessas pétalas foi mantida no erlenmeyer e posteriormente transferida para um béquer. A água coletada foi vertida novamente dentro do funil que continha as mesmas pétalas e coletada novamente no erlenmeyer. Esse procedimento foi repetido 20 vezes. Após as repetidas lavagens, a água de lavagem obtida foi filtrada em filtro tipo Millipore® e armazenada em microtubos de 2 mL, que foram armazenados a -20 °C. Essa água de lavagem das pétalas foi utilizada para condução dos experimentos.

2.2.2.1.4 Condução dos ensaios

2.2.2.1.4.1 Ensaios em ambiente controlado

Mudas de laranjeira 'Pêra' com aproximadamente oito meses de idade foram utilizadas para condução dos ensaios. Essas mudas foram inoculadas com o isolado LFN-1 ou LFN-1T. Para isso, as mudas foram apoiadas em placas de isopor que estavam no contidas de bandejas plásticas. As folhas foram fixadas nessas placas de isopor e três áreas de aproximadamente 80 mm² por folha foram delimitadas para inoculação com auxílio de uma caneta de tinta permanente. Nessas áreas foram depositadas 50 µL de suspensão de 1 x 10⁵ conídios mL⁻¹. Nas mudas do tratamento controle, em vez da suspensão de esporos, foram depositados 50 µL de água destilada. Cada bandeja contendo as mudas inoculadas recebeu porções de algodão embebido com água destilada e as mesmas foram vedadas com filmes plásticos, visando a obtenção de um ambiente de câmara úmida em seu interior. Essas bandejas foram acondicionadas em câmaras de crescimento durante 72 horas, a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, as mudas foram transferidas para câmaras de crescimento vegetal a 21°C ou 27 °C.

Quatro ensaios distintos foram conduzidos: mudas inoculadas com o isolado LFN-1 e mantidas a 21 °C (I) ou a 27 °C (II); Mudas inoculadas com o isolado LFN-1T e mantidas a 21 °C (III) ou a 27 °C (IV). Cada ensaio foi repetido uma vez. O primeiro ensaio foi conduzido de fevereiro de 2010 a janeiro de 2011 e o segundo ensaio de março de 2011 a fevereiro de 2012.

A avaliação da viabilidade do inóculo nos ensaios com o isolado LFN-1 foi realizada mediante isolamentos do patógeno em meio de cultivo semi-seletivo. Já o monitoramento da viabilidade do isolado LFN-1T foi realizado tanto por isolamentos em meio semi-seletivo quanto pela expressão do gene GPF visualizada por meio da fluorescência das estruturas do patógeno em microscopia confocal. Ensaios preliminares mostraram que conídios de *C. acutatum* inativados por radiação ultravioleta deixaram de expressar a GFP até 72 horas após a perda de sua viabilidade (Dados não mostrados). Isso permitiu a utilização desse recurso para avaliação da sobrevivência nos ensaios conduzidos com o isolado LFN-1T.

Os ensaios foram conduzidos durante 12 meses e as avaliações foram realizadas mensalmente. A cada avaliação, amostras provenientes das áreas inoculadas de cada planta foram coletadas e tratadas com água de lavagem de pétalas (ALP) ou água destilada esterilizada (ADE). Para isso, 50 µL de ALP ou ADE foram depositados sobre a região inoculada e as amostras foram mantidas em câmara úmida a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, durante 48 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas individualmente para o meio de cultivo semi-seletivo e as placas obtidas dos ensaios foram incubadas a 25 °C, sob luz contínua, durante o período de três a cinco dias. Após a incubação as colônias de *Colletotrichum* sp. que cresceram no meio de cultura foram identificadas, isoladas das colônias de outros patógenos e transferidas para outras placas contendo o meio BDA. As colônias foram incubadas a 25 °C, em regime de luz contínua durante sete dias. Foram obtidas cinco amostras de cada planta. As colônias obtidas dos isolamentos foram preservadas como descritas no item 2.2.1.1, para sua posterior identificação. Os isolados tiveram o seu DNA extraído seguido da PCR utilizando, para identificação da espécie, conjunto de iniciadores específicos para *C. acutatum*. A extração do DNA e as condições da PCR utilizadas estão descritas no item 2.2.1.2.

A porcentagem de isolamentos foi determinada pela equação:

$$\% \text{ de isolamentos} = \left[\frac{n (100)}{x} \right]$$

Onde: n = número de isolamentos obtidos

x = número total de amostras avaliadas

A sobrevivência foi correlacionada com esse percentual de isolamentos. A primeira avaliação foi realizada 48 horas após a inoculação e as demais realizadas mensalmente, após a inoculação.

Em cada ensaio foram utilizadas 70 mudas de laranja 'Pêra', das quais 60 foram inoculadas e outras dez serviram como controle. Cada ensaio foi repetido uma vez. Cada amostra coletada por planta representou uma repetição.

Nos ensaios onde foi utilizado o isolado LFN-1T, além de determinar a porcentagem de isolamentos, foi analisada também a viabilidade do inóculo

mediante a expressão da GFP. Para isso, cinco amostras de cada planta foram transferidas individualmente para lâminas de vidro e foram depositadas sobre essas, 30 µL de água destilada e uma lamínula. Após a montagem, as lâminas foram observadas em microscópio confocal Olympus FV 1000 munido de Software para a captura das imagens. Nesse ensaio foi determinada a percentagem de amostras que apresentaram estruturas de *C. acutatum* fluorescentes. A GFP foi excitada por um laser de 489 nm e a emissão de 509 nm foi coletada por filtros específicos que permitiram a geração de imagens.

2.2.2.1.4.2 Ensaio em casa de vegetação

Dois ensaios foram conduzidos em casa de vegetação: com e sem molhamento foliar. Em ambos os ensaios foram utilizadas mudas de laranjeira 'Pêra' com aproximadamente 12 meses de idade. Folhas jovens oriundas dessas mudas foram fixadas em placas de isopor e em seguida foram depositados 50 µL de suspensão de 1×10^5 conídios mL⁻¹ em áreas das folhas previamente delimitadas com auxílio de uma caneta de tinta permanente. A fixação das folhas nas placas de isopor foi necessária para imobilizá-las e assim impedir que a suspensão depositada se deslocasse das áreas delimitadas para a inoculação. Nesses ensaios foi utilizado o isolado LFN-1 (não transformado). Após a inoculação, as mudas foram acondicionadas no interior de uma câmara úmida durante 72 horas, a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período as mudas foram conduzidas para casa de vegetação.

Os experimentos foram conduzidos em uma casa de vegetação que possuía as dimensões de 6x3 m. Visando manter a umidade e o molhamento dentro da casa de vegetação, foi instalado um sistema de nebulização intermitente, composto por 45 nebulizadores. Os nebulizadores, espaçados 50 cm entre si, estavam dispostos na parte superior da casa de vegetação. Esse sistema de nebulização intermitente foi regulado para ativação a cada duas horas, durante intervalos de cinco minutos cada, sendo capaz de prover uma lâmina de água de 5 mm dia⁻¹. No ensaio sem molhamento foliar os nebulizadores da casa de vegetação foram desligados e a irrigação das mudas foi realizada individualmente diretamente no substrato para que não ocorresse molhamento foliar. O ensaio sem molhamento foi conduzido de março

e dezembro de 2010. O ensaio com molhamento foi conduzido de fevereiro de 2011 a janeiro de 2012. Em ambos ensaios, após inoculação, as mudas permaneceram em um desses ambientes. Mensalmente amostras foram coletadas, tratadas com ALP ou ADE e os isolamentos do patógeno realizados, como descritos no item 2.2.1.4.1. A primeira avaliação foi realizada 48 horas após a inoculação e as demais realizadas mensalmente, após a inoculação.

Em cada ensaio foram utilizadas 50 plantas de laranja 'Pêra', das quais 40 foram inoculadas com a suspensão de inóculo e outras dez serviram como controle que, em vez da suspensão, receberam água esterilizada na região delimitada para inoculação.

A porcentagem de isolamentos foi determinada seguindo a equação descrita no item 2.2.1.4.1.

De cada planta foram obtidas cinco amostras, cada uma representada por uma placa de Petri. Os isolados foram submetidos à extração do DNA e uma PCR foi conduzida com o conjunto de iniciadores específicos para *C. acutatum*, para identificação da espécie. A extração do DNA e as condições da PCR foram realizadas como descrito no item 2.2.1.2.

2.2.2.1.4.3 Ensaio sob condições do ambiente

Dois ensaios em épocas distintas foram conduzidos em condições ambientais. O primeiro ensaio foi iniciado em maio de 2010 e o segundo foi iniciado em fevereiro de 2011.

Para condução dos ensaios foram utilizadas plantas de laranjeira 'Pêra', com aproximadamente dois anos de idade, mantidas em vasos de 10 L. Essas plantas ficaram expostas às condições ambientais no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Esalq-USP. Folhas provenientes dessas plantas foram fixadas individualmente em pequenas placas de isopor, quer serviram de suporte para a lâmina foliar, a fim de manter a suspensão de inóculo na superfície da área inoculada. Para as inoculações, três áreas por folha foram delimitadas com caneta de tinta permanente e 50 µL de suspensão de 1×10^5 esporos mL⁻¹ foram depositados nessa área. O isolado LFN-1 foi utilizado nesse experimento.

Cinco amostras por planta foram retiradas mensalmente e encaminhadas para o laboratório. No laboratório, as amostras foram submetidas ao tratamento com ALP ou ADE como descrito no item 2.2.1.4.1. Após a incubação, as amostras foram transferidas para meio de cultivo semi-seletivo e submetidas ao isolamento como descrito no item 2.2.1.4.1. As colônias obtidas foram armazenadas como descrito no item 2.2.1.1. A seguir, procedeu-se à extração do DNA dos isolados e uma PCR com o conjunto de iniciadores específicos para *C. acutatum* foi realizada seguindo procedimento descrito no item 2.2.1.2.

Após a obtenção do número de isolamentos, foi determinada a porcentagem de isolamentos, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 2.2.1.4.1. A primeira avaliação foi realizada 48 horas após a inoculação e as demais realizadas mensalmente, após a inoculação.

Em cada ensaio, foram utilizadas 25 plantas de laranjeira 'Pêra', das quais 20 foram inoculadas com a suspensão de conídios e outras cinco serviram como controle, sendo depositada água sobre as folhas em vez da suspensão de inóculo. Cada uma das cinco amostras coletadas por planta representou uma repetição. Por meio de uma estação meteorológica instalada dentro da Esalq/USP, foram coletadas mensalmente variáveis climáticas como a temperatura, precipitação e dias com chuvas (DCCH).

2.2.2.2 Colonização de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Genética, no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP-MEPA), pertencentes à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo e no Núcleo de Microscopia e Microanálises (NMA-CCB) da Universidade Federal de Viçosa.

2.2.2.2.1 Condução do ensaio

Para condução dos ensaios, mudas de laranjeira 'Pêra' com aproximadamente seis meses de idade foram selecionadas e suas folhas foram inoculadas com suspensão de conídios do isolado LFN-1. Para a inoculação, as mudas foram acondicionadas dentro de bandejas plásticas contendo com placas de isopor em seu interior. As folhas foram fixadas nessas placas com fita adesiva e duas áreas de 80 mm² por folha foram delimitadas para inoculação, utilizando caneta de tinta permanente. Nessas áreas delimitadas foram depositados 50 µL de suspensão com 1 x 10⁵ esporos mL⁻¹. Cada bandeja recebeu uma porção de algodão embebido em água destilada e as mesmas foram fechadas com filmes plásticos para formar um ambiente de câmara úmida em seu interior. Posteriormente as bandejas foram mantidas a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, durante 72 horas. Após esse período algumas mudas foram conduzidas para retirada das amostras para as análises e outras foram acondicionadas em câmaras de crescimento vegetal a 25 °C. As folhas das plantas inoculadas foram destacadas 72 e 168 horas após a inoculação para a obtenção das amostras. As regiões inoculadas dessas folhas foram removidas com auxílio de um bisturi e essas amostras foram processadas de acordo com a técnica para a análise, como descrito nos itens posteriores.

2.2.2.2.2 Preparo das amostras para análise ao microscópio de luz

As amostras coletadas nos tempos anteriormente mencionados foram imediatamente imersas em solução fixadora de Karnovsky modificada (2,5% glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio), 0,05M, pH 7,2 e CaCl₂ 0,001M (KARNOVSKY, 1965) e levadas imediatamente ao vácuo para permitir a infiltração rápida da solução fixadora. Após um período mínimo de 12 horas de fixação, realizou-se a desidratação das amostras por meio de imersão das mesmas em série crescente de concentrações de etanol (30, 50, 70, 90 e 100 %), permanecendo por 10 minutos em cada concentração. Ao final, mais duas imersões em etanol 100% (10 minutos cada) foram realizadas para garantir a total desidratação dos tecidos. Após a última etapa da desidratação, as amostras foram pré-infiltradas em resina acrílica + etanol (1:1) e o material foi armazenado a 4 °C

durante 12 horas. Em seguida, foi realizada a infiltração em resina pura, onde as amostras permaneceram nessa resina líquida durante 12 horas a 4 °C. A polimerização foi realizada em moldes de polietileno, mantendo-se os fragmentos na posição vertical para facilitar a montagem dos blocos em base de madeira. Os cortes foram realizados em micrótomo rotatório manual, corados com azul de toluidina a 0,05%, pH 2,6 e montados entre lâminas e lamínulas com Entellan. As análises e fotodocumentação foram realizadas em microscópio de luz Axioskop 2, armazenando-se as fotos em arquivos digitais.

2.2.2.2.3 Preparo das amostras para análise ao microscópio eletrônico de transmissão

As amostras, obtidas como descrito no item 2.2.2.1, foram fixadas em solução fixadora Karnovsky modificada, por período mínimo de 12 horas. Em seguida foram seccionadas em retângulos de 3x1 mm e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,05M por uma hora. Realizou-se contrastação *en bloc* com acetato de uranila 0,5% por 12 horas, seguindo-se desidratação em concentrações crescentes (30, 50, 70, 90, 100 %) de acetona, durante 10 minutos em cada concentração. Ao final, mais duas imersões em acetona 100% (10 minutos cada) foram realizadas para garantir a total desidratação dos tecidos. Após a desidratação, procedeu-se a pré-infiltração em acetona + resina pura, na proporção 1:1, utilizando-se resina sintética epóxi (Spurr). As amostras permaneceram durante cinco horas nessa mistura. Posteriormente, a infiltração foi realizada com a resina pura por 12 horas. A polimerização foi realizada em estufa a 70 °C por três dias. Os blocos foram trimados e posteriormente seccionados em ultramicrótomo equipado com navalha de diamante, gerando secções com 70 nm de espessura. Essas secções foram depositadas sobre telinhas de cobre (100 mesh) previamente recobertas com película de "formvar" e contrastadas com acetato de uranila (3%) e citrato de chumbo pH 12 (REYNOLDS, 1963), durante 15 minutos cada. Após a secagem completa foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900 e as fotos armazenadas em arquivos digitais.

2.2.2.2.4 Preparo das amostras para análise ao microscópio confocal

As amostras obtidas no ensaio descrito no item 2.2.2.1 foram analisadas ao microscópio confocal. Para isso, amostras de 100 mm² coletadas das áreas inoculadas foram transferidas para lâminas de vidro contendo 20 µL de água em sua superfície e depositada sobre as mesmas uma lamínula. Após o preparo, as lâminas foram observadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 e as imagens foram fotodocumentadas em arquivos digitais. A GFP foi excitada com um laser de 489 nm e a emissão de 509 nm foi coletada por filtros específicos para geração das imagens.

2.2.3 Resultados

2.2.3.1 Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros

2.2.3.1.1 Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em condições controladas

A sobrevivência de *C. acutatum* provenientes de amostras coletadas em folhas de laranja 'Pêra', referentes aos ensaios conduzidos a 21 °C, após a inoculação com o isolado LFN-1 ou LFN1-T, são mostradas na Figura 2.1.

No primeiro ensaio (Figuras 2.1A e 2.1C), notou-se queda gradativa na sobrevivência de *C. acutatum* a partir das amostras analisadas. As amostras inoculadas com o isolado LFN-1, quando tratadas com água destilada esterilizada (ADE) ou água de lavagem de pétalas (ALP), proporcionaram sobrevivência de *C. acutatum* até o quarto e quinto mês após a inoculação, respectivamente (Figura 2.1A). De maneira semelhante, as amostras inoculadas com o isolado LFN-1T, propiciaram sobrevivência até o quarto mês, tanto para as amostras tratadas com ALP quanto para as amostras tratadas com ADE (Figura 2.1C). Entre o primeiro e o terceiro mês de avaliação, a sobrevivência de *C. acutatum* nas amostras tratadas com ALP foi significativamente superior ($P < 0,05$) ao percentual de isolamentos das amostras tratadas com ADE (Figura 2.1A e 2.1C).

No segundo ensaio (Figuras 2.1B e 2.1D), a sobrevivência de *C. acutatum* nas amostras analisadas, como no primeiro ensaio, reduziu gradativamente com o tempo. Entretanto, no segundo ensaio a sobrevivência do patógeno foi até o sexto mês de avaliação, tanto para as amostras tratadas com ALP quanto para as amostras tratadas com ADE. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre as amostras tratadas com ALP e ADE, de modo que a sobrevivência de *C. acutatum* nas amostras tratadas com ALP foi significativamente superior à sobrevivência do patógeno nas amostras tratadas com ADE, nos quatro primeiros meses de avaliação (Figuras 2.1B e 2.1D).

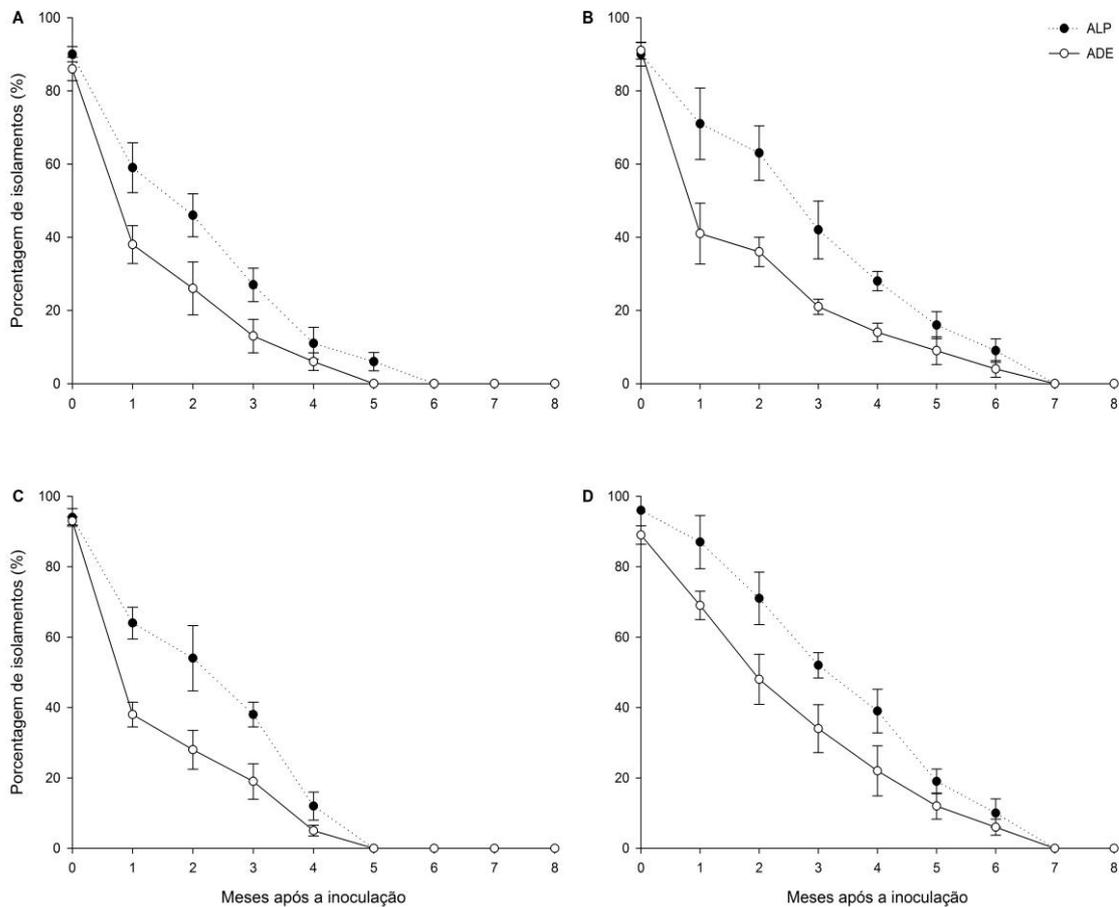


Figura 2.1 - Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em amostras provenientes de folhas de laranja 'Pêra', após a inoculação com o isolado LFN-1 (A e B) ou LFN-1T (C e D). Amostras submetidas ao tratamento com água de lavagem de pétalas de laranja (ALP) ou água destilada esterilizada (ADE). Ensaio conduzido a 21 °C. Os valores representam a média de cinco repetições \pm desvio padrão. A e C- primeiro ensaio; B e D- segundo ensaio

A sobrevivência de *C. acutatum* provenientes de amostras coletadas em folhas de laranjeira 'Pêra', referentes aos ensaios conduzidos a 27 °C, após a inoculação com o isolado LFN-1 ou LFN1-T, estão mostradas na Figura 2.2.

Nos ensaios conduzidos a 27 °C foi notada gradativa redução na sobrevivência de *C. acutatum* nas amostras tratadas com ALP ou ADE, com o decorrer do tempo (Figura 2.2).

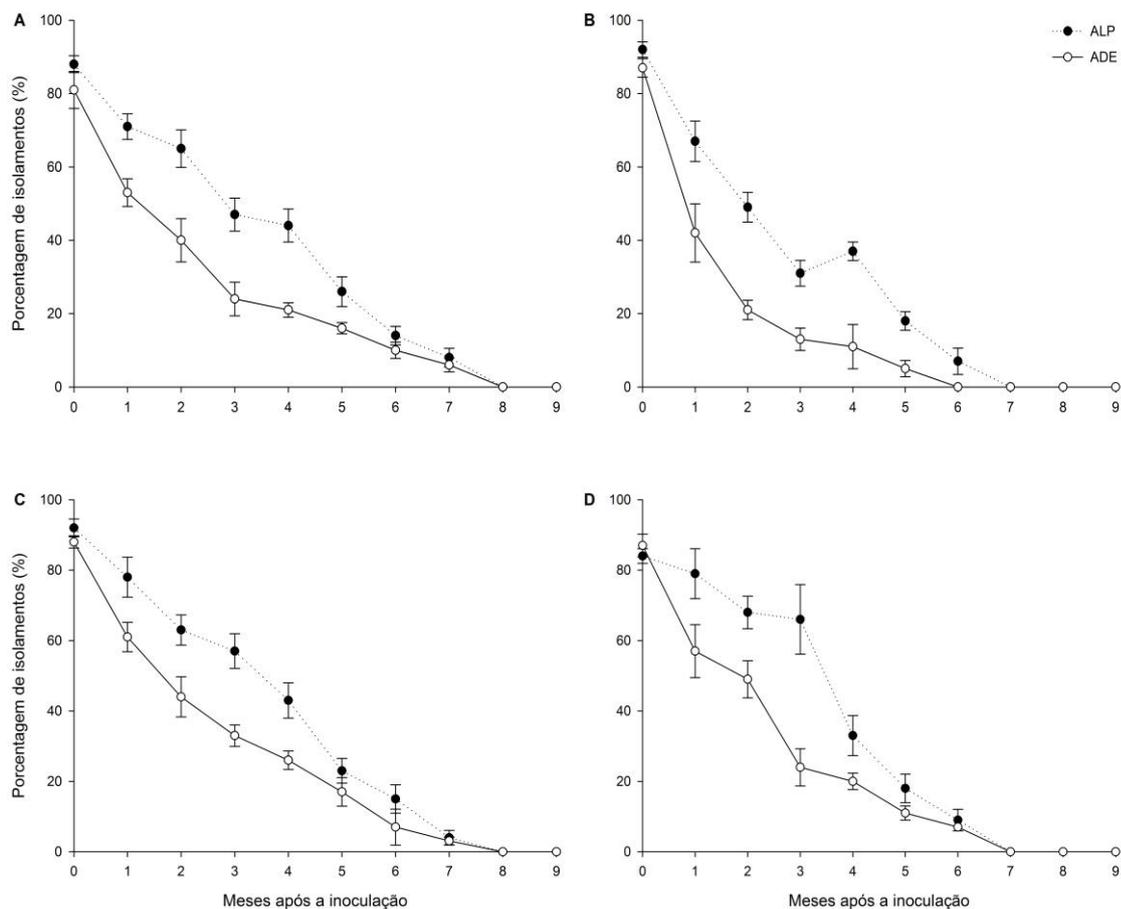


Figura 2.2 - Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em amostras provenientes de folhas de laranjeira 'Pêra', após a inoculação com o isolado LFN-1 (A e B) ou LFN-1T (C e D). Amostras submetidas ao tratamento com água de lavagem de pétalas de laranjeira (ALP) ou água destilada esterilizada (ADE). Ensaios conduzidos a 27 °C. Os valores representam a média de cinco repetições \pm desvio padrão. A e C- primeiro ensaio; B e D- segundo ensaio

No primeiro ensaio (Figuras 2.2A e 2.2C), o patógeno foi isolado até o sétimo mês após a inoculação, tanto para as amostras tratadas com ALP, quanto para as amostras tratadas com ADE. Nos três primeiros meses de avaliação, as amostras tratadas com ALP proporcionaram sobrevivência significativamente

superior ($P > 0,05$) quando comparadas com a sobrevivência nas amostras tratadas com ADE (Figuras 2.2A e 2.2C).

No segundo ensaio, as amostras inoculadas com o isolado LFN-1 quando tratadas com água destilada esterilizada (ADE) ou água de lavagem de pétalas (ALP) permitiram isolamento de *C. acutatum* até o quinto e sexto mês após a inoculação, respectivamente (Figura 2.2B). De modo similar, as amostras inoculadas com o isolado LFN-1T e tratadas com ALP ou ADE proporcionaram o isolamento do patógeno até o sexto mês após a inoculação (Figura 2.2D).

Nos ensaios conduzido com o isolado LFN-1 ou LFN-1T, somente foram levados em consideração para a análise da sobrevivência, os isolados identificados pela PCR ou pela microscopia de epifluorescência como *C. acutatum*, respectivamente. As Figuras 2.3 e 2.4 ilustram a amplificação do DNA de algumas amostras e a fluorescência obtida em alguns isolados, respectivamente.

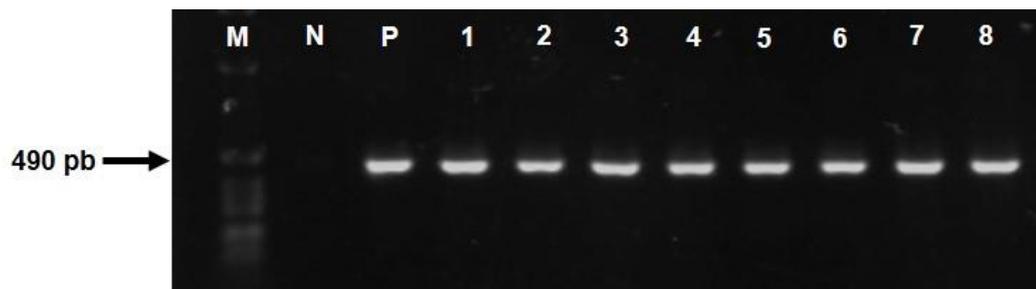


Figura 2.3 - Fragmentos amplificados pela PCR utilizando os iniciadores Calnt2 e ITS4, observados em gel de agarose 1%. M: Marcador molecular 1 kb; N: controle negativo; P: controle positivo; Isolados obtidos durante os ensaios conduzidos a: 21 °C, com água de lavagem de pétalas (ALP) (1 e 3), ou com água destilada esterilizada (ADE) (2 e 4); 27 °C, com ALP (5 e 7), ou ADE (6 e 8)

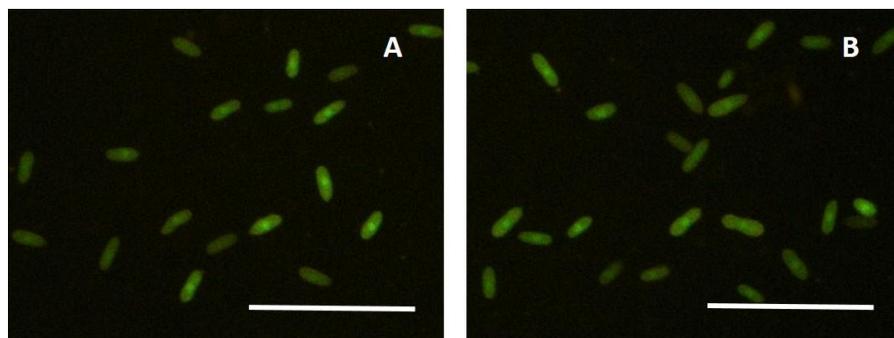


Figura 2.4 - Fluorescência dos conídios de *C. acutatum* oriundos de isolados obtidos a partir de isolamentos realizados nos ensaios conduzidos a 21 °C (A) e 27 °C (B). Barra = 50 μ m

A Figura 2.5 apresenta os resultados referentes a porcentagem de amostras contendo estruturas fúngicas fluorescentes (EFF) do isolado LFN-1T, nos ensaios conduzidos a 21 °C e 27 °C.

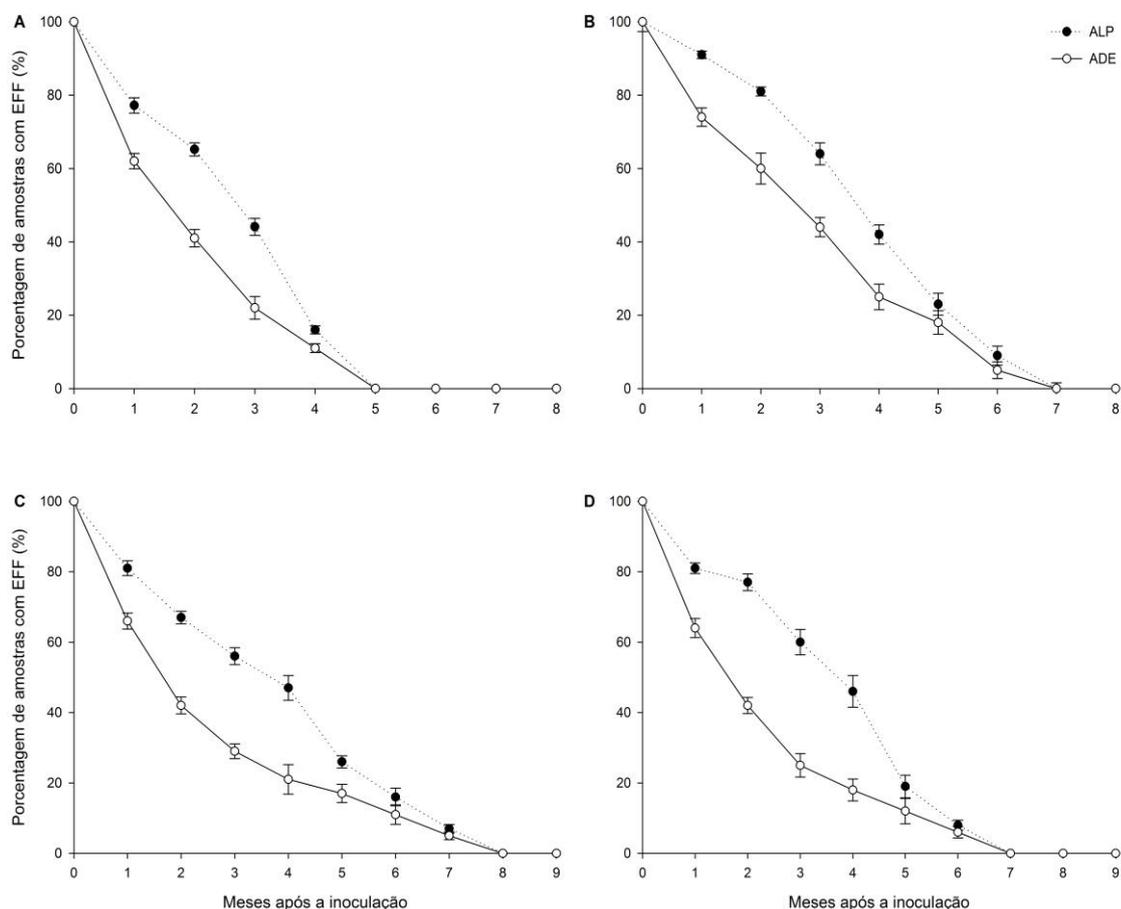


Figura 2.5 - Porcentagem de amostras contendo estruturas fúngicas fluorescentes (EFF), oriundas de folhas de laranjeira 'Pêra' após a inoculação com o isolado LFN-1T. Amostras submetidas ao tratamento com água de lavagem de pétalas de laranjeira (ALP) ou água destilada esterilizada (ADE). Ensaios conduzidos a 21 (A e B) e 27 °C (C e D). Os valores representam a média de cinco repetições \pm desvio padrão. A- primeiro ensaio (A e C); B- segundo ensaio (B e D)

No primeiro ensaio (Figuras 2.5A e 2.5C), a porcentagem de amostras contendo estruturas de *C. acutatum* fluorescentes reduziu gradativamente até o quarto ou sétimo mês nas amostras provenientes de mudas mantidas a 21 °C e 27 °C, respectivamente. A partir desses meses, nenhuma EFF foi visualizada nas amostras analisadas. Nos três primeiros meses de avaliação, foi constatada que a porcentagem de amostras contendo EFF foi significativamente maior nas amostras tratadas com ALP, do que nas amostras tratadas com ADE (Figuras 2.5A e 2.5C). No segundo ensaio (Figuras 2.5B e 2.5D), a porcentagem de EFF reduziu

constantemente até o sexto mês de avaliação, tanto para as amostras tratadas com ALP como para as amostras tratadas com ADE. A partir do sétimo mês, as estruturas do patógeno presentes nas amostras analisadas deixaram de fluorescer. Da mesma forma que no primeiro ensaio, as amostras que foram tratadas com ALP apresentaram uma porcentagem de amostras contendo EFF significativamente superior às amostras tratadas com ADE nos quatro primeiros meses de avaliação (Figura 2.5B e 2.5D).

A Figura 2.6 ilustra as estruturas fluorescentes de *C. acutatum* presentes em algumas amostras analisadas nos ensaios conduzidos a 21°C e 27 °C com o isolado LFN-1T. Percebeu-se que a ALP estimulou a produção de maior número de propágulos do patógeno nas amostras, quando comparadas às mesmas amostras tratadas com ADE. Notou-se ausência de fluorescência das estruturas de *C. acutatum* após a perda de sua viabilidade (Figuras 2.6E, 2.6J, 2.6O, 2.7T). O número de propágulos reduziu com o passar do tempo, tanto nas amostras tratadas com ALP como nas amostras tratadas com ADE (Figura 2.6).

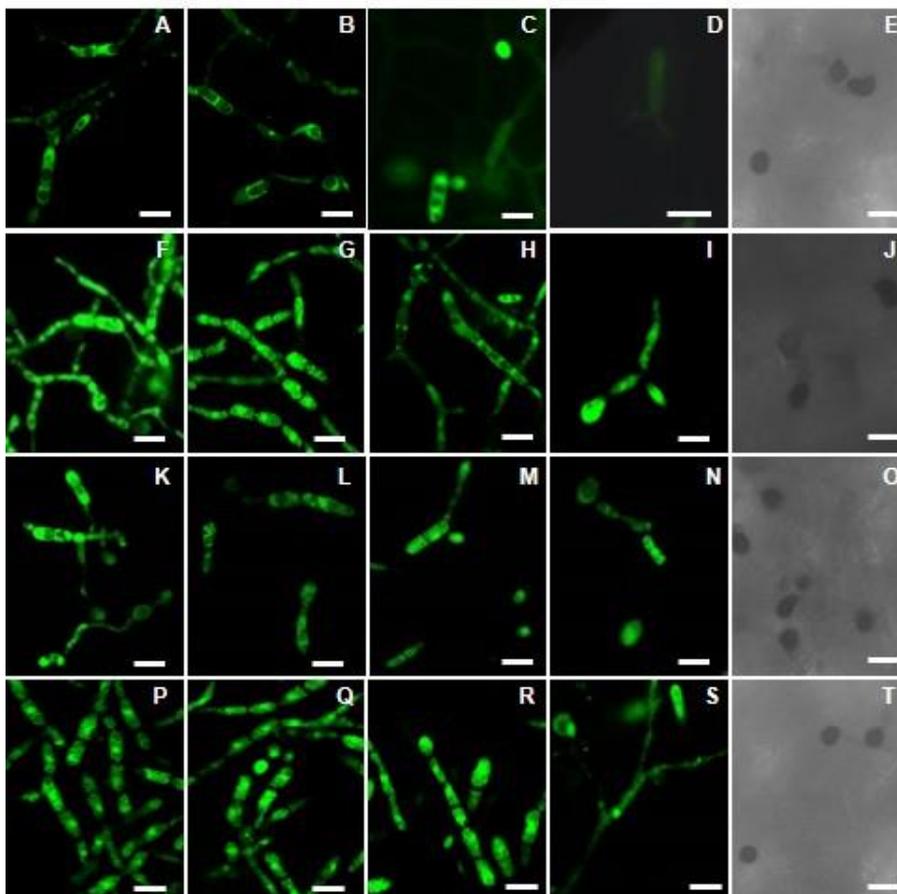


Figura 2.6 - Fluorescência de estruturas de *C. acutatum* aderidas à superfície de folhas de laranjeira 'Pêra', nos ensaios conduzidos a 21 (A-J) e 27 °C (K-T). Amostras tratadas com água destilada esterilizada, 1 (A e K), 2 (B), 3 (C e L), 4 (D), 5 (E e M), 7 (N) e 8 (O) meses após a inoculação. Amostras tratadas com água de lavagem de pétalas, 1 (F e P), 2 (G), 3 (H e Q), 4 (I), 5 (J e R), 7 (S) e 8 (T) meses após a inoculação. Barra = 10 µm

2.2.3.1.2 Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em condições de casa de vegetação com e sem molhamento foliar

Dois distintos ensaios foram conduzidos em casa de vegetação. Um ensaio foi conduzido com plantas submetidas ao molhamento foliar e outro ensaio cujas mudas não foram exposta ao molhamento foliar.

Os resultados do ensaio conduzido em casa de vegetação, utilizando plantas não expostas ao molhamento foliar, estão apresentados na Figura 2.7A.

Nessas condições foi observado decréscimo acentuado na sobrevivência do patógeno, de modo que somente foi possível isolá-lo nos três primeiros meses de avaliação, tanto nas amostras tratadas com ALP quanto naquelas tratadas com ADE. Nos dois primeiros meses de avaliação, a sobrevivência de *C. acutatum* nas

amostras tratadas com ALP foi significativamente maior ($P < 0,05$) que a sobrevivência nas amostras tratadas com ADE (Figura 2.7A). A temperatura média dentro da casa de vegetação, nos quatro primeiros meses de avaliação, variou de 24,8 °C a 27,6 °C.

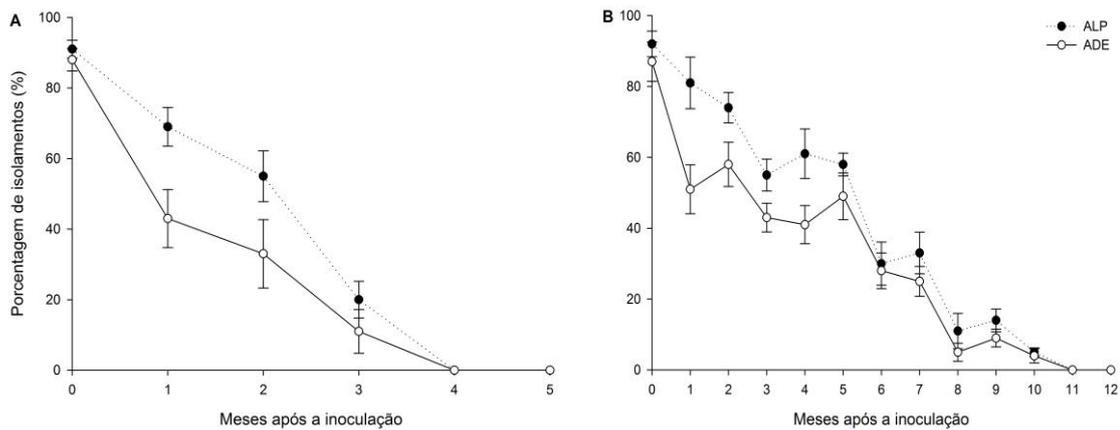


Figura 2.7 - Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em amostras provenientes de folhas de laranjeira 'Pêra' após a inoculação com o isolado LFN-1. Amostras submetidas ao tratamento com água de lavagem de pétalas de laranjeira (ALP) ou água destilada esterilizada (ADE). Os valores representam a média de cinco repetições \pm desvio padrão. A- Ensaio sem molhamento foliar; B- Ensaio com molhamento foliar

A Figura 2.7B apresenta os resultados referentes ao ensaio conduzido em casa de vegetação com as plantas sendo expostas ao molhamento foliar. Apesar da maior variação nos dados, ainda se observou nítida tendência de decréscimo na sobrevivência durante o período de avaliação. Entretanto, essa redução não foi tão acentuada como no ensaio conduzido sem molhamento foliar. Nesse ensaio, os isolamentos foram obtidos até o décimo mês após a inoculação, tanto para as amostras tratadas com ALP, quanto para as amostras tratadas com ADE. Nos quatro primeiros meses, a sobrevivência de *C. acutatum* nas amostras tratadas com ALP foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que as amostras tratadas com ADE (Figura 2.7B).

Todos os isolados utilizados nessas análises foram identificados pela PCR, como *C. acutatum*. A Figura 2.10 ilustra a amplificação de alguns isolados identificados nesse ensaio.

2.2.3.1.3 Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em condições ambientais

Os resultados referentes aos ensaios conduzidos sob condições ambientais estão apresentados nas Figuras 2.8 e 2.9.

A Figura 2.8 apresenta a relação entre a sobrevivência de *C. acutatum* nas amostras analisadas e as variáveis climáticas (temperatura, precipitação e DCCH) registradas de maio a agosto de 2010. Percebeu-se brusca queda na sobrevivência do patógeno durante o período de realização do ensaio, indicando a sua viabilidade somente até o terceiro mês. Não foi constatada diferença significativa entre as sobrevivências obtidas de amostras tratadas com ALP e ADE. A temperatura média teve baixa oscilação, variando entre 17,8 e 19,8 °C. Nesse período, o volume de chuva mensal variou de 2 a 24 mm, com poucos dias com chuvas (DCCH) (Figura 2.8).

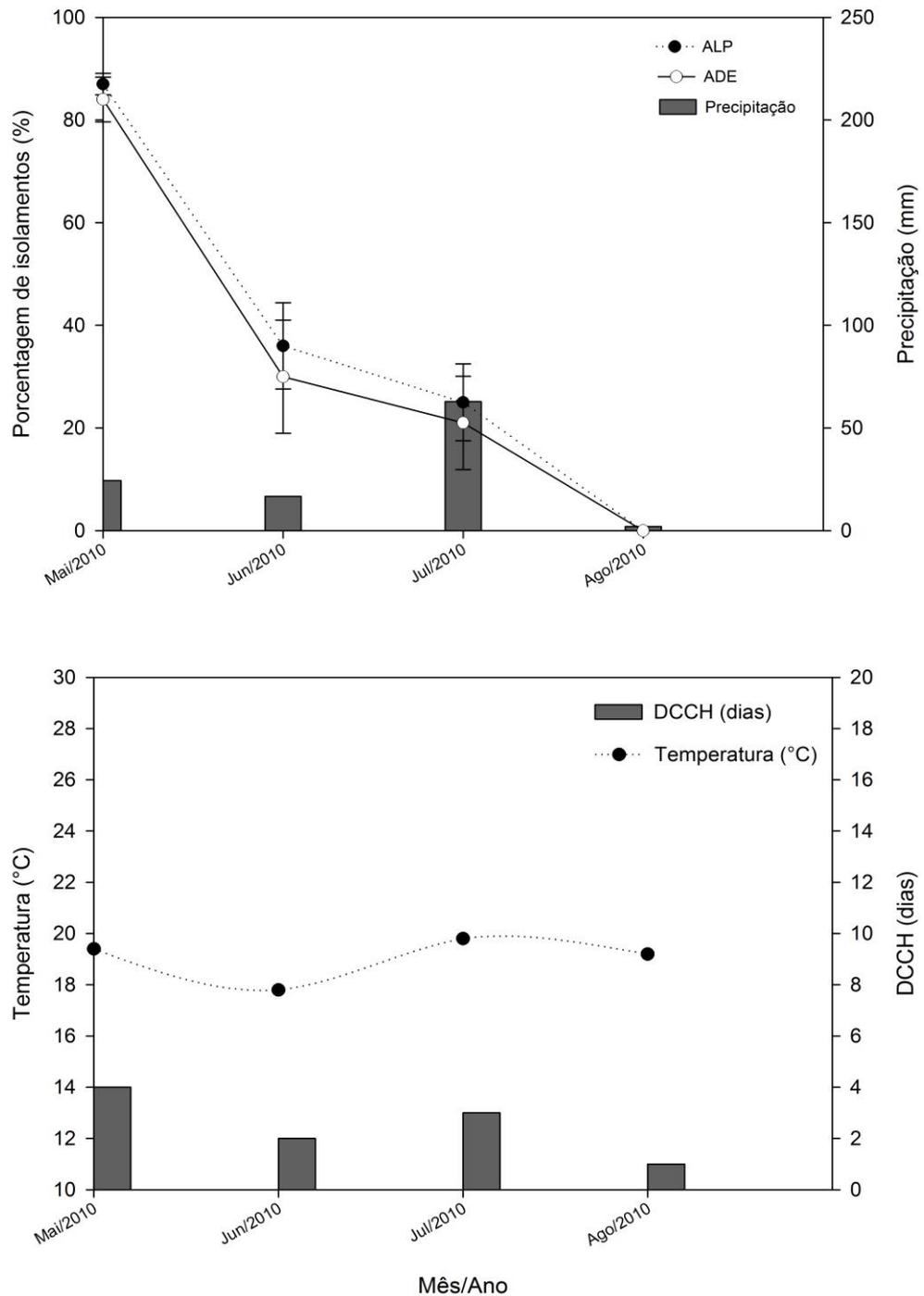


Figura 2.8 - Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em amostras provenientes de folhas de laranja 'Pêra', temperatura, dias com chuvas (DCCH) e precipitação, coletados mensalmente no ensaio conduzido em condições ambientais no ano de 2010. Amostras tratadas com água de lavagem de pétalas de laranja (ALP) ou água destilada esterilizada (ADE). Os valores do percentuais de isolamentos representam a média de cinco repetições \pm desvio padrão

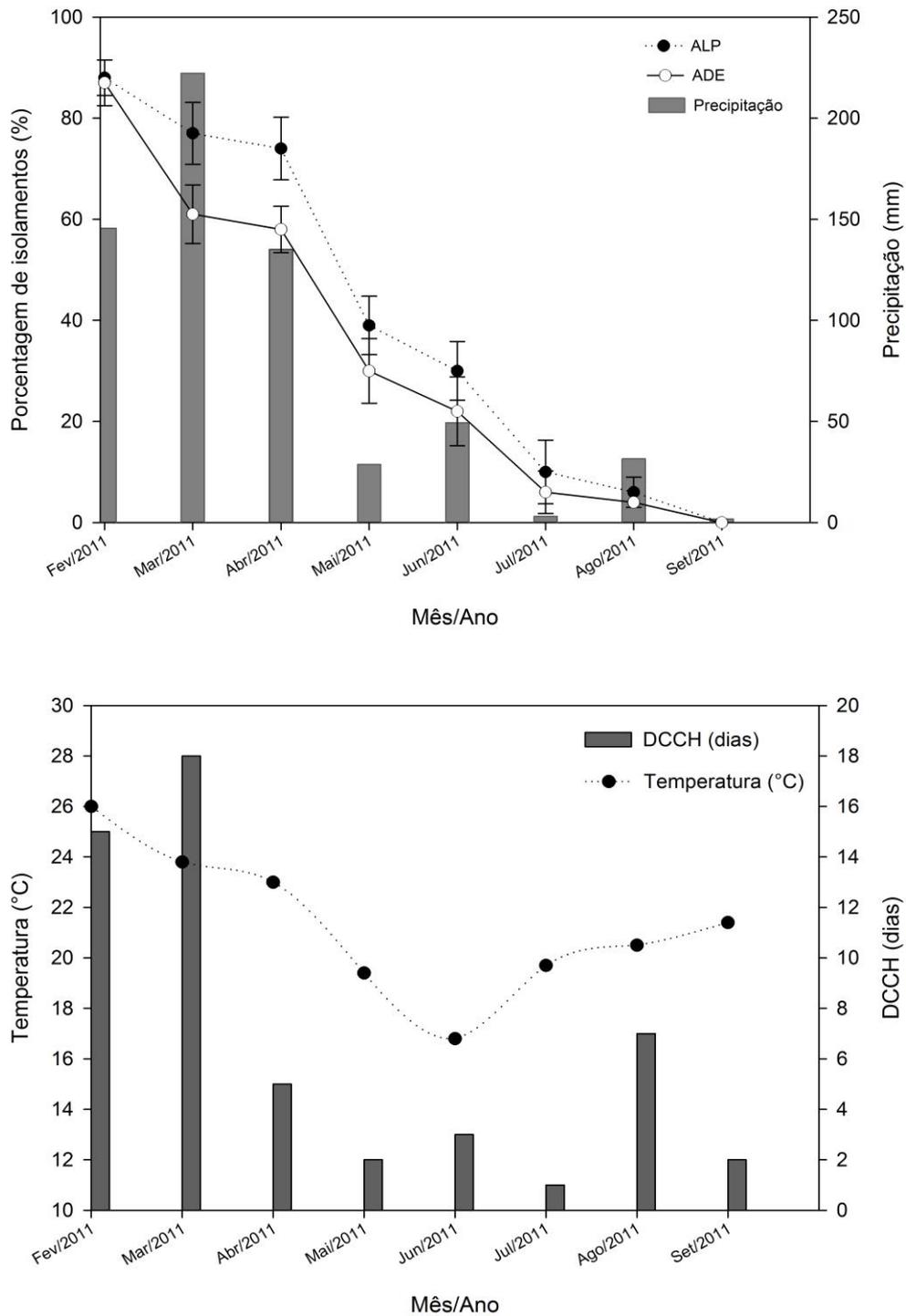


Figura 2.9 - Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum* em amostras provenientes de folhas de laranjeira 'Pêra', temperatura, dias com chuvas (DCCH) e precipitação, coletados mensalmente no ensaio conduzido em condições ambientais no ano de 2011. Amostras tratadas com água de lavagem de pétalas de laranjeira (ALP) ou água destilada esterilizada (ADE). Os valores do percentuais de isolamentos representam a média de cinco repetições \pm desvio padrão

Na Figura 2.9 são mostrados os resultados do segundo ensaio realizado em condições ambientais. Nota-se gradativa queda na sobrevivência do patógeno, no entanto, essa queda foi menos brusca em relação ao ensaio anterior, com o patógeno sobrevivendo até o sétimo mês. Nos meses iniciais do ensaio (fevereiro a abril), observaram-se maiores níveis de precipitação e de DCCH. Justamente nesses meses, a queda no isolamento do patógeno não foi tão intensa, o que sugere que a sobrevivência de *C. acutatum* nas folhas dos citros é favorecida pela precipitação. Nos meses seguintes (maio a setembro), onde ocorreu sensível decréscimo na precipitação, o isolamento do patógeno sofreu queda mais evidente, indicando baixa capacidade de sobrevivência nessas condições. A sobrevivência do patógenos nas amostras tratadas com ALP foi significativamente superior ($P < 0,05$) a sobrevivência nas amostras tratadas com ADE nos dois primeiros meses de avaliação. A temperatura média variou entre 16,6 e 26 °C durante os meses de duração do ensaio. O volume médio de chuva mensal, durante o período em que o inóculo esteve viável, variou de 1 a 222 mm. Todos os isolados utilizados nessas análises foram identificados pela PCR como *C. acutatum*. A Figura 2.10 ilustra a amplificação de alguns isolados identificados nesse ensaio.

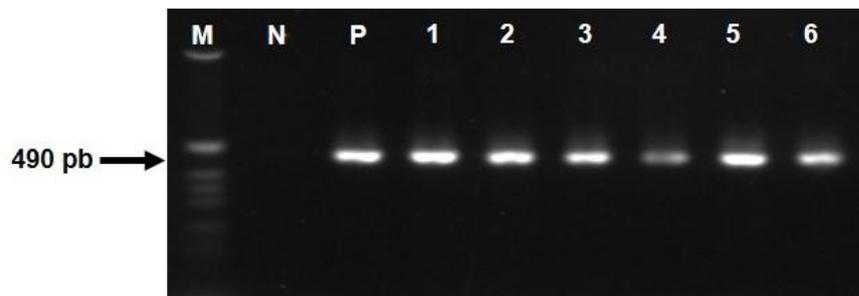


Figura 2.10 - Fragmentos amplificados pela PCR utilizando os iniciadores Calnt2 e ITS4, observados em gel de agarose 1%. M: Marcador molecular 1 kb; N: controle negativo; P: controle positivo; Isolados obtidos durante os ensaios conduzidos em: casa de vegetação com molhamento foliar (1 e 2) e sem molhamento foliar (3 e 4), condições ambientais (5 e 6)

2.2.3.2 Colonização de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros

Como já mencionado anteriormente, esse estudo buscou, por meio de distintas técnicas, compreender os mecanismos envolvidos durante a interação de *C. acutatum* com as folhas de laranjeira 'Pêra'. Para isso, as amostras inoculadas com o patógeno foram processadas e analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão, microscópio de luz e microscópio confocal. Os resultados dessas análises estão apresentados nas Figuras 2.11, 2.12, 2.13, 2.14 e 2.15.

As Figuras 2.11 e 2.12 ilustram os resultados obtidos nas análises conduzidas ao microscópio de luz. Durante as análises das amostras coletadas 72 horas, após a inoculação foi observada presença de grande quantidade de apressórios formados a partir da germinação dos conídios utilizados na inoculação. Entretanto, em nenhuma das amostras analisadas foram encontrados apressórios emitindo o *peg* de penetração. Esses apressórios apenas estavam aderidos à superfície foliar das amostras (Figura 2.11A).

Nas amostras coletadas 168 horas após a inoculação foi observada grande quantidade de apressórios formados a partir dos conídios depositados na superfície foliar. Grande parte desses apressórios estava aderida à superfície foliar sem a emissão do *peg* de penetração, entretanto, outros emitiram essa estrutura e interagiram com os tecidos foliares (Figura 2.11B). A Figura 2.12 ilustra a interação do apressório de *C. acutatum* com a superfície foliar. Pode-se perceber que o *peg*, formado pelo apressório aderido à superfície foliar penetrou a camada cuticular e, ficou restrito à camada péctica acima da parede periclinal da epiderme. Em nenhuma das amostras analisadas ao microscópio de luz o *peg* de penetração ultrapassou a parede celular da epiderme.

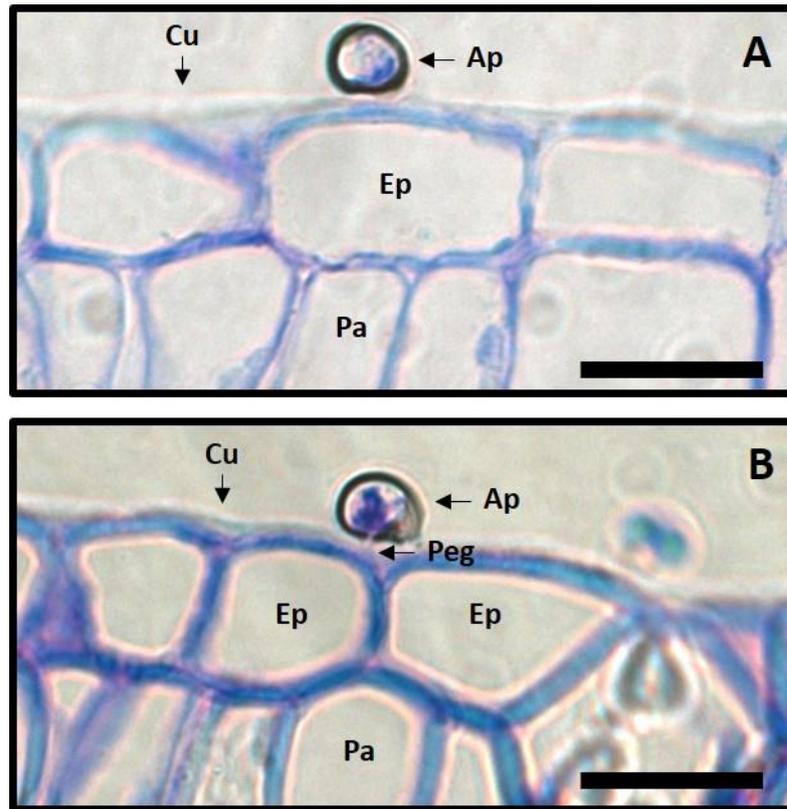


Figura 2.11 - Secção transversal do apressório de *Colletotrichum acutatum* aderido à superfície foliar de laranja 'Pêra', em amostras analisadas ao microscópio de luz. Apressórios presentes nas amostras coletadas 72 horas (A) e 168 horas (B) horas após a inoculação. (Barra = 14 μ m). Cu: cutícula; Ap: apressório; Pa: célula do parênquima; Ep: célula da epiderme; Peg: Peg de penetração

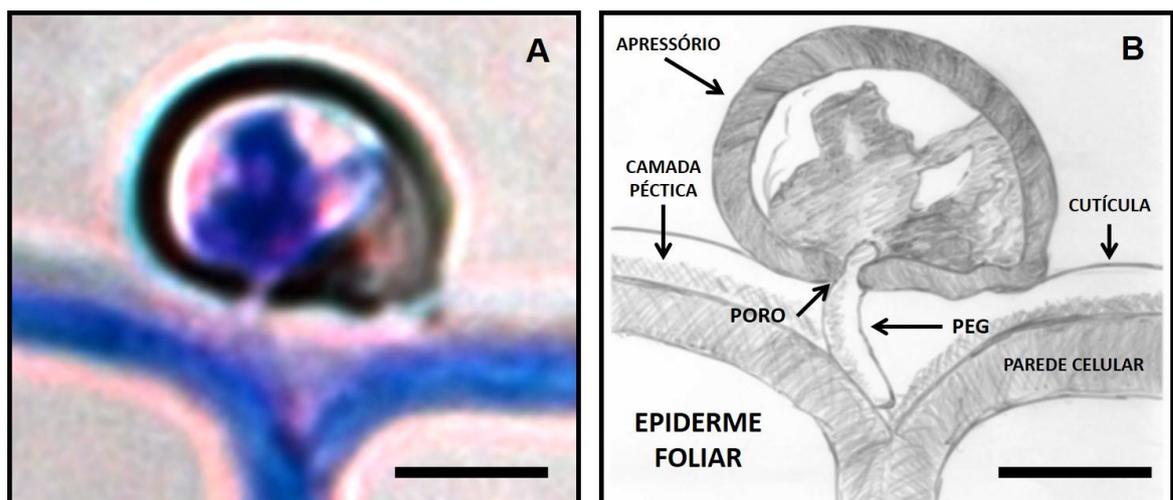


Figura 2.12 - Secção transversal do apressório de *Colletotrichum acutatum* aderido à superfície foliar de laranja 'Pêra', em amostra coletadas 168 horas após a inoculação e analisada ao microscópio de luz. A. Apressório que emitiu o peg de penetração na camada cuticular (Barra = 3,5 μ m); B. Ilustração esquemática apresentando as estruturas envolvidas na interação de *C. acutatum* com a superfície foliar (Barra = 3 μ m)

As Figuras 2.13 e 2.14 ilustram os resultados obtidos por meio da análise das amostras examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão. Nas amostras coletadas 72 horas após a inoculação foi observada grande quantidade de apressórios formados a partir dos conídios inoculados. Esses apressórios encontravam-se aderidos à superfície foliar por meio de delgada matriz extracelular (Figura 2.13B) que o envolvia. Embora os apressórios estivessem aderidos à superfície das folhas, os mesmos não emitiram o *peg* de penetração. Podemos observar, pela Figura 2.13B, que a parede do apressório manteve-se aderida à cutícula da epiderme foliar por meio da matriz extracelular, além de ausência da formação do *peg* de penetração pelo apressório.

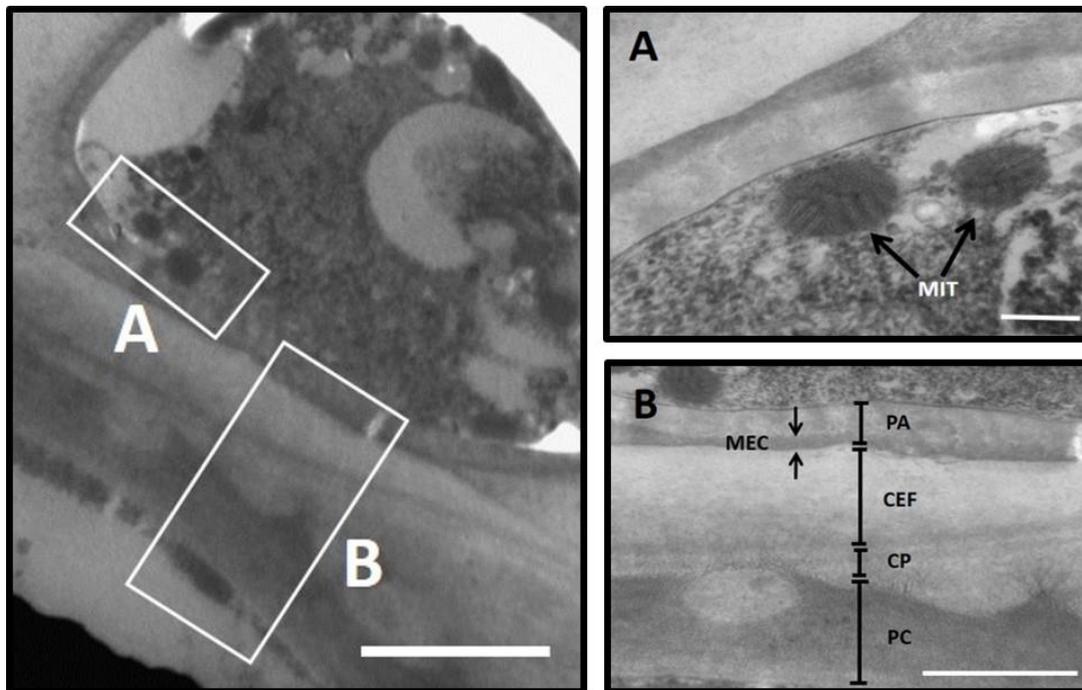


Figura 2.13 – Aspecto ultraestrutural da interação do apressório de *C. acutatum* com a superfície foliar de amostras provenientes de mudas de laranjeira 'Pêra', analisada 72 horas após a inoculação (Barra = 2 μm). A. Detalhes do apressório (Barra = 0,2 μm); B. Interação do apressório com a superfície foliar (Barra = 1.0 μm). MIT: mitocôndrias; MEC: matriz extracelular envolta no apressório; PA: parede do apressório; CEF: cutícula da epiderme foliar; PC: parede celular da epiderme foliar; CP: camada pectica

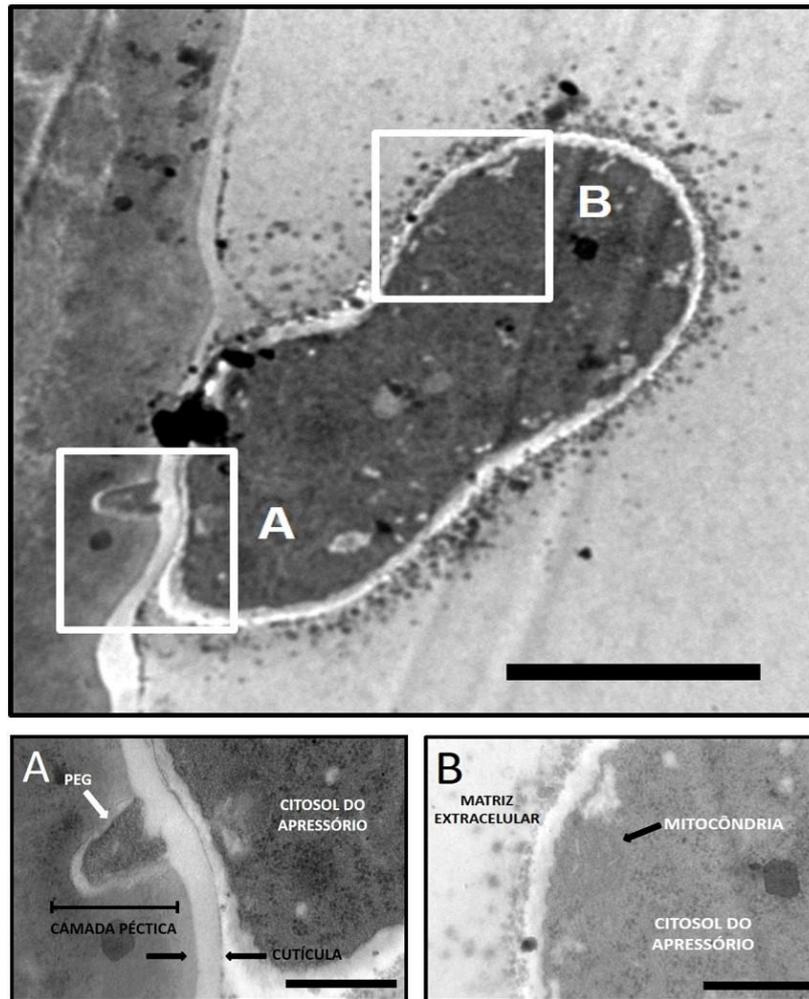


Figura 2.14 – Aspecto ultraestrutural da interação do apressório de *C. acutatum* com a superfície foliar de amostras provenientes de mudas de laranja 'Pêra', analisadas 168 horas após a inoculação (Barra = 2 μ m). A. Detalhe do *peg* no interior da camada cuticular (Barra = 0,5 μ m); B. Apressório envolto pela matriz extracelular e presença de mitocôndrias no citossol do apressório (Barra = 0,5 μ m)

Nas amostras coletadas 168 horas após a inoculação foram encontrados apressórios que emitiram o *peg* de penetração. Como notamos na Figura 2.14, esses apressórios, por meio da matriz extracelular, aderiram à superfície foliar e a partir do poro germinativo em sua base emitiram o *peg* de penetração. Da mesma forma que foi constatado nas amostras analisadas ao microscópio de luz, o *peg* ultrapassou a camada cuticular chegando até a camada pectínica, acima da parede periclinal externa da epiderme (Figura 2.14A).

A Figura 2.15 ilustra os perfis laterais, visualizados ao microscópio confocal, de amostras foliares coletadas 72 (Figuras 2.15A) e 168 horas (Figuras 2.15B), após a inoculação. As linhas tracejadas foram demarcadas nas imagens para delimitar a epiderme foliar, que não apresentou fluorescência. Nenhuma estrutura fúngica foi

notada abaixo da superfície foliar. Os apressórios mantiveram-se aderidos a superfície foliar, no entanto, nenhum *peg* de penetração foi observado a partir deles.

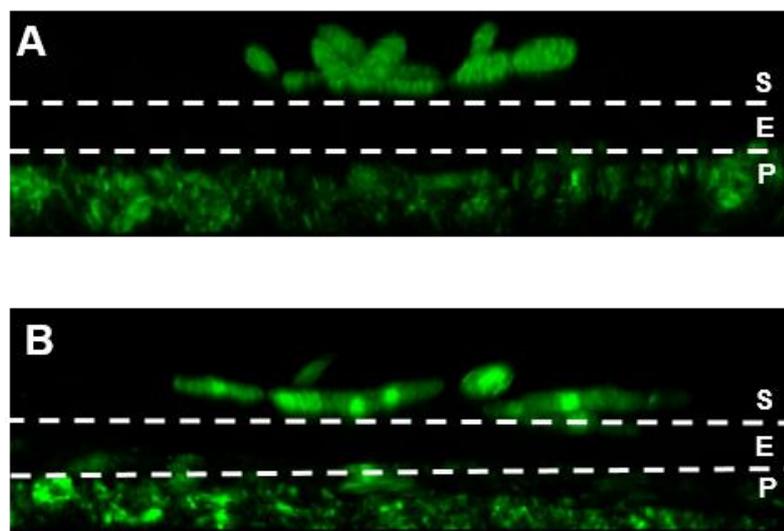


Figura 2.15 – Perfis laterais de imagens geradas em microscopia confocal, a partir da análise de amostras provenientes de folhas de laranjeira ‘Pêra’, inoculadas com *C. acutatum* (aumento 400x). A. Amostras coletadas 72 horas após a inoculação; B. Amostras coletadas 168 horas após a inoculação. P: parênquima; E: epiderme; S: superfície foliar

2.2.4 Discussão

Nos experimentos conduzidos em ambiente controlado, foi notada diferença de até três meses na sobrevivência do patógeno no primeiro ensaio, no entanto, no segundo essa diferença não ocorreu. Nesse caso, a temperatura não influenciou na sobrevivência do patógeno. Concordando com essa observação, Timmer e Zitko (1993) relataram que a temperatura não foi importante para o desenvolvimento da podridão floral em experimentos realizados no sul da Flórida. Da mesma forma, Denham e Waller (1981), em Belize, constataram que a temperatura, isoladamente, parece ser uma variável climática com pouca influência direta sobre a ocorrência de epidemias.

Vale a pena ressaltar que não houve molhamento foliar nos ensaios conduzidos em condições controladas. As plantas somente foram submetidas ao molhamento 48 horas antes de cada avaliação, por meio do contato com água destilada esterilizada ou água de lavagem de pétalas de laranjeira. Dessa forma,

pôde-se observar que o patógeno sobreviveu no mínimo quatro meses sobre as folhas cítricas sem molhamento foliar e em condições de laboratório. Considerando que no Estado de São Paulo, em condições normais, o período médio de estiagem pode chegar a três meses, tudo indica que o patógeno pode se manter viável na superfície das folhas nesse período sem chuvas. Entretanto, deve-se considerar também que no campo, as estruturas fúngicas estão sujeitas a outros fatores que concorrem para sua inativação, entre eles, a incidência de raios solares.

Como o gene GFP foi inserido aleatoriamente e, não se conhecendo qual seria o efeito dessa inserção no genoma e funcionalidade do metabolismo do patógeno, duas análises foram necessárias. A sobrevivência do patógeno, nesses ensaios, foi analisada tanto pela visualização da fluorescência (expressão gênica) de suas estruturas na superfície foliar, como pelo seu isolamento em meio semi-seletivo. Os resultados de ambas as análises concordaram entre si, demonstrando que a inserção da GFP não alterou nenhum processo metabólico importante para a sobrevivência do patógeno.

A metodologia utilizada para visualização das estruturas fúngicas fluorescentes proporcionou resultados semelhantes a metodologia de isolamento. No entanto, a primeira, por permitir uma avaliação da sobrevivência mais rápida e menos laboriosa, pode ser uma alternativa viável para monitorar a sobrevivência do patógeno em condições controladas. Porém, para a aplicação dessa técnica, é necessário que se tenha um isolado já transformado.

Nos primeiros meses de avaliação foi constatada que a sobrevivência do patógeno nas amostras tratadas com ALP foi significativamente maior do que a sobrevivência do mesmo nas amostras tratadas com ADE. Esse aumento pode ter sido influenciado, em grande parte, pelo estímulo da ALP sobre as estruturas do patógeno. Nas imagens geradas por análises das amostras em microscopia confocal notou-se maior produção de conídios secundários gerados a partir dos apressórios germinados nas amostras tratadas com ALP. Brand (2012), analisou as substâncias que estavam presentes na água de lavagem de pétalas de laranja 'Valencia' e identificou cafeína, flavonóides glicosilados hesperidina e naringina, além de compostos glicosilados e peptídeos. A autora assegura que a presença dessas substâncias pode contribuir para estimular o patógeno a produzir grande quantidade de conídios secundários. O estímulo do patógeno pela ALP e a intensa produção de novas estruturas têm sido evidenciada por alguns autores (TIMMER et al., 1994,

2010; MACKENZIE; PERES; TIMMER, 2010; MORAES, 2009; BRAND, 2012). No entanto, vale a pena ressaltar, que neste trabalho, esse estímulo foi verificado somente nos primeiros meses após a inoculação. Essa observação também foi relatada por Leandro et al. (2003) para morangueiro. Os autores perceberam que a propriedade de extratos florais de estimular a produção de conídios de *C. acutatum* diminui com a duração das condições sem molhamento foliar, possivelmente devido à redução na capacidade de sobrevivência do fungo. Afirmam ainda, que esse estímulo sugere que conídios não germinados, quando expostos ao extrato de flores, têm grande capacidade de produzir inóculo secundário em folhas de morangueiro quando comparado a conídios germinados somente em água. Dessa forma, embora a água de lavagem tenha estimulado a produção de inóculo do patógeno nos primeiros meses, a mesma não teve influência direta no período de sobrevivência de *C. acutatum*. Esse estímulo, como bem observado por Leandro et al. (2003), parece estar mais associado à produção de inóculo para a dispersão do patógeno do que na sobrevivência do mesmo.

Tanto os ensaios conduzidos em casa de vegetação quanto os conduzidos em condições ambientais mostram que chuvas regulares e longos períodos de molhamento foliar podem garantir a sobrevivência do patógeno na superfície foliar por vários meses. Concordando com essa observação, Silva-Júnior (2011) constatou que as epidemias de PFC foram devido à ocorrência de chuvas associadas ao aumento do período de molhamento foliar. O mesmo autor verificou que quanto maior o número de dias com chuvas (DCCH), maior foi incidência da doença no final do florescimento. Da mesma forma, Agostini, Gottwald e Timmer (1993), estudando a PFC na Flórida, observaram acréscimo da doença no campo em períodos chuvosos associados ao florescimento. Denham e Waller (1981) acrescentam ainda que grandes volumes de chuvas somente promoveram o incremento da doença quando estavam associados a um período de molhamento prolongado. Dessa forma, tudo indica que chuvas associadas a longos períodos de molhamento contribuem com a propagação e, conseqüentemente, com a sobrevivência do patógeno na superfície foliar durante o período entre as floradas.

Diferentemente das evidências que vinham sendo levantadas, não foi constatada colonização de *C. acutatum* nos tecidos foliares. As observações das amostras ao microscópio confocal, ao microscópio de luz e de transmissão evidenciaram que 168 horas após a inoculação, o *peg* de penetração ainda estava

restrito à cutícula e à camada péctica acima da parede celular das células epidérmicas. As análises ao microscópio confocal também revelaram, inequivocamente, ausência de estruturas fúngicas no interior ou entre as células da epiderme. O patógeno não ultrapassou a parede celular epidérmica em nenhuma das amostras analisadas e por nenhum dos métodos empregados. Estudos botânicos da camada cuticular contribuem com as observações obtidas nesse trabalho (ROELOFSEN, 1952). Roelofsen (1952) notou a presença de substâncias de natureza péctica abaixo da cutícula. Da mesma forma, Wood, Gold e Rawlins (1952) estudando a parede celular primária, constataram, ao remover a cutícula da superfície foliar, a existência de uma camada péctica entre a cutícula e a parede periclinal da epiderme. Esses autores enfatizaram que a presença da camada péctica abaixo da cutícula provavelmente explica por que os fungos crescem com frequência entre a cutícula e a parede epidérmica. Outros autores também relatam a ocorrência da camada péctica abaixo da cutícula e consideram que essa camada tem a função de unir a cutícula à parede periclinal externa das células epidérmicas (EVERT, 2006; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2009).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho e com base nos argumentos anteriormente mencionados, tudo indica que o peg de penetração, formado a partir dos apressórios de *C. acutatum*, fica restrito à cutícula e a camada péctica, de onde ele pode retirar nutrientes para a sobrevivência dos apressórios por períodos mais prolongados. Essa hipótese explicaria também o fato de ser possível recuperar *C. acutatum* por meio de isolamento em meios de cultivos, mesmo após desinfestação superficial, como foi mostrado nesse trabalho e também por MacKenzie, Peres e Timmer (2010).

2.3 Conclusões

Colletotrichum acutatum pode sobreviver em folhas de laranjeira no período entre as floradas, mediante constantes propagações de suas estruturas, estimuladas pelo molhamento foliar, e assim servir como fonte de inóculo primário para a ocorrência da doença.

Colletotrichum acutatum não coloniza as células epidérmicas de folhas de laranja. O peg de penetração emitido pelo patógeno fica restrito à camada péctica localizada entre a cutícula e a parede periclinal externa da epiderme.

Referências

- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 420-425, 1994.
- AGOSTINI, J.P.; GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 5, p. 485- 490, 1993.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M.R.T.; COSTA, C.G.; BARRA, C.F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 87-107.
- AMORIM, L; PASCHOLATI, S.F. Ciclos das relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. v. 1, p. 59-99.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology, and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.
- BRAND, S.C. **Isolamento e identificação de substâncias provenientes da laranja 'Valência' (*Citrus sinensis*) envolvidas no estímulo e/ou quebra da dormência de estruturas quiescentes de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros**. 2011. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- CINTRA, G.S. **Podridão Floral dos Citros: variabilidade, sobrevivência e controle do agente causal, *Colletotrichum acutatum***. 2009. 103p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.E.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version I. **Plant Molecular Biology Reporter**, Quebec, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.
- DENHAM, T.G.; WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 98, n. 1, p. 65-77, 1981.
- EASTBURN, D.M.; GUBLER, W.D. Strawberry anthracnose: detection and survival os *Colletotrichum acutatum* in soil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 2, p. 161-163, 1990.

EVERT, R.F. **Esau's plant anatomy**: meristems, cells, and tissues of the their structure, function, and development. 3rd ed. New York: John Wiley, 2006. p. 210-217.

FAGAN, H. J. Postbloom fruit drop, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 91, p. 3-20, 1979.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças de plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 239-269.

FRARE, G.F. **Sobrevivência de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros, em plantas daninhas**. 2011. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

FREEMAN, S. Management, survival strategies, and host range of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **HortScience**, Alexandria, v. 43, n. 1, p. 66-68, 2008.

FREEMAN, S.; SHALEV, Z.; KATAN, J. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 9, p. 965-970, 2002.

GOES, A.; KIMATI, H. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos: resistente ou insensível ao benomyl? **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 246-253, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de recuperação automática produção agrícola**. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 nov. 2013.

KARNOVISKY, M.J.A. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 1, p. 137-138, 1965.

LEANDRO, L.F.S.; GLEANSON, M.L.; NUTTER, F.W., JR.; WEGULO, S.N.; DIXON, P.M. Strawberry plant extracts stimulate secondary conidiation by *Colletotrichum acutatum* on symptomless leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 10, p. 1285-1291, 2003.

LIN, Y.; STOVER, E.; SONODA, R.; ROSSKOPF, E. Stigma and style necrosis is associated with postbloom fruit drop disease in citrus following artificial inoculation. **Hortscience**, Alexandria, v. 36, n. 6, p. 1138, 2001.

MACKENZIE, S.J.; PERES, N.A.; TIMMER, L.W. Colonization of citrus leaves and secondary conidiation response to citrus flower extracts by non-postbloom fruit drop strains of *Colletotrichum acutatum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 333-342, 2010.

MORAES, S.R.G. **Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros**. 2009. 114 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR, 2010. 137 p.

PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; ZITKO, S.E.; TIMMER, L.W. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 6, p. 620-624, 2002.

PERES, N.A.R.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 784-796, 2005.

PORTO, O.M.; ROSSETTI, V.; DORNELLES, C.M.M. Queda de frutos jovens de citros, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p. 681-692.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, n. 16, p. 208-213, 1963.

ROELOFSEN, P.A. On the submicroscopic structure of cuticular cell walls. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 99-114, 1952.

SILVA-JUNIOR, G.J. **Podridão Floral dos Citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença**. 2011. 131 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SONODA, R.M.; HEBB, J.W. Postbloom fruit drop in the Indian River citrus growing area: history and present status. **Citrus Industry**, Bartow, v. 72, p. 12-81, 1991.

SONODA, R.M.; PELOSI, R.R. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Winter Haven, v. 101, p. 36-38, 1988.

SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 650-655, 1996.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Timing of fungicide applications for control of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, p. 820-823, 1992.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p. 329-334, 1994.

WOOD, R.K.S.; GOLD, A.H.; RAWLINS, T.E. Microscopy of primary cell walls treated with pectic enzymes. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 39, n. 2, p. 132-133, 1952.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, Corvallis, v. 88, p. 121-128, 1996.

3 DETECÇÃO E MONITORAMENTO DE *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* EM FOLHAS DE CITROS

Resumo

A podridão floral dos citros é uma doença importante em várias países do continente americano. Tanto *C.acutatum* (Ca) quanto *C. gloeosporioides* (Cg) são considerados os agentes causais da doença. Esses patógenos têm, como tecidos suscetíveis, as pétalas da flor. Em folhas de *Citrus sinensis*, esses patógenos estão associados de forma assintomática. Atualmente a detecção desses fitopatógenos tem sido realizada por meio de métodos tradicionais. Entretanto, tais métodos não tem sido eficazes para a detecção dos fitopatógenos. Diante disso este trabalho busca o desenvolvimento de métodos específicos, mais sensíveis, mais rápidos e menos laboriosos que os tradicionais métodos rotineiramente utilizados. Busca também, o monitoramento da dinâmica populacional dos patógenos em pomares de duas distintas regiões do Estado de São Paulo. A partir da otimização, os iniciadores e sondas tiveram sua especificidade e sensibilidade avaliadas. Foi comparada a sensibilidade da qPCR com a PCR convencional e Nested-PCR e, também foi avaliada a influência do DNA da planta na amplificação da qPCR. Uma PRC multiplex em tempo real (qPCR multiplex) foi desenvolvida e sua sensibilidade foi avaliada. Diferentes protocolos de preparo das amostras e de obtenção do DNA também foram avaliados. A sensibilidade, especificidade, prevalência, resultados coincidentes, índice kappa, valores de falsos positivos e negativos foram determinados para validação dos métodos. Para o monitoramento do patógenos duas áreas produtivas, uma em Barretos e outra em Santa Cruz do Rio Pardo, foram selecionadas. Amostras provenientes de folhas dessas duas áreas foram coletadas, o seu DNA extraído e submetido à qPCR multiplex para a quantificação dos patógenos. As qPCR desenvolvidas foram específicas e altamente sensíveis para a detecção dos patógenos. A qPCR foi até 100 e 1000 vezes mais sensível que a Nested-PCR e a PCR convencional, respectivamente, para a detecção de Cg. Para a detecção de Ca a qPCR foi 1000 e 10000 vezes mais sensível que a Nested-PCR e PCR convencional, respectivamente. A qPCR foi capaz de detectar até 25 ou 2,5 fg de DNA de Ca ou Cg, respectivamente. O DNA da planta não interferiu na qPCR. A qPCR multiplex foi tão sensível quanto a qPCR. O congelamento e a maceração foram os métodos de preparo de amostras que melhor permitiram quantificar os patógenos nas folhas de citros. A extração convencional do DNA foi o método que melhor permitiu quantificar o DNA dos patógenos. O Spot e a extração do DNA tiveram a mesma sensibilidade para a detecção dos patógenos. Os métodos de extração do DNA convencional seguido da qPCR (CTAB-qPCR e Qiagen-qPCR) e o método do spot seguido da qPCR foram validados para a detecção dos patógenos. Ambos os métodos foram altamente eficientes e produziram resultados semelhantes para a detecção dos fitopatógenos. Esses métodos também foram validados para a multiplex qPCR. A área de Santa Cruz do Rio Pardo apresentou quantidade de inóculo de Ca consideravelmente maior que a de Barretos. Chuvas regulares propiciaram o aumento significativo na quantidade dos patógenos em ambas as áreas estudadas. O inóculo manteve-se concentrado no interior da copa da planta em épocas de pouca precipitação.

Palavras-chave: PCR em tempo real; PCR multiplex em tempo real; Quantificação de inóculo; *Colletotrichum gloeosporioides*

Abstract

The postbloom fruit drop (PFD) is a major disease affecting many citrus orchards in several countries of the American continent. Both *C. acutatum* (Ca) and *C. gloeosporioides* (Cg) are considered the causal agents PFD. The flower petals are the tissues susceptible to the pathogens. On leaves of *Citrus sinensis*, these pathogens are associated in an asymptomatic form. Currently the detection of phytopathogens is accomplished through traditional methods; however, these methods are not effective. Thus, this study seeks the development of specific, more sensitive, faster and less laborious methods. It also aims at monitoring the population dynamics of pathogens in orchards of two separate regions of São Paulo State in Brazil. From the optimization, the specificity and sensitivity of initiators and probes were evaluated. The sensitivity was compared in real-time PCR (qPCR) with the conventional PCR and Nested-PCR. The influence of plant DNA on qPCR amplification was also evaluated. A multiplex PCR real-time (multiplex qPCR) was developed and its sensitivity was analyzed. Different protocols for sample preparation and DNA extraction were also assessed. The sensitivity, specificity, prevalence, matching results, kappa index, values of false positives and negative were determined by the validation of methods. To monitor the pathogens, two producing regions, one in Barretos and another in Santa Cruz do Rio Pardo, were selected. Samples from leaves of these two areas were collected. Their DNA was extracted and submitted to the multiplex qPCR for pathogen quantification. The qPCR developed was specific and highly sensitive for the pathogen detection. The qPCR was up to 100 and 1000 times more sensitive than the Nested-PCR and conventional PCR, respectively, for Cg detection. For Ca detection, the qPCR was 1000 and 10000 times more sensitive than the Nested-PCR and the conventional PCR, respectively. The qPCR was able to detect up to 25 or 2.5 fg of DNA of Ca or Cg, respectively. The plant DNA did not affect the qPCR. The multiplex qPCR was as sensitive as the qPCR. Freezing and maceration were the methods of sample preparation that best allowed quantifying the pathogens on citrus leaves. The conventional DNA extraction was the method that best allowed quantifying the DNA of the pathogens. The spot and DNA extraction had the same sensitivity for pathogen detection. The conventional DNA extraction method followed by the qPCR (CTAB-qPCR and Qiagen-qPCR) and the spot method followed by qPCR were validated for pathogen detection. Both methods were highly efficient and produced similar results for the detection of the phytopathogens. These methods were also validated for the multiplex qPCR. The region of Santa Cruz do Rio Pardo presented quantity of Ca inoculum considerably larger than that in Barretos. Regular rainfall led to the significant increase in the number of pathogens in both areas. The inoculum remained concentrated within the plant canopy in times of low rainfall.

Keywords: Real-time PCR; Multiplex real-time PCR; Inoculum quantification; *Colletotrichum gloeosporioides*

3.1 Introdução

A podridão floral dos citros (PFC) está distribuída em vários países do continente americano e a queda prematura dos frutos, decorrente da doença, tem causado sérios prejuízos à produção de cítricos. A primeira observação da doença ocorreu em 1957, em Belize (FAGAN, 1979), onde foram registradas perdas de 65% (DENHAM, 1979). No Brasil, o primeiro relato dessa doença ocorreu em 1979, no Rio Grande do Sul (PORTO; ROSSETI; DORNELLES, 1979), sendo posteriormente identificada no Estado de São Paulo (FEICHTENBERGER, 1991). Na Flórida, a doença foi observada pela primeira vez durante a primavera de 1983 (SONODA; HEBB, 1991). Atualmente a doença tem causado sérios impactos à citricultura desses países, sendo de ocorrência esporádica e surgimento repentino, quando se tem chuva associada ao florescimento, podendo ocorrer perdas de até 100% (TIMMER et al., 1994, SILVA-JÚNIOR, 2011).

Inicialmente o agente causal da PFC foi descrito como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (FAGAN, 1979). Trabalhos posteriores identificaram três estirpes de *C. gloeosporioides*, com distintas características morfológicas e patogênicas, sendo apenas uma delas capazes de causar a PFC (AGOSTINI; TIMMER; MITCHELL 1992). Mais tarde, por meio de técnicas moleculares essa estirpe foi reclassificada como *C. acutatum* J.H. Simmonds (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996). Recentemente, Lima et al. (2011) relataram *C. gloeosporioides* como sendo um novo agente causal da PFC. Atualmente, tanto *C. acutatum* quanto *C. gloeosporioides* são relatados como os agentes causais da doença.

A doença afeta principalmente as pétalas das flores. No entanto, pode também afetar o pistilo (estigma e estilete) (FEICHTENBERGER et al., 2005; LIN et al., 2001). Os sintomas nas pétalas caracterizam-se por lesões marrons ou alaranjadas, com a presença de acérvulos contendo conídios envolvidos por mucilagem (FAGAN, 1984; TIMMER et al., 1994) e no pistilo por lesões de coloração marrom ou negra (LIN et al., 2001). Os frutos recém-formados apresentam descoloração amarelo-pálida e caem rapidamente. Já os discos basais, os cálices e os pedúnculos ficam firmemente aderidos aos ramos formando estruturas típicas da doença que recebem a denominação de “estrelinhas” (FEICHTENBERGER, 1991).

Embora as folhas não apresentem sintomas da doença, elas são consideradas fonte de inóculo primário, por abrigarem estruturas do patógeno que podem sobreviver nelas durante o período entre floradas (AGOSTINI; TIMMER, 1994).

Atualmente a detecção e identificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* tem sido realizada por meio da associação entre métodos de diagnose clássicos, como o isolamento do patógeno em meio de cultivo semi-seletivo, métodos moleculares, como a PCR convencional utilizando iniciadores específicos e métodos sorológicos, utilizando anticorpos específicos em um ensaio imunoenzimático (ELISA) (MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992; SREENIVASAPRASAD et al., 1996; WARD et al., 2004; GARRIDO et al., 2009). No entanto, esses métodos são demorados, podendo levar até 12 dias para obtenção dos resultados, além de serem incapazes de quantificar com precisão o patógeno (GARRIDO et al., 2009).

A PCR em tempo real (qPCR) tem apresentado inúmeras vantagens em relação aos métodos de detecção tradicionais, sorológicos e moleculares baseados na PCR convencional. Essa técnica não necessita de um procedimento após a reação (eletroforese em gel) e, é mais sensível, específica, rápida e menos laboriosa que os outros métodos tradicionalmente utilizados para a detecção de fitopatógenos (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; MUMFORD et al., 2006). Por ser específica permite a quantificação precisa do patógeno alvo. Esta quantificação é muito útil na fitopatologia, servindo para correlacionar a quantidade do patógeno presente em uma amostra biológica; para monitorar o progresso da doença numa planta infectada (GARRIDO et al., 2009) ou ainda monitorar a quantidade de inóculo no campo.

PCR multiplex consiste em uma amplificação simultânea de mais de uma sequência alvo em uma única reação (HENEGARIU et al., 1997). A PCR multiplex em tempo real (qPCR multiplex) é possível utilizando a tecnologia TaqMan®, desde que cada ensaio tem uma sonda específica marcada com um determinado corante fluorescente, resultando em diferentes cores. O sinal de cada corante é usado para quantificar separadamente a quantidade de cada sequência alvo. Essa técnica oferece várias vantagens em relação a PCR simplex em tempo real (MCCARTNEY et al., 2003). Dentre essas, dessa técnica pode-se destacar a economia de tempo e de reagentes, uma vez que combina vários alvos dentro da mesma reação. Além disso, proporciona maior confiabilidade dos resultados por reduzir as chances de

contaminação além de minimizar os erros de pipetagem (KLEIN, 2000; MCCARTNEY et al., 2003).

Atualmente métodos diretos de obtenção do DNA, como o Spot e Diluição, têm sido utilizados como alternativa aos métodos indiretos (extração do DNA). O Spot consiste na imobilização do patógeno, pelo depósito do extrato vegetal, obtido da maceração do tecido infectado, num fragmento de papel Whatman ou membrana de nylon carregada positivamente. Esse papel, posteriormente, ao ser colocado em contato com o tampão de extração, liberará o DNA do patógeno para essa solução, que será utilizada diretamente na PCR. A principal vantagem deste método é que as amostras imobilizadas no papel ou na membrana podem ser armazenadas antes do processamento, à temperatura ambiente ou à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até 2 anos sem perda de sensibilidade. Isso permite o envio de material a serem testados para outros laboratórios e o armazenamento das amostras por longo tempo (CAPOTE et al., 2009). Outra vantagem desse método, em relação a outros métodos diretos, é que inibidores e materiais orgânicos podem ficar retidos na membrana, melhorando o desempenho da reação. A Diluição, como o próprio nome diz, consiste na diluição do extrato vegetal, oriundo da maceração do tecido vegetal infectado, em tampão de extração. Essa própria solução diluída é utilizada na reação da PCR. A principal vantagem desse método é a rapidez na obtenção do DNA quando comparado aos tradicionais métodos de extração de DNA. (CAPOTE et al., 2009).

Com a informação quantitativa que a qPCR proporciona pode-se, por exemplo, estudar a dinâmica de fitopatógenos em distintas áreas para definir estratégias de controle da doença; monitorar patógenos que estão latentes nos tecidos vegetais e acompanhar o processo de colonização do patógeno no hospedeiro (GARRIDO et al., 2009; GACHON; SAINDRENAN, 2004).

Neste contexto, os objetivos do presente trabalho foram: desenvolver métodos específicos, mais sensíveis, mais rápidos e menos laboriosos que os tradicionais métodos rotineiramente utilizados e monitorar a dinâmica populacional dos patógenos da PFC em pomares de duas distintas regiões do Estado de São Paulo.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Detecção e quantificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em folhas de citros

3.2.1.1 Coleção de isolados e obtenção do DNA

Isolados monospóricos de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e de outras espécies fúngicas frequentemente associadas à doenças de plantas cítricas foram utilizadas para a condução dos experimentos. A relação dos isolados utilizados para a condução dos experimentos encontra-se listada na Tabela 3.1.

Os isolados foram preservados pela técnica da dessecação em papel de filtro, como descrito por Rojas et al. (2010) e sempre que necessário, fragmentos desses papéis foram transferidos para o meio de cultivo composto por Batata-Dextrose-Ágar (BDA) para reativação dos mesmos. Para condução dos experimentos os isolados reativados foram transferidos para outras placas contendo meio de cultura BDA e incubados a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias.

O DNA genômico foi obtido de suspensão de conídios, suspensão de inóculo proveniente da superfície foliar ou de extrato obtido pela maceração do tecido foliar. O DNA dessas amostras foi obtido por meio da extração do DNA ou por métodos de obtenção direta do DNA. A extração do DNA foi conduzida conforme o protocolo CTAB, estabelecido por Doyle e Doyle (1987), com algumas adaptações ou por meio de kit comercial de extração de DNA. A obtenção direta do DNA das amostras foi conduzida utilizando o método da Diluição (Di) ou Spot (Sp). A seguir serão descritos esses métodos de obtenção do DNA.

Método CTAB, com adaptações (CTAB) – Neste método, o DNA foi extraído a partir de aproximadamente 100 mg de micélio, 200 µL de suspensão de conídios, 200 µL de suspensão de inóculo oriundos da superfície foliar ou 200 µL do extrato obtido da maceração do tecido foliar. Para isso, 100 mg de micélio ou 200 µL de uma das suspensões foram depositados em microtubos de 1,5 mL aos quais foram

adicionados 400 µL do tampão de extração CTAB (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl, 1% PVP, 2% de β – mercaptoetanol). Após a agitação por um minuto, os tubos foram mantidos em aquecimento a 65 °C durante 30 minutos, sendo agitados manualmente a cada 10 minutos durante esse período. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 855 g durante cinco minutos. Do sobrenadante obtido após a centrifugação foram coletados 400 µL, os quais foram transferidos para microtubos de 2 mL que continham 400 µL de álcool clorofórmio/isolamílico (24/1). Os tubos foram agitados manualmente até obtenção de uma emulsão e centrifugados a 18.625 rpm durante 5 minutos. Foram coletados 200 µL da fase superior formada após a centrifugação e transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 120 µL de isopropanol. Esses tubos foram agitados manualmente, mantidos a -20 °C durante 30 minutos e centrifugados a 18.625 g durante 20 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante formado foi descartado do microtubos e nos mesmos foram adicionados 1 mL de etanol 70%. Os tubos foram agitados manualmente e centrifugados a 18.625 g durante 10 minutos. O sobrenadante formado após a centrifugação foi descartado e o pellet formado foi seco a temperatura ambiente durante cinco horas. Por fim o *pellet* foi ressuspensão em 100 µL de água Milli-Q e os microtubos contendo o DNA extraído foram mantidos a -20 °C.

Kit comercial Qiagen (Qiagen) - O DNA dessas amostras foi extraído utilizando o kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) e os procedimentos para extração do DNA foram de acordo com as instruções do fabricante.

Método da Diluição (Di) - Para obtenção do DNA, 5 µL da amostra foram depositados dentro de microtubos contendo 100 µL de tampão B (0.1 M de glicina; 0.05 M de NaCl; 1mM de EDTA). Os microtubos contendo a amostra diluída foram armazenados a -20 °C (CAPOTE et al., 2009).

Método do Spot (Sp) - Nesse método, fragmentos de papel de filtro Whatman 3MM, de aproximadamente 20 mm², foram acondicionados dentro de microtubos de 1,5 mL e 5 µL da amostra foram depositado sobre o papel. Os microtubos ficaram expostos à ventilação dentro de uma capela durante 30 minutos, para que os papéis contendo as amostras secassem. Posteriormente, 100 µL de tampão B (0,1 M de glicina; 0,05 M de NaCl; 1mM de EDTA) foram adicionados dentro de cada microtubo e os mesmos foram armazenados a -20 °C (CAPOTE et al., 2009).

Tabela 3.1 - Relação dos isolados utilizado nos estudos

Espécies	Código do isolado	Hospedeiro	Origem
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-1	<i>Citrus sinensis</i>	Santa Cruz do Rio Pardo-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-2	<i>Citrus sinensis</i>	Santa Cruz do Rio Pardo-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-3	<i>Citrus sinensis</i>	Santa Cruz do Rio Pardo-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-4	<i>Citrus sinensis</i>	Araraquara-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-5	<i>Citrus sinensis</i>	Gavião Peixoto-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-6	<i>Citrus sinensis</i>	Gavião Peixoto-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-7	<i>Citrus sinensis</i>	Pedranópolis-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-8	<i>Citrus sinensis</i>	Pedranópolis-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-9	<i>Citrus sinensis</i>	Cordeirópolis-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-10	<i>Citrus sinensis</i>	Taquarituba-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-11	<i>Citrus sinensis</i>	Mogi-Guaçu-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-12	<i>Citrus sinensis</i>	Mogi-Guaçu-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-13	<i>Citrus sinensis</i>	Barretos-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-14	<i>Citrus sinensis</i>	Barretos-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-15	<i>Citrus sinensis</i>	Barretos-SP
<i>Colletotrichum acutatum</i>	LFN-16	<i>Citrus sinensis</i>	Barretos-SP
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LFN-17	<i>Citrus latifoli</i>	Pardinho-SP
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LFN-18	<i>Citrus latifoli</i>	Mogi-Guaçu-SP
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LFN-19	<i>Citrus latifoli</i>	Mogi-Guaçu-SP
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LFN-20	<i>Citrus latifoli</i>	Mogi-Guaçu-SP
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LFN-21	<i>Citrus sinensis</i>	Gavião-Peixoto-SP
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LFN-22	<i>Citrus sinensis</i>	Pedranópolis-SP
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LFN-23	<i>Citrus sinensis</i>	Botucatu-SP
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LFN-24	<i>Citrus sinensis</i>	Araraquara-SP
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	LFN-25	<i>Citrus sinensis</i>	Gavião-Peixoto-SP
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	LFN-26	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Maringá-PR
<i>Colletotrichum musae</i>	LFN-27	<i>Musa paradisiaca</i>	Registro-SP
<i>Colletotrichum coccodes</i>	LFN-28	<i>Capsicum annuum</i>	Caxias do Sul-RS
<i>Colletotrichum truncatum</i>	LFN-29	<i>Glycine max</i>	Londrina-PR
<i>Colletotrichum capsici</i>	LFN-30	<i>Capsicum annuum</i>	Atibaia-SP
<i>Guignardia citricarpa</i>	LFN-31	<i>Citrus sinensis</i>	Araraquara-SP
<i>Alternaria alternata</i>	LFN-32	<i>Citrus sinensis</i>	Cordeirópolis-SP
<i>Phomopsis citri</i>	LFN-33	<i>Citrus sinensis</i>	Araraquara-SP

3.2.1.2 Iniciadores, sondas TaqMan® e condições da PCR convencional, Nested-PCR, PCR em tempo real e PCR multiplex em tempo real

As sequências dos iniciadores e sondas específicas para detecção e/ou quantificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* estão listados na Tabela 3.2.

Para a detecção e/ou quantificação, os iniciadores ACUT-F1 e ACUT-R2 em conjunto com a sonda TaqMan® ACUT-PB, e os iniciadores GLOE-F1 e GLOE-R1 em conjunto com a sonda TaqMan® GLOE-PB específicos para detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, respectivamente, foram utilizados nas qPCR e qPCR multiplex. As sondas TaqMan® foram marcadas com os corantes fluorescentes repórter FAM (6-carboxifluoresceína) (sonda ACUT-PB) ou VIC (4,7,2'-triclouro-7'-fenil-6-carboxifluoresceína) (sonda GLOE-F1) na posição 5' final e um corante fluorescente quencher TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina) na posição 3' final.

Tabela 3.2 - Sequências de iniciadores e sondas utilizados nos ensaios

Alvo	Iniciador/Sonda	Orientação	Técnica	Sequencia 5' - 3'
<i>Colletotrichum acutatum</i> ^b	ACUT-F1	Direta	TaqMan®	CGG AGG AAA CCA AAC TCT ATT TAC A
	ACUT-R2	Reversa	TaqMan®	CCA GAA CCA AGA GAT CCG TTG
	ACUT-PB	Sonda	TaqMan®	CGT CTC TTC TGA GTG GCA CAA GCA AAT AAT TAA A
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ^b	GLO-F1	Direta	TaqMan®	GGC GGG TAG GGT CYC CG ^a
	GLO-R1	Reversa	TaqMan®	ACT CAG AAG AAA CGT CGT TAA ATC AG
	GLO-PB	Sonda	TaqMan®	CTC CCG GCC TCC CGC CYC ^a
<i>C. acutatum</i> ^c	CaInt ^f	Direta	PCR convencional e Nested-PCR	GGG GAA GCC TCT CGC GG
<i>C. gloeosporioides</i> ^d	CgInt ^f	Direta	PCR convencional e Nested-PCR	GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG
ITS1-5.8S-ITS2 ^e	ITS4	Reversa	PCR convencional e Nested-PCR	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
	ITS5	Direta	Nested-PCR	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G

^a Y =(C +T)

^bGarrido et al. (2009)

^cSreenivasaprasad et al. (1996)

^dMills et al. (1992)

^eWhite et al. (1990)

^fUsado em conjunto com o iniciador reverso ITS4

A qPCR e qPCR multiplex foram obtidas utilizando o sistema de detecção ABI StepOne™ Real-Time. A qPCR foi realizada em volume total de 12 µL por reação, contendo 3 µL do DNA da amostra, 10 µM de cada iniciador, 6 µL de Path-ID™ qPCR Master Mix (Applied Biosystems®) e 10 µM da sonda TaqMan®. Na qPCR multiplex foram utilizados 3 µL do DNA, 100 µM dos pares de iniciadores, 6 µL de Path-ID™ qPCR Master Mix (Applied Biosystems®) e 10 µM da sonda TaqMan®, em um volume total de 12 µL por reação. Tanto na qPCR quanto a multiplex qPCR o termociclador foi programado para um ciclo a 95 °C durante 10 minutos, 45 ciclos a 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 60 segundos. A quantificação foi realizada usando a técnica da curva padrão, utilizando diluição seriada de dez vezes (2.5×10^1 a 2.5×10^6 ng para *C. acutatum* e 2.5×10^1 a 2.5×10^7 para *C. gloeosporioides*) de DNA genômico a partir dos isolados LFN-1 e LFN-22. Três reações da qPCR foram repetidas para estabelecer as curvas de regressão linear entre o 'threshold cycle' (C_T) e o logaritmo das concentrações de DNA genômico seriadas.

Para detecção por meio da PCR convencional foram utilizados os iniciadores Calnt2 e Cglnt, ambos em conjunto com o iniciador ITS4 para amplificação da região ITS do DNA ribossômico. A reação foi realizada utilizando-se 25 µL de solução, em água Milli-Q, contendo 2 µL do DNA da amostra, 2,5 µL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 µM de cada um dos iniciadores (Calnt2 e ITS4 ou Cglnt e ITS4) e 0,04 unidades de Taq DNA polimerase. Para a reação, o termociclador foi programado para um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 62 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60 °C e 90 segundos a 72 °C, finalizando com 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 90 segundos a 72 °C. Após a reação da PCR, os produtos foram aplicados em gel de agarose 1% em tampão 0,5x Tris-borato-EDTA (TBE), corado com SYBR Safe™ DNA gel Stain (Invitrogen Corporation) e as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador de ultravioleta e fotografadas.

A Nested-PCR foi conduzida utilizando, na primeira reação, o iniciador ITS5 em conjunto com o iniciador ITS4, para amplificação da região ITS do DNA ribossômico. Na segunda reação foram utilizados os iniciadores Calnt2/ITS4 ou Cglnt/ITS4, específicos para *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides*, respectivamente. A primeira reação da PCR foi realizada utilizando em volume total de 20 µL, contendo

2 μL do DNA das amostras, 2 μL de cada um dos iniciadores a 0,25 μM , 0,2 mM de dNTP, tampão 5x para PCR, 2,5 mM de MgCl_2 , 5 unidades de GoTaq Flexi DNA polimerase (Promega). A amplificação dessa primeira reação foi baseada numa desnaturação inicial a 95 °C durante 90 segundos; seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 35 segundos, anelamento a 55 °C durante 1 minuto, e extensão a 72 °C durante 1 minuto e um alongamento final a 72 °C durante 1 minuto. Para a segunda reação foram utilizados, 2 μL do produto da primeira reação, diluído 10 vezes; 2,5 μL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 μM de cada um dos iniciadores e 0,04 unidades de Taq DNA polimerase. Um controle negativo foi incluído em todos os experimentos. Os produtos das reações da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5x, corado com SYBR Safe™ DNA gel Stain (Invitrogen Corporation) e fotografado sob iluminação ultravioleta (PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2008).

3.2.1.3 Especificidade dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizados na PCR em tempo real

A especificidade dos iniciadores e sondas para qPCR foi testada utilizando a coleção de isolados descrita na Tabela 1. Todos os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. O DNA desses isolados foi obtido mediante a extração utilizando-se o protocolo CTAB modificado, como descrito anteriormente, e sua concentração ajustada para 20 ng mL^{-1} . As amplificações da qPCR foram conduzidas em triplicata em um termociclador StepOne™ Real-Time. Os componentes e as condições da qPCR estão descritos no item 3.2.1.2.

3.2.1.4 Sensibilidade comparativa entre a PCR convencional, Nested-PCR e PCR em tempo real

Os ensaios para avaliar a sensibilidade dos iniciadores e sondas TaqMan® foram conduzidos utilizando o isolado LFN-1 (*Colletotrichum acutatum*) e o isolado

LFN-22 (*Colletotrichum gloeosporioides*). Ambos os isolados foram cultivados em meio de Aveia-Ágar (60 g de farinha de aveia, 12 g de ágar, 1000 mL de água destilada esterilizada) a 25 °C, sob fotoperíodo contínuo, durante sete dias, para induzir a produção de conídios. Os conídios produzidos no meio de cultivo foram ressuspensos em 10 mL de água destilada esterilizada e filtrados em gaze esterilizada para obtenção das suspensões de esporos. Essas suspensões foram ajustadas para a concentração de 1×10^7 conídios mL⁻¹ e a partir daí foram obtidas diluições seriadas (diluições de 10 vezes) de modo a obter a concentração de 1×10^7 até 1×10^1 conídios mL⁻¹. Duzentos microlitros de cada diluição de conídios foram coletadas, transferidas individualmente para microtubos de 2 mL e o DNA extraído utilizando o kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O DNA obtido de cada diluição foi utilizado na PCR convencional, Nested-PCR e qPCR. Os iniciadores, sondas e condições das reações estão descritos no item 3.2.1.2. A sensibilidade da qPCR foi comparada com a sensibilidade da PCR convencional e Nested-PCR para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

3.2.1.5 Sensibilidade dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizados na PCR em tempo real e PCR multiplex em tempo real

Para avaliar a influência do DNA da planta na sensibilidade da qPCR, um ensaio foi realizado utilizando-se o DNA do patógeno isoladamente ou em combinação com o DNA da planta. A comparação dos valores C_T dessas reações evidenciou se o DNA da planta exerceu alguma influência na sensibilidade da qPCR. Para conduzir esses ensaios, os isolados LFN-1 e LFN-22 foram cultivados em meio de cultivo BDA, a 25 °C, no escuro, durante sete dias. O DNA do micélio produzido foi extraído utilizando o kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop®) e sua concentração ajustada para 25 ng µL⁻¹. Diluições seriadas de 10 vezes, a partir de 25ng µL⁻¹ foram realizadas até a obtenção de 250 fg µL⁻¹. Paralelamente, folhas sadias foram maceradas em tampão fosfato salino (PBS) 1X e o seu DNA foi extraído utilizando o kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop®) e sua

concentração ajustada para 20 ng μL^{-1} . A partir do DNA extraído, dois ensaios foram conduzidas. Em um ensaio, 50 μL de cada concentração de DNA do patógeno foram depositados, individualmente, em microtubos e sobre esses foram adicionados 50 μL do DNA da planta na concentração de 20 ng mL^{-1} . No outro ensaio 50 μL de cada concentração de DNA do patógeno foram depositados, individualmente, em microtubos e, sobre esses, foram adicionados 50 μL de água milli-Q. Para cada combinação foi conduzida uma qPCR utilizando os iniciadores e sondas específicos para detecção e quantificação de *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides*. As condições da reação e os iniciadores e sondas utilizados estão descritos no item 3.2.1.2.

Outro ensaio foi conduzido para analisar se as sondas e os iniciadores utilizados na qPCR multiplex teriam a mesma sensibilidade apresentada pela qPCR. Os isolados LFN-1 e LFN-22 foram cultivados em meio de cultivo e seu DNA foi extraído da mesma forma como descrito no ensaio anterior. O DNA de cada isolado foi ajustado para a concentração de 20 ng μL^{-1} e três combinações foram realizadas: I- 50 μL do DNA de *C. acutatum* foi misturado a 50 μL de DNA de *C. gloeosporioides*; II- 50 μL do DNA de *C. acutatum* foi misturado com 50 μL de água milli-Q; III- 50 μL do DNA de *C. gloeosporioides* foi misturado com 50 μL de água milli-Q. A partir dessas amostras, foram conduzidas as qPCR e qPCR multiplex. As condições da reação e os iniciadores e sondas utilizados estão descritos no item 3.2.1.2.

3.2.1.6 - Avaliação de distintos métodos de preparo de amostras e de obtenção do DNA para a detecção e quantificação de *C. acutatum* em folhas de citros

Diferentes métodos para o processamento das amostras foram avaliados para determinar o(s) mais eficiente(s) para detecção e quantificação de *C. acutatum* em folhas de citros.

Os ensaios foram conduzidos utilizando mudas de laranjeira 'Valencia', produzidas e mantidas em estufas. Folhas jovens, com cinco a sete meses de idade, provenientes dessas mudas foram selecionadas, destacadas e encaminhadas para o laboratório. As folhas foram submersas em água destilada esterilizada para a remoção de possíveis resíduos de poeira e envoltas por papel de filtro esterilizado para absorção da água na superfície foliar. As mesmas foram acondicionadas sobre

uma folha de papel de filtro umedecido, contido em placas de poliestireno de 140 mm de diâmetro e inoculadas com o isolado LFN-1 (*C. acutatum*). Para isso o isolado foi cultivado em meio de cultivo de Aveia-Ágar, a 25 °C, em regime de luz contínua, durante sete dias. Os conídios formados no meio de cultivo foram ressuspensos em 10 mL de água destilada esterilizada, filtrados através de gaze esterilizada, para obtenção da suspensão de conídios, que posteriormente foi ajustada para a concentração de 1×10^5 conídios mL⁻¹. Na superfície de cada folha foram pulverizados 1 mL da suspensão de conídios do patógeno. As folhas que serviram como controle foram pulverizadas com água destilada esterilizada, em vez da suspensão de conídios. As folhas inoculadas foram incubadas a 25 °C, em fotoperíodo de 12 horas, durante 72 horas, sendo posteriormente submetidas aos métodos de processamento de amostras a serem avaliados. Os métodos para o processamento das amostras estão descritos a seguir.

I- *Maceração* (MA): Cada folha foi acondicionada, individualmente, dentro de bolsas de extração de material vegetal (Bioreba) contendo 10 mL de PBS e maceradas em homogeneizador HOMEX 6 (Bioreba) até obtenção do extrato foliar. O extrato obtido foi ressuspensão em 40 mL de PBS e homogeneizados;

II- *Congelamento* (CO): Cada folha foi acondicionada em uma bolsa de extração de material vegetal (Bioreba) contendo 20 mL de tampão PBS e submersa em nitrogênio líquido durante 20 segundos. Após esse período, o gelo formado foi raspado da superfície foliar e resuspendido em 30 mL de PBS;

III- *Lavagem foliar* (LF): Cada folha foi imersa em 50 mL de tampão PBS acrescido de 0.05 % de Tween 20, seguindo de fricção da face inoculada nas malhas de uma bolsa de extração de material vegetal (Bioreba[®]) repetidas vezes, durante 3 minutos;

IV- *Sonicação* (SO): Cada folha foi imersa em 50 mL de tampão PBS, contendo 0.05% de Tween 20, agitadas por 3 minutos e sonicadas durante 30 minutos em um sonicador;

V- *Agitação com Tween* (AGT): Cada folha foi imersa em 50 mL de tampão PBS acrescido de 0.05 % de Tween 20 e agitada manualmente dentro de bolsa de plástico lacrada durante 3 minutos;

VI- *Agitação* (AG): Cada folha foi imersa em 50 mL de tampão PBS e agitada manualmente dentro de uma bolsa plástica lacrada durante 3 minutos.

Após o processamento das amostras, cada suspensão ou extrato obtido foi centrifugado a 3.000 rpm e 10 mL do sobrenadante foram transferidos,

individualmente, para tubos plásticos e armazenados a -20 °C. Os métodos diretos (Spot e Diluição) e indiretos (extração do DNA com CTAB e Qiagen) foram utilizados para obtenção do DNA das suspensões ou extrato obtidos no processamento das amostras. Os protocolos de obtenção do DNA por esses métodos estão descritos no item 3.2.1.1. Com o DNA obtido das amostras, foram conduzidas as qPCR utilizando os iniciadores e sondas específicos para detecção e quantificação de *C. acutatum*. As condições da reação e os iniciadores e sondas utilizados estão descritos no item 3.2.1.2.

3.2.1.7 Sensibilidade dos métodos de obtenção do DNA

Nesse ensaio foi avaliada a sensibilidade dos métodos da Diluição (Di), Spot (Sp) e extração do DNA utilizando o protocolo CTAB (CTAB) utilizando diluições seriadas a partir do extrato foliar obtido. Para isso, folhas de laranjeira 'Valencia' foram inoculadas com 1×10^5 conídios mL⁻¹ de *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides*, seguindo os mesmos procedimentos de inoculação descritos no item 3.2.1.6, e processadas pela maceração do tecido vegetal, como descritos no item 3.2.1.6. Em seguida o extrato bruto foi submetido a diluições seriadas, diluindo-o até 1×10^{-6} . Cada diluição foi submetida aos três métodos de obtenção do DNA (Di, Sp e CTAB), seguindo os procedimentos descritos no item 3.2.1.1. O DNA das amostras foi submetido a qPCR utilizando os iniciadores e sondas específicos para detecção e quantificação de *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides*. As condições da reação e os iniciadores e sondas utilizados estão descritos no item 3.2.1.2.

3.2.1.8 Avaliação e validação de métodos para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*

A sensibilidade, especificidade, prevalência, falsos positivos, falsos negativos, resultados coincidentes e índice Kappa, foram calculados para avaliar e validar o(s) método(s) de detecção (CAPOTE et al., 2009; VIDAL et al., 2012).

A sensibilidade e especificidade são indicadores da capacidade operacional de uma técnica, fornecendo informações sobre a proporção de verdadeiros positivos

e verdadeiros negativos identificados pelo método. A prevalência representa a porcentagem de plantas infectadas em um determinado período do tempo. Falsos positivos ou negativos representam a frequência de resultados não verdadeiros que a técnica produz. O índice Kappa é utilizado para comparar duas técnicas entre si e relacionar o quanto uma técnica é similar a outra. Esse índice elimina a influência do acaso, sendo portanto um ótimo parâmetro para validação de metodologia.

Dois ensaios foram conduzidos para obtenção desses parâmetros. Um ensaio foi conduzido a partir de amostras inoculadas em laboratório e o outro a partir de amostras provenientes de campos de produção de citros. No primeiro ensaio, foram utilizadas 156 folhas de laranjeira 'Valencia' inoculadas com 1×10^5 conídios mL⁻¹ de *C. acutatum*, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.2.1.6, e 71 folhas sadias. Cada folha foi processada individualmente, por meio do método do congelamento, como descrito no item 3.2.1.6. Posteriormente foram submetidas aos métodos de obtenção do DNA seguidos da qPCR, [Diluição (Di-qPCR), Spot (Sp-qPCR), extração do DNA pelo método CTAB (CTAB-qPCR) e extração do DNA utilizando o Kit de extração da Qiagen (Qiagen-qPCR)], para detecção de *C. acutatum* nas folhas de citros. As condições da reação e os iniciadores e sondas utilizados nesse ensaio estão descritas no item 3.2.1.2. Por meio desse ensaio foram determinados sensibilidade, especificidade, prevalência, falsos positivos e falsos negativos. O outro ensaio foi conduzido utilizando amostras provenientes do campo. Para isso três diferentes campos de produção de cítricos foram amostrados e as folhas foram coletadas para a condução dos ensaios. Cada campo formou uma população de amostras a serem analisadas. A população de amostras 1 foi formada por folhas de limoeiro 'fino' oriundas de campos de produção de cítricos da província Murcia - Espanha. A população 2 foi originada por folhas de laranjeira 'Valencia' provenientes da região de Barretos - São Paulo. A população 3 foi constituída por folhas provenientes da região de Santa Cruz do Rio Pardo - São Paulo. As folhas coletadas foram submetidas, individualmente, ao método do congelamento, como descrito no item 3.2.1.6 e analisadas pela técnica da Diluição-PCR multiplex em tempo real (Di-qPCR multiplex), Spot-PCR multiplex em tempo real (Sp-qPCR multiplex) e CTAB-PCR multiplex em tempo real (CTAB-qPCR multiplex). Nesse ensaio foram calculados os valores coincidentes e o índice Kappa.

3.2.2 Monitoramento quantitativo de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em folhas de citros oriundas de pomares de laranja no Estado de São Paulo

3.2.2.1 Seleção das áreas de estudo

Para a condução dos ensaios, dois pomares de produção comercial de laranja doce foram selecionados. Um pomar de laranja doce 'Pêra' foi selecionado na região de Barretos e o outro de laranja doce 'Valencia' em Santa Cruz do Rio Pardo, ambos pertencentes ao Estado de São Paulo. Esses pomares foram selecionados por estarem localizados em regiões com distintas condições climáticas e diferentes históricos da doença. Dados climáticos de temperatura e precipitação foram obtidos por meio de estações meteorológicas instaladas nessas regiões. Os ensaios foram conduzidos entre julho de 2012 e julho de 2013.

3.2.2.2 Amostragem

Em cada área de estudo foram selecionadas aleatoriamente 30 plantas. Essas plantas foram identificadas e georreferenciadas, para que sempre fossem coletadas as amostras na mesma árvore. De cada planta foram coletadas 15 folhas no interior e 15 folhas na periferia de sua copa. As folhas coletadas de cada planta foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos, identificadas e encaminhadas para o laboratório para posterior processamento das amostras. A amostragem foi realizada mensalmente no período de julho de 2012 a julho de 2013.

3.2.2.3 Preparo das amostras

Para o processamento das amostras foi utilizado o método do congelamento, como descrito no item 3.2.1.6. Para isso, das 15 folhas amostradas no interior ou na periferia da planta, foram produzidas cinco subamostras contendo três folhas cada. Cada unidade experimental foi representada por uma subamostra.

Dessa forma, de cada planta, foram analisadas cinco amostras obtidas das folhas do interior da copa e outras cinco amostras obtidas de folhas da periferia da copa.

3.2.2.4 Obtenção do DNA, análises das amostras pela PCR multiplex em tempo real e avaliação dos dados

As suspensões de inóculo obtidas a partir do processamento das amostras tiveram seu DNA extraído para serem submetidas a detecção e quantificação pela qPCR multiplex. O DNA das amostras foi obtido segundo o protocolo CTAB modificado, como descrito no item 3.2.1.1 Os reagentes e as condições de amplificação utilizados para conduzir a qPCR multiplex estão descritos no item 3.2.1.2. O DNA foi quantificado por meio da interpolação dos valores de C_T obtidos com a quantidade estabelecida na curva padrão desenvolvida para a quantificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Esses dados quantitativos foram associados aos dados coletados pelas estações meteorológicas para interpretações da dinâmica populacional dos patógenos nas duas áreas em estudo.

3.3 Resultados

3.3.1 Especificidade dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizados na PCR em tempo real

Trinta isolados de *Colletotrichum* spp. e três isolados de outras espécies de fungos frequentemente associados a plantas cítricas foram utilizados como alvo para avaliar a especificidade dos iniciadores e sondas TaqMan®. Os resultados das qPCR mostraram a amplificação do DNA de 25 isolados cujos valores de C_T variaram entre 24.8 e 28.8 (Figura 3.3).

Tabela 3.3 - Especificidade dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizadas nos ensaios para a detecção e quantificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*

Código do isolado	Espécie	Valores de C _T ^a	
		Iniciadores e sonda para <i>C. acutatum</i>	Iniciadores e sonda para <i>C. gloeosporioides</i>
LFN-1	<i>C. acutatum</i>	27.68 ± 0.62	> 44 ± 0 ^b
LFN-2	<i>C. acutatum</i>	28.84 ± 0.21	> 44 ± 0
LFN-3	<i>C. acutatum</i>	27.48 ± 0.55	> 44 ± 0
LFN-4	<i>C. acutatum</i>	27.41 ± 0.69	> 44 ± 0
LFN-5	<i>C. acutatum</i>	28.24 ± 0.15	> 44 ± 0
LFN-6	<i>C. acutatum</i>	27.33 ± 0.38	> 44 ± 0
LFN-7	<i>C. acutatum</i>	27.99 ± 0.88	> 44 ± 0
LFN-8	<i>C. acutatum</i>	28.25 ± 0.42	> 44 ± 0
LFN-9	<i>C. acutatum</i>	28.11 ± 0.31	> 44 ± 0
LFN-10	<i>C. acutatum</i>	27.75 ± 0.18	> 44 ± 0
LFN-11	<i>C. acutatum</i>	27.92 ± 0.02	> 44 ± 0
LFN-12	<i>C. acutatum</i>	27.84 ± 1.21	> 44 ± 0
LFN-13	<i>C. acutatum</i>	28.71 ± 0.88	> 44 ± 0
LFN-14	<i>C. acutatum</i>	27.37 ± 1,53	> 44 ± 0
LFN-15	<i>C. acutatum</i>	27.78 ± 0.02	> 44 ± 0
LFN-16	<i>C. acutatum</i>	28.64 ± 0.43	> 44 ± 0
LFN-17	<i>C. gloeosporioides</i>	> 44 ± 0	24.45 ± 1.35
LFN-18	<i>C. gloeosporioides</i>	> 44 ± 0	25.33 ± 0.45
LFN-19	<i>C. gloeosporioides</i>	> 44 ± 0	24.84 ± 1.72
LFN-20	<i>C. gloeosporioides</i>	> 44 ± 0	25.54 ± 0.57
LFN-21	<i>C. gloeosporioides</i>	> 44 ± 0	25.71 ± 0.08
LFN-22	<i>C. gloeosporioides</i>	> 44 ± 0	24.96 ± 0.93
LFN-23	<i>C. gloeosporioides</i>	> 44 ± 0	25.14 ± 0.23
LFN-24	<i>C. gloeosporioides</i>	> 44 ± 0	24.91 ± 0.88
LFN-25	<i>C. gloeosporioides</i>	> 44 ± 0	25.67 ± 0.62
LFN-26	<i>C. lindemuthianum</i>	> 44 ± 0	> 44 ± 0
LFN-27	<i>C. musae</i>	> 44 ± 0	> 44 ± 0
LFN-28	<i>C. coccodes</i>	> 44 ± 0	> 44 ± 0
LFN-29	<i>C. truncatum</i>	> 44 ± 0	> 44 ± 0
LFN-30	<i>C. capsici</i>	> 44 ± 0	> 44 ± 0
LFN-31	<i>G. citricarpa</i>	> 44 ± 0	> 44 ± 0
LFN-32	<i>A. alternata</i>	> 44 ± 0	> 44 ± 0
LFN-33	<i>P. citri</i>	> 44 ± 0	> 44 ± 0
Controle negativo		> 44 ± 0	> 44 ± 0

^a Dados são valores de três repetições ± Erro padrão.

^b >44 – Indica um resultado negativo por não ocorrer amplificação do DNA até o último ciclo avaliado (ciclo 44).

Alto nível de especificidade dos iniciadores ACUT-F1 e ACUT-R2 e da sonda ACUT-PB foi observado quando avaliados para os 33 isolados utilizado nesse ensaio (Figura 3.3). Nas reações onde foram utilizados esses iniciadores e sondas, somente os isolados de *C. acutatum* apresentaram valores de C_T menores que 29 ciclos. Os valores de C_T desses isolados variaram de 27.3 a 28. Os demais isolados não apresentaram amplificação do DNA, não sendo detectados até o ciclo 44 (Tabela 3.3).

Os iniciadores GLO-F1 e GLO-R1 e a sonda GLO-PB foram altamente específicas para detectar os isolados de *C. gloeosporioides*. Dos 33 isolados avaliados, apenas os nove isolados de *C. gloeosporioides* foram detectados e apresentaram C_T menores que 26 ciclos. Os C_T obtidos dessas amplificações variaram entre 24.8 e 25.7. Todos os outros isolados das espécies fúngicas avaliadas não foram detectados até o ciclo 44 (valores de $C_T > 44$) (Tabela 3.3).

3.3.2 Sensibilidade comparativa entre a PCR convencional, Nested-PCR e PCR em tempo real

A sensibilidade da PCR em tempo real, Nested-PCR e PCR convencional foram comparadas entre si, por meio do DNA obtido de diferentes suspensões de conídios. As Tabelas 3.4 e 3.5 apresentam os dados dessa comparação para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, respectivamente.

A PCR em tempo real conduzida com os iniciadores e sondas específicos para detecção de *C. acutatum*, mostrou-se ser 1000 vezes mais sensível que a Nested-PCR e 10000 mais sensível que a PCR convencional, ao se analisarem as diferentes concentrações de *C. acutatum*. A concentração de 1×10^2 conídios mL^{-1} de *C. acutatum* foi a menor concentração detectável pela PCR em tempo real e o C_T das amostras amplificadas variou entre 20.54 e 34.52. Na Nested-PCR detectou-se *C. acutatum* a partir da concentração de 1×10^5 conídios mL^{-1} enquanto que a PCR convencional detectou *C. acutatum* somente a partir da concentração de 1×10^6 conídios mL^{-1} (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Sensibilidade comparativa entre a PCR em tempo real (qPCR), Nested-PCR e PCR convencional para detecção de *C. acutatum*

	Conídios mL ⁻¹						
	1x10 ⁷	1x10 ⁶	1x10 ⁵	1x10 ⁴	1x10 ³	1x10 ²	1x10 ¹
qPCR (Valores de C _T) ^a	20.54	23.55	25.89	30.62	32.44	34.52	>44 ^b
Nested-PCR							
PCR convencional							

^aC_T – “Cycle Threshold”. Os valores representam a média de três repetições

^b>44 – Indica um resultado negativo por não ocorrer amplificação do DNA até o último ciclo avaliado (ciclo 44)

Os ensaios conduzidos utilizando os iniciadores e sondas específicos para detecção de *C. gloeosporioides* por meio da PCR em tempo real, mostrou ser 100 vezes mais sensível que a Nested-PCR e 1000 vezes mais sensível que a PCR convencional. Nessa qPCR, 1 x 10² conídios mL⁻¹ de *C. gloeosporioides* foi a menor concentração detectada e os valores de C_T das concentrações detectáveis variaram entre 19.77 e 33.01. Os ensaios conduzidos com a Nested-PCR proporcionaram detecção a partir da concentração de 1 x 10⁴ conídios mL⁻¹, enquanto que os ensaios conduzidos com a PCR convencional somente detectaram *C. gloeosporioides* a partir da concentração de 1 x 10⁵ conídios mL⁻¹ (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Sensibilidade comparativa entre a PCR em tempo real (qPCR), Nested-PCR e PCR convencional para a detecção de *C. gloeosporioides*

	Conídios mL ⁻¹						
	1x10 ⁷	1x10 ⁶	1x10 ⁵	1x10 ⁴	1x10 ³	1x10 ²	1x10 ¹
qPCR (Valores de C _T) ^a	19.77	22.45	25.12	28.94	30.22	33.01	> 44 ^b
Nested-PCR							
PCR convencional							

^aC_T – “Cycle Threshold”. Os valores representam a média de três repetições

^b>44 – Indica um resultado negativo por não ocorrer amplificação do DNA até o último ciclo avaliado (ciclo 44)

3.3.3 Sensibilidade e eficiência dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizados para a PCR em tempo real e PCR multiplex em tempo real

A curva padrão para a quantificação do DNA de *C. acutatum* foi obtida baseando-se em três repetições de cada diluição seriada do DNA extraído do isolado LFN-1 de *C. acutatum*. A correlação entre os valores de C_T e os valores em log das diferentes concentrações do DNA foram lineares ($y = -3.714x + 17.972$, $R^2 = 0,999$) proporcionando detecção limite de 25 fg de DNA do patógeno alvo (Figura 3.1). A eficiência dos iniciadores e sondas desenvolvidos para *C. acutatum* ultrapassou os 99% ao longo das seis ordens de magnitude da concentração do fungo (Figura 3.1).

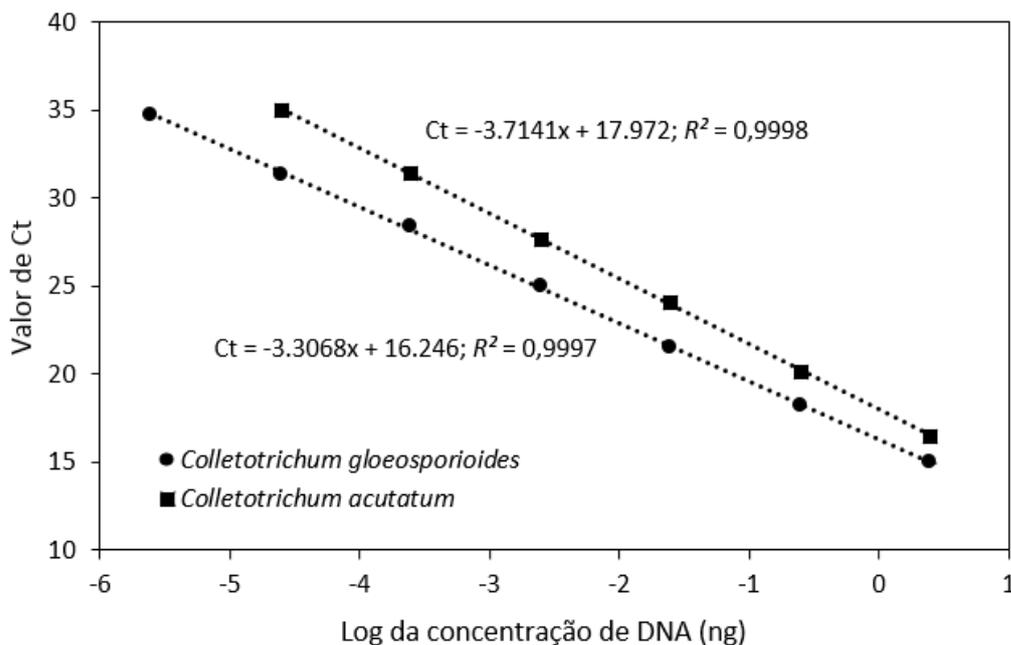


Figura 3.1 - Curva padrão para a quantificação do DNA por meio da PCR em tempo real utilizando os iniciadores e sondas específicos para detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*

Da mesma forma que para *C. acutatum*, a curva padrão para a quantificação do DNA de *C. gloeosporioides* foi obtida baseando-se em três repetições de cada diluição seriada do DNA extraído do isolado LFN-22 (*C. gloeosporioides*) e a correlação entre os valores de C_T e os valores em log das diferentes concentrações do DNA foram lineares ($y = -3.3068x + 16.246$, $R^2 = 0,999$). Isso permitiu a detecção limite de 2,5 fg de DNA do patógeno alvo (Figura 3.1). A eficiência dos iniciadores e

sondas desenvolvidas para *C. gloeosporioides* ultrapassou 98% ao longo das sete ordens de magnitude da concentração do DNA do patógeno (Figura 3.1).

As Tabelas 3.6 e 3.7 apresentam as eficiências dos iniciadores e sondas TaqMan® utilizadas para a detecção de *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides* baseada nas respostas das diferentes concentrações do DNA alvo, quando submetidas a presença ou ausência do DNA da planta.

A eficiência dos iniciadores e sondas foi superior a 99,83 e 98,7%, ao longo das concentrações do DNA extraído de cultura pura, para detecção de *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides*, respectivamente (Figuras 3.6 e 3.7). Quando na presença do DNA da planta, a eficiência dos iniciadores e sondas obtida ao longo das diferentes concentrações de DNA foi acima de 98,99 % para *C. acutatum* (Figura 3.6) e de 97,88% para *C. gloeosporioides* (Figura 3.7). A comparação dos “slopes” das equações usando ANCOVA não indicou diferença significativa ($P = 0,90$) na eficiência dos iniciadores e sondas utilizados para *C. acutatum*, bem como nenhuma diferença significativa ($P = 0,94$), na eficiência dos iniciadores e sondas utilizados para *C. gloeosporioides*, independentemente da presença ou ausência do DNA do hospedeiro.

Tabela 3.6 - Valores de Ciclo “threshold” (C_T) de diluições seriadas do DNA de *C. acutatum* provenientes de cultura pura na presença e ausência do DNA de folhas de laranjeira (*Citrus sinensis*)

Quantidade de DNA de <i>C. acutatum</i>	Valores de C_T ^a	
	Sem DNA da planta	Com DNA da planta
2,5 ng	17.21 ± 0,52	17.83 ± 0,24
250 pg	20.25 ± 0,62	20.78 ± 0,78
25,0 pg	24.55 ± 0,82	25.61 ± 0,62
2,5 pg	27.84 ± 0,46	27.63 ± 0,26
250 fg	31.62 ± 0,35	31.93 ± 0,11
Eficiência ^b (%)	99,83	98,99

^a Os valores de C_T representam os valores médios de quatro repetições

^b Eficiência foi determinada por meio da regressão linear dos valores C_T obtidos nas diferentes concentrações avaliadas

Tabela 3.7 - Valores de Ciclo “threshold” (C_T) de diluições seriadas do DNA de *C. gloeosporioides* provenientes de cultura pura na presença e ausência do DNA de folhas de laranja (*Citrus sinensis*)

Quantidade de DNA de <i>C. gloeosporioides</i>	Valores de C_T ^a	
	Sem DNA da planta	Com DNA da planta
2.5 ng	15.24 ± 0.52	15.86 ± 0.53
250 pg	18.45 ± 0.73	18.26 ± 0.24
25.0 pg	21.63 ± 0.25	21.87 ± 0.62
2.5 pg	25.63 ± 0.27	25.22 ± 0.73
250 fg	28.44 ± 0.14	28.83 ± 0.15
Eficiência ^b (%)	98.7	97.88

^a Os valores de C_T representam os valores médios de quatro repetições

^b Eficiência foi determinada por meio da regressão linear dos valores de C_T obtidos nas diferentes concentrações avaliadas

Os valores de C_T revelaram a especificidade e a alta sensibilidade dos iniciadores e sondas utilizados nos ensaios conduzidos com a qPCR e qPCR multiplex para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (Tabela 3.8).

Amostras contendo o DNA individual de *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides* e amostras contendo a mistura do DNA de ambos os patógenos foram submetidas a qPCR, conduzidas com os iniciadores e sondas desenvolvidos para a detecção de *C. acutatum*. Foi observada amplificação do DNA de *C. acutatum* tanto nas amostras que continham a mistura do DNA de ambos os patógenos quanto naquelas amostras que continham o DNA individual de *C. acutatum*. Não foi obtida amplificação das amostras que continham somente o DNA de *C. gloeosporioides*. As amostras de DNA de *C. acutatum* e as amostras com a mistura de DNA apresentaram valores de C_T bastante semelhantes, 28.11 e 28.82, respectivamente (Tabela 3.8).

As amostras também foram submetidas a qPCR contendo os iniciadores e sondas desenvolvidas para a detecção de *C. gloeosporioides*. Foi obtida amplificação do DNA das amostras contendo o DNA individual de *C. gloeosporioides* e naquelas amostras cujo DNA de ambos os patógenos estavam misturados. As amostras com o DNA de *C. gloeosporioides* e as amostras com a mistura de ambos os DNA dos patógenos apresentaram valores de C_T bastante semelhantes, 25.19 e 25.94, respectivamente. Não foi observado amplificação nas amostras que continham somente o DNA de *C. acutatum* (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 - Valores de Ciclo “threshold” (C_T) obtidos dos ensaios conduzidos com a qPCR ou multiplex q-PCR para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*

Amostra	Valores de C_T da qPCR ^a		Valores de C_T da qPCR multiplex ^a	
	<i>C. acutatum</i> ^c	<i>C. gloeosporioides</i> ^c	<i>C. acutatum</i> ^d	<i>C. gloeosporioides</i> ^d
<i>C. gloeosporioides</i> LFN17	> 44 ± 0 ^b	25.19 ± 0.82	> 44 ± 0	25.28 ± 0.12
<i>C. acutatum</i> LFN1	28.11 ± 0.52	> 44 ± 0	28.35 ± 0.64	> 44 ± 0
LFN1 + LFN17	28.82 ± 0.39	25.94 ± 0.48	27.89 ± 0.12	25.57 ± 0.37
Controle negativo	> 44 ± 0	> 44 ± 0	> 44 ± 0	> 44 ± 0

^a Os valores de C_T representam os valores médios de quatro repetições ± Erro padrão

^b $C_T > 44$ – Indica um resultado negativo por não ocorrer amplificação do DNA até o ciclo 44

^c Reação da qPCR utilizando os iniciadores ACUT-F1/ACUT-R2 e a sonda ACUT-PB

^d Reação da qPCR utilizando os iniciadores GLO-F1/GLO e a sonda GLO-PB

As qPCR multiplex foram conduzidos utilizando, em uma mesma reação, iniciadores e sondas desenvolvidas para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Foi constatada amplificação do DNA em todas as amostras que continham o DNA dos patógenos. As amostras contendo somente o DNA de *C. acutatum* quando submetidas a qPCR multiplex apresentaram apenas uma curva de amplificação (Figura 3.2) para a detecção de *C. acutatum*, proporcionando C_T médio de 28.35 (Tabela 3.8). Da mesma forma, as amostras contendo apenas o DNA de *C. gloeosporioides* apresentaram uma única curva de amplificação (Figura 3.2) para a detecção de *C. gloeosporioides*, proporcionando C_T médio de 25.28 (Tabela 3.8). Naquelas amostras onde foram misturados o DNA de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* foram obtidas duas curvas de amplificação (Figura 3.2) para a detecção de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, obtendo-se C_T de 25.57 e 27.89, respectivamente (Tabela 3.8). As qPCR e qPCR multiplex apresentaram a mesma sensibilidade, uma vez que ambas as técnicas apresentaram valores de C_T bastante semelhantes (Tabela 3.8).

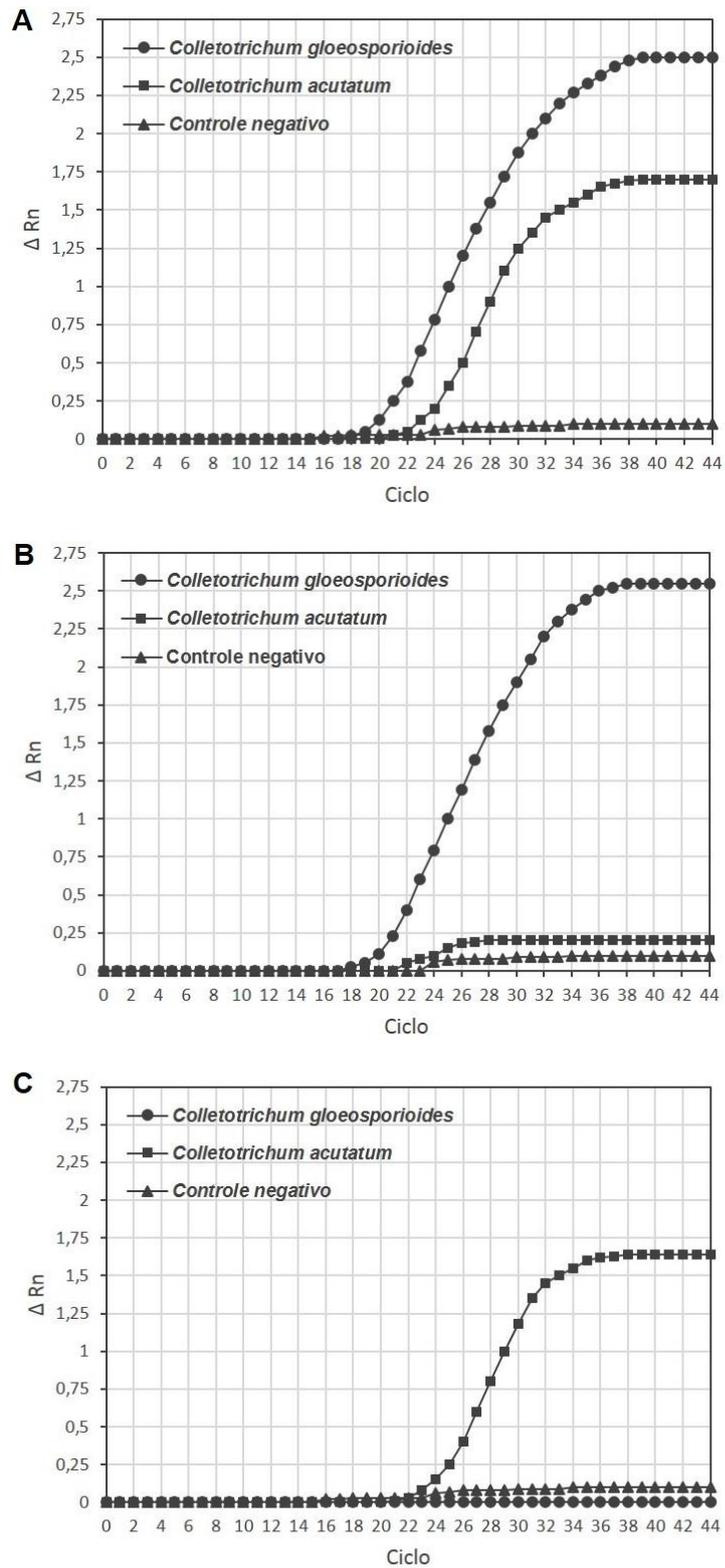


Figura 3.2 - Ilustração da amplificação da qPCR multiplex (A) e qPCR contendo os iniciadores e sondas para *C. gloeosporioides* (B) ou *C. acutatum* (C)

3.3.4 Avaliação de distintos métodos de preparo de amostras e de obtenção do DNA para a detecção e quantificação de *C. acutatum* em folhas de citros

Esse ensaio foi conduzido com a finalidade de selecionar o(s) melhor(es) método(s) de preparo de amostras e obtenção do DNA. Para isso, o DNA oriundo das estruturas do patógeno removidas das amostras pelos diferentes métodos de preparo foi obtido pela Diluição, Spot e extração do DNA (CTAB e Qiagen) e posteriormente quantificado pela qPCR.

A análise dos dados da Diluição permite verificar que o congelamento (CO) foi o método que removeu maior quantidade do patógeno na superfície das amostras, uma vez que a quantidade de DNA obtida a partir desse método foi maior quando comparado à quantidade obtida pelos outros métodos de preparo das amostras (Tabela 3.9). Diferenças significativas entre os métodos de preparo das amostras foram verificadas apenas na maior concentração do patógeno (1×10^7 conídios mL^{-1}) inoculada nas amostras. Nessa concentração o CO foi o método que melhor removeu as estruturas do patógeno da superfície foliar. A LF e a SO não diferiram entre si e apresentam eficácia intermediária para a remoção das estruturas do fungo. Por outro lado, a AG e AGT foram os métodos menos eficazes para tal remoção. O DNA obtido pela Diluição, por meio do extrato das amostras maceradas, não foi amplificado pela qPCR. A Diluição apresentou um alto coeficiente de variação (75.82%) ao comparar os distintos métodos de preparo das amostras (Tabela 3.9).

Observando-se os resultados obtidos no Spot, percebe-se que os métodos da MA e do CO, nas duas maiores concentrações de conídios inoculados nas amostras não diferiram entre si, porém diferiram dos demais tratamentos. Ambos os métodos de preparo das amostras foram os mais eficazes para remoção do patógeno na superfície ou tecido foliar. O método da LF apresentou eficácia intermediária e os métodos SO, AGT e AG foram os que removeram menor quantidade de estruturas do fitopatógeno na superfície foliar. O Spot proporcionou alto coeficiente de variação (54.89%) quando comparados aos outros métodos de preparo das amostras (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 - Detecção e quantificação do DNA de *Colletotrichum acutatum* em folhas de laranjeira 'Pêra' inoculadas artificialmente e submetidas a diferentes métodos de preparo das amostras e obtenção do DNA

Tratamento	Concentração de inóculo	Valores da concentração de DNA ^a (pg)			
		Diluição	Spot	CTAB	Qiagen
MA	10 ⁷	ND ^c	11,4 a ^b	131,1 a	137,9 a
MA	10 ⁵	ND	4,69 b	33,3 b	35,4 b
MA	10 ³	ND	1,33 c	8,77 c	8,34 c
MA	10 ¹	ND	0,36 c	0,87 d	0,61 d
CO	10 ⁷	10,4 a	10,9 a	128,8 a	136,3 a
CO	10 ⁵	1,31 cd	4,73 b	33,3 b	36,3 b
CO	10 ³	0,45 d	0,56 c	9,13 c	8,82 c
CO	10 ¹	0,26 d	0,42 c	0,61 d	0,65 d
LF	10 ⁷	3,49 b	4,72 b	32,2 b	36,7 b
LF	10 ⁵	0,64 cd	0,88 c	7,13 c	6,88 cd
LF	10 ³	0,32 d	0,65 c	1,31 d	1,71 d
LF	10 ¹	0,02 d	0,19 c	0,18 d	0,14 d
SO	10 ⁷	2,52 b	1,32 c	1,87 d	6,49 cd
SO	10 ⁵	0,44 cd	0,68 c	1,11 d	2,35 d
SO	10 ³	0,17 d	0,51 c	0,53 d	0,66 d
SO	10 ¹	ND	ND	ND	ND
AGT	10 ⁷	0,76 c	1,23 c	3,36 d	4,44 d
AGT	10 ⁵	0,34 cd	0,42 c	1,34 d	1,18 d
AGT	10 ³	ND	0,02 c	0,71 d	0,77 d
AGT	10 ¹	ND	ND	ND	ND
AG	10 ⁷	0,09 d	0,35 c	0,61 d	0,61 d
AG	10 ⁵	ND	0,04 c	0,03 d	0,06 d
AG	10 ³	ND	ND	ND	ND
AG	10 ¹	ND	ND	ND	ND
Controle	-	ND	ND	ND	ND
C.V (%) ^d	-	75,82	54,9	17,87	11,58

^a Os valores representam a média de três repetições

^b Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

^c ND- Valores não determinados pela qPCR

^d C.V- Coeficiente de variação

Os dois métodos de extração do DNA, CTAB e Kit comercial Qiagen, apresentaram resultados bastante semelhantes (Tabela 3.9). Nesses ensaios, os métodos da MA e CO não diferiram entre si e foram os mais eficazes para a remoção das estruturas de *C. acutatum* da superfície das amostras inoculadas. O método da LF removeu mais estruturas da superfície foliar do que os métodos da SO, AGT e AG. Os métodos SO, AGT e AG foram os que deslocaram menos estruturas do patógeno da superfície foliar (Tabela 3.9).

Os métodos da MA, CO e LF proporcionaram amplificação de todas as amostras analisadas, independente da concentração de inóculo utilizada na inoculação, apresentando dessa forma a mesma sensibilidade na detecção do fitopatógeno (Tabela 3.9).

3.3.5 Sensibilidade de métodos de obtenção do DNA

A Tabela 3.10 apresenta os resultados da detecção de *C. acutatum* em amostras submetidas aos três distintos métodos de obtenção do DNA. Ao compararmos os resultados da detecção entre os três métodos de obtenção do DNA, nota-se que a extração do DNA e o Spot tiveram o mesmo limite de detecção de *C. acutatum*, sendo 10 vezes mais sensíveis que o método da Diluição. Extração do DNA e Spot tiveram a detecção limite na diluição das amostras 1:10000, enquanto que o método da Diluição teve a detecção limite na diluição das amostras 1:1000. O método da Diluição não conseguiu detectar o DNA do patógeno nas menores diluições das amostras testadas (1:1 e 1:10, v:v) (Tabela 3.10), provavelmente devido alta concentração de inibidores da qPCR.

Os resultados referentes à detecção de *C. gloeosporioides* em amostras submetidas os três tratamentos para obtenção do DNA estão apresentados na Tabela 3.11. Observou-se que dentre os três métodos de obtenção do DNA, a Extração do DNA e Spot foram os mais sensíveis para detectar *C. gloeosporioides* nas amostras analisadas. Ambos os métodos foram 100 vezes mais sensíveis que o método da Diluição, apresentando detecção limite na diluição 1: 100000. No método da Diluição somente foi obtida amplificação do DNA nas amostras cujas diluições foram de 1: 100 e 1: 1000. Assim como observado nas amostras de *C. acutatum*,

nas duas menores diluições testadas (1: 1, 1: 10; v: v) não foi observada à amplificação do DNA (Tabela 11).

Tabela 3.10 - Comparação da sensibilidade entre os métodos da diluição, spot e extração do DNA (CTAB) para a detecção, pela qPCR, de *C. acutatum* em diluições seriadas preparadas a partir de extrato de folhas inoculadas com esse patógeno

Diluições	Diluição	Spot	CTAB
1: 1 ^b	> 44 ± 0 ^c	26.18 ± 1.72 ^a	24.72 ± 0.41
1: 10	> 44 ± 0	28.66 ± 1.22	26.34 ± 0.38
1: 100	31.71 ± 2.13	30.33 ± 1.16	27.51 ± 0.22
1: 1000	33.59 ± 1.97	32.84 ± 0.95	31.52 ± 0.72
1: 10000	> 44 ± 0	34.11 ± 1.44	32.76 ± 0.52
1: 100000	> 44 ± 0	> 44 ± 0	> 44 ± 0
1: 1000000	> 44 ± 0	> 44 ± 0	> 44 ± 0

^a Os valores representam a média do C_T de três repetições ± Erro padrão

^b Extratos de amostras inoculadas: Extrato de amostras sadias

^c C_T>44 - Indica um resultado negativo por não ocorrer amplificação do DNA até o ciclo 44

Tabela 3.11 - Comparação da sensibilidade entre os métodos da diluição, spot e extração do DNA (CTAB) para a detecção, pela qPCR, de *C. gloeosporioides* em diluições seriadas preparadas a partir de extrato de folhas inoculadas com esse patógeno

Diluições	Diluição	Spot	CTAB
1: 1 ^b	> 44 ± 0 ^c	25.85 ± 1.12 ^a	23.06 ± 0.33
1: 10	> 44 ± 0	27.39 ± 0.35	25.32 ± 0.64
1: 100	29.64 ± 1.86	29.40 ± 0.86	26.73 ± 0.11
1: 1000	33.81 ± 1.47	30.73 ± 1.37	28.36 ± 0.96
1: 10000	> 44 ± 0	32.03 ± 1.84	31.28 ± 0.63
1: 100000	> 44 ± 0	34.67 ± 0.67	33.56 ± 0.47
1: 1000000	> 44 ± 0	> 44 ± 0	> 44 ± 0

^a Os valores representam a média do C_T de três repetições ± Erro padrão

^b Extratos de amostras inoculadas: Extrato de amostras sadias

^c C_T>44 - Indica um resultado negativo por não ocorrer amplificação do DNA até o ciclo 44

3.3.6 Avaliação e validação de métodos para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*

A Figura 3.3 ilustra o número folhas que são verdadeiramente positivas, verdadeiramente negativas, falsas positivas e falsas negativas ao se analisarem 227 folhas de laranjeira 'Valência', por meio de diferentes métodos para a detecção de *C.*

acutatum. Das 227 folhas analisadas, 156 continham o patógeno, indicando assim uma prevalência de 68,7%.

		+	-		
+	Verdadeiro positivo		Falso positivo	Folhas inoculadas	Total de folhas analisadas
	Falso negativo	Verdadeiro negativo	Folhas sadias		
		156	71	227	

		+	-		
+	131	8	156	71	227
	-	25			
		156	71	227	

		+	-		
+	145	2	156	71	227
	-	11			
		156	71	227	

		+	-		
+	154	9	156	71	227
	-	2			
		156	71	227	

		+	-		
+	155	11	156	71	227
	-	1			
		156	71	227	

Figura 3.3 – Comparação entre Diluição-PCR em tempo real (Di-qPCR), Spot-PCR em tempo real (Sp-qPCR), CTAB-PCR em tempo real (CTAB-qPCR) e Qiagen-PCR em tempo real (Qiagen-qPCR) para a detecção *C. acutatum* em folhas de laranja 'Valencia'

Os valores da sensibilidade, especificidade, falso positivo e falso negativo obtidos pelos distintos métodos de detecção de *C. acutatum* estão apresentados na Tabela 3.12. Nota-se que os métodos CTAB-PCR em tempo real (CTAB-qPCR) e Qiagen-PCR em tempo real (Qiagen-qPCR) apresentaram alta sensibilidade, com resultados melhores que os demais métodos avaliados, detectando 99,3 e 98,7%

das amostras inoculadas com o patógeno. CTAB-qPCR e Qiagen-qPCR proporcionaram as menores porcentagens de falsos negativos, 0,7 e 0,5%, respectivamente, e alta porcentagem de falsos positivos, 12,6 e 15,4%, respectivamente. Sp-qPCR também apresentou alta sensibilidade na detecção de *C. acutatum* (92,9%). Esse método apresentou 2,8% e 7% de falsos positivos e negativos, respectivamente. A Di-qPCR foi o método menos sensível para detectar o patógeno nas amostras (83,9%). Nesse método foram obtidos 11,2% e 16% de falsos positivos e negativos, respectivamente. Sp-qPCR foi o método mais específico, identificando 97,1% das amostras não inoculadas e apresentando a baixa frequência de falsos positivos (2 em 227) (Tabela 3.12 e Figura 3.3). Os métodos Di-qPCR, CTAB-qPCR e Qiagen-qPCR apresentaram especificidade semelhante, sendo detectadas 88,7%, 84,5% e 87,3% das amostras negativas, respectivamente (Tabela 3.12).

Tabela 3.12 - Sensibilidade, especificidade, falsos positivos e falsos negativos obtidos dos diferentes métodos para detecção de *C. acutatum* em folhas de citros

Método de detecção	Sensibilidade	Especificidade	Falso positivo	Falso negativo
Di-qPCR ^a	0.839 ± 0.031 ^e	0.887 ± 0.024	0.112 ± 0.021	0.160 ± 0.243
Sp-qPCR ^b	0.929 ± 0.017	0.971 ± 0.011	0.028 ± 0.012	0.070 ± 0.007
CTAB-qPCR ^c	0.993 ± 0.005	0.845 ± 0.024	0.126 ± 0.022	0.012 ± 0.007
Qiagen-qPCR ^d	0.987 ± 0.008	0.873 ± 0.022	0.154 ± 0.024	0.006 ± 0.005

^a Di-qPCR: Diluição-PCR em tempo real

^b Sp-qPCR: Spot-PCR em tempo real

^c CTAB-qPCR: CTAB-PCR em tempo real

^d Qiagen-qPCR: Qiagen-PCR em tempo real

^e Valores de $C_T \pm$ Erro padrão

A Figura 3.4 apresenta os resultados comparativos entre as técnicas Spot-PCR multiplex em tempo real (Sp-qPCR multiplex) e a CTAB-PCR multiplex em tempo real multiplex (CTAB-qPCR multiplex) em três distintas populações de folhas analisadas, cada uma proveniente de um pomar comercial. Independente da população analisada, os resultados coincidentes variaram entre 96,91% e 98,23% para detecção de *C. acutatum* e entre 93,92% e 97,03% para detecção de *C. gloeosporioides* (Figura 3.4).

Estimativas	População 1		População 2		População 3		Total	
	CA ^c	CG ^d	CA	CG	CA	CG	CA	CG
Resultados coincidentes ^a (%)	96,91	93,92	97,55	97,03	98,23	96,69	97,71	96,98
Índice Kappa de cohen ^b	0,91 ± 0,09	0,81 ± 0,09	0,94 ± 0,06	0,95 ± 0,05	0,95 ± 0,07	0,92 ± 0,06	0,94 ± 0,04	0,93 ± 0,04

População 1			População 2			População 3			Total		
Sp-qPCR multiplex	CTAB-qPCR multiplex										
	+	-		+	-		+	-		+	-
+	61	0	+	71	1	+	135	1	+	372	3
-	4	35	-	6	22	-	3	73	-	12	203
	100			100			212			590	

Figura 3.4 - Comparações e análises de concordância entre Spot-PCR multiplex em tempo real (Sp-qPCR multiplex) e CTAB-PCR multiplex em tempo real (CTAB-qPCR multiplex) para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em três populações de amostras. ^aPorcentagem de resultados com diagnóstico coincidentes por ambas as técnicas dividido pelo número de plantas analisadas; ^bÍndice Kappa ± desvio padrão; ^cCA: *C. acutatum*; ^dCG: *C. gloeosporioides*

O índice Kappa revelou alta concordância (LANDIS; KOCH, 1977) entre as técnicas, nas três populações analisadas. Esse índice variou de 0,91 a 0,95 para a detecção de *C. acutatum* e de 0,81 a 0,95 para a detecção de *C. gloeosporioides* (Figura 3.4). Analisando os resultados conjuntos das três populações, pode-se constatar que apenas 0,5% das amostras foram positivas somente para a Sp-qPCR multiplex, tanto para a detecção de *C. acutatum* quanto para a detecção de *C. gloeosporioides*. Entretanto, 2% e 2,8% das amostras foram positivas para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, respectivamente, somente na CTAB-qPCR multiplex (Figura 3.4).

Os resultados referentes a comparação dos dois métodos de diagnose, Di-qPCR multiplex e a CTAB-qPCR multiplex, utilizados para analisar as três diferentes populações estão apresentadas na Figura 3.5.

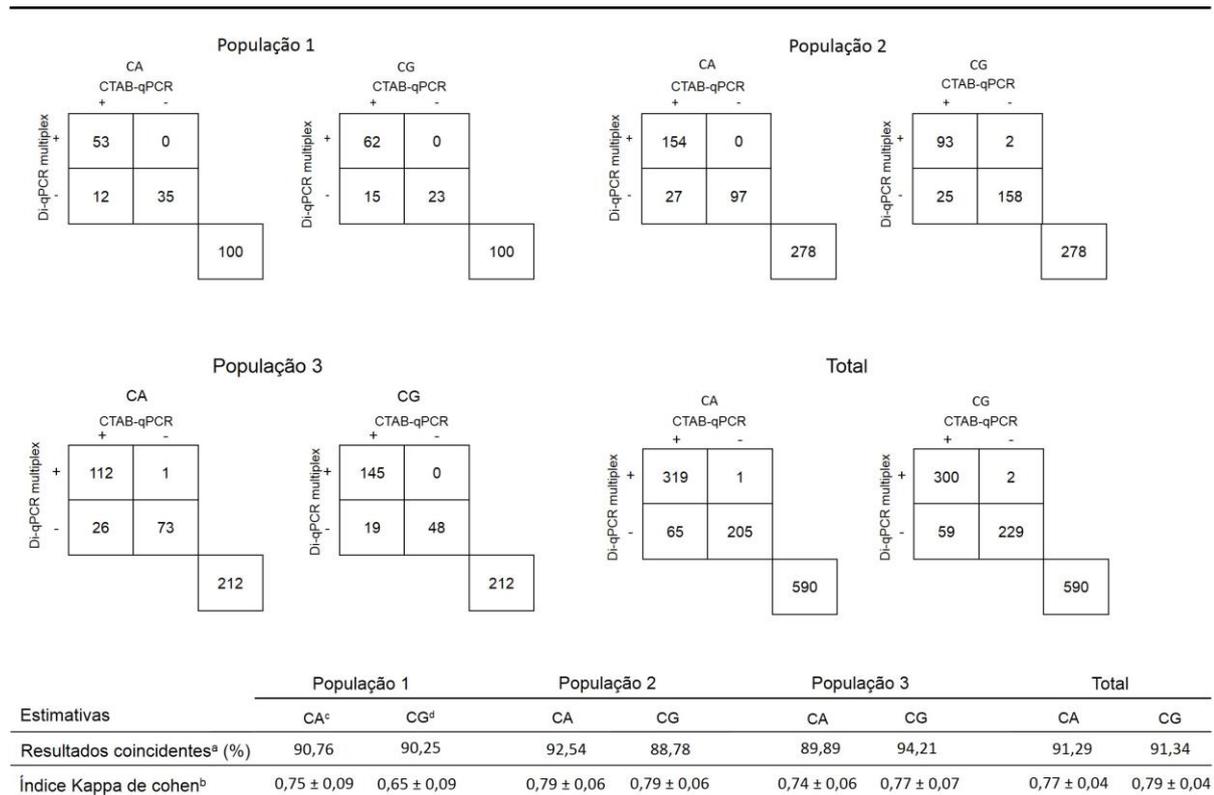


Figura 3.5 - Comparações e análises de concordância entre Diluição-PCR multiplex em tempo real (Di-qPCR multiplex) e CTAB-PCR multiplex em tempo real (CTAB-qPCR multiplex) para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em três populações de amostras. ^aPercentagem de resultados com diagnóstico coincidentes por ambas as técnicas dividido pelo número de plantas analisadas; ^bÍndice Kappa ± desvio padrão; ^cCA: *Colletotrichum acutatum*; ^dCG: *Colletotrichum gloeosporioides*

Baixa concordância foi observada entre os dois métodos de diagnóstico analisados. O índice Kappa variou entre 0,54 e 0,59 para a detecção de *C. acutatum* e de 0,54 a 0,60 para a detecção de *C. gloeosporioides* (Figura 3.5). Embora as técnicas tenham apresentado baixa concordância, também apresentaram resultados coincidentes razoáveis. Esses valores variaram de 81,76% a 83,84% e de 75,64% a 87,5% para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, respectivamente. A análise conjunta das populações revelaram que 10% e 11% das amostras foram positivas por CTAB-qPCR multiplex, mas não pela Di-qPCR multiplex, para a detecção de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, respectivamente. Por outro lado, 0,17% e 0,33 % das amostras analisadas foram positivas somente pela Di-qPCR multiplex, para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, respectivamente (Figura 3.5).

3.7 Monitoramento quantitativo de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em folhas de citros em pomares de laranja no Estado de São Paulo

A quantidade média mensal do DNA de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* presentes nas amostras provenientes de pomares localizados na região de Barretos ou Santa Cruz do Rio Pardo é mostrada nas Figuras 3.6, 3.7, 3.8 e 3.9.

Os resultados plotados na Figura 3.6 ilustram a quantidade média de DNA de *C. acutatum* obtida nas amostras oriundas da área experimental localizada na região de Barretos e a precipitação registrada nessa mesma área entre julho de 2012 e julho de 2013. A princípio, constata-se variação considerável nas quantidades de DNA obtidas nas amostras analisadas no decorrer do período de avaliação, tanto para as amostras coletadas no interior quanto na periferia da copa das plantas. Percebe-se que a quantidade de DNA de *C. acutatum* presentes nas amostras foi menor entre julho e novembro de 2012, seguido de aumento entre dezembro de 2012 e março de 2013 e um declínio a partir de abril de 2013. Diferença significativa na quantidade de DNA das amostras oriundas no interior e periferia da copa foram observadas entre julho e novembro de 2012 e de abril a julho de 2013 ($P < 0.05$). Houve expressiva variação de precipitação mensal no período de avaliação do ensaio, de modo que foram registrados baixos volumes de chuvas de julho a novembro de 2012 e entre abril e julho de 2013 (Figura 3.6). Também foram registradas diferenças na temperatura e na quantidade de dias com chuvas (DCCH) no período de avaliação dos ensaio. A temperatura média mensal variou de 18.4 °C a 26.3 °C durante a condução do ensaio, sendo constatadas temperaturas mais amenas de julho a setembro de 2012 e de abril a julho de 2013, com temperaturas mais elevadas entre outubro de 2012 e maio de 2013 (Figura 3.10).

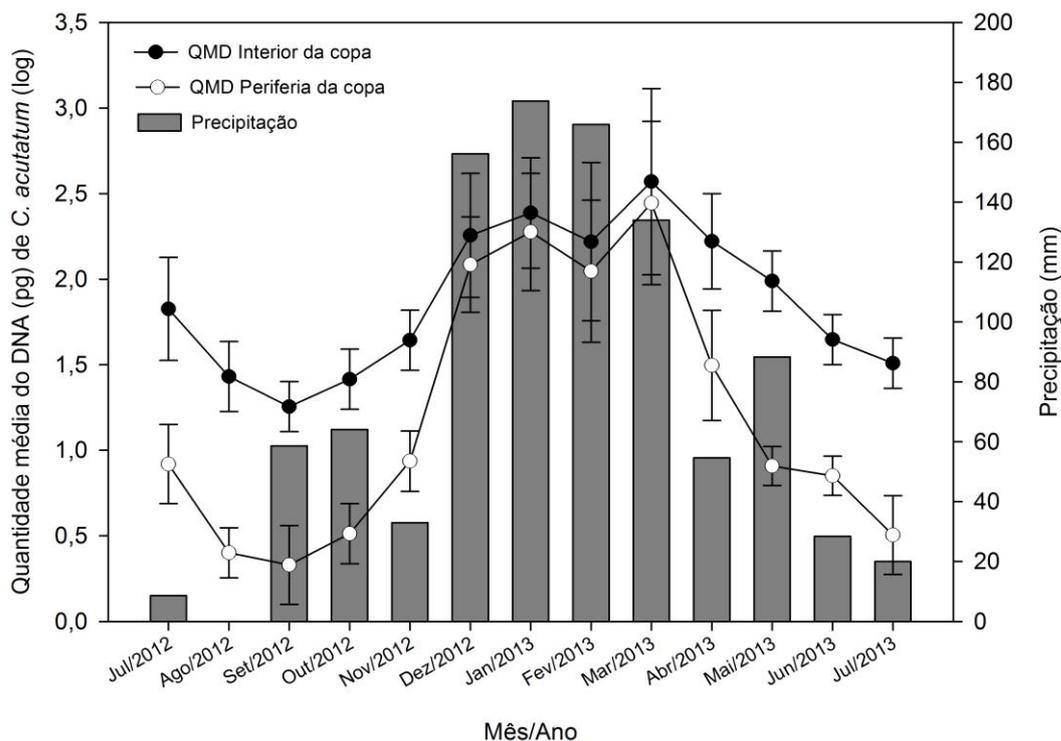


Figura 3.6 - Quantidade média do DNA (QMD) de *Colletotrichum acutatum* presentes em folhas de laranjeira 'Valencia', localizadas no interior e periferia da copa, e precipitação média mensal registradas na área experimental de Barretos-SP entre julho de 2012 e julho de 2013

A Figura 3.7 mostra os resultados para a quantidade média do DNA de *C. gloeosporioides* obtido por meio das análises mensais das amostras coletadas no interior e na periferia da copa de laranjeira "Pêra e a precipitação média mensal entre julho de 2012 e julho de 2013, no ensaio conduzido na região de Barretos. Observou-se uma considerável variação na quantidade do DNA de *C. gloeosporioides* oriundo das amostras analisadas entre esse período de avaliação. A quantidade de DNA de *C. gloeosporioides* presente nas amostras, tanto no interior quanto na periferia da planta, foi menor de julho a novembro de 2012 e de abril a julho de 2013, quando comparadas a elevada quantidade de DNA do patógeno presente nas amostras entre dezembro de 2012 e março de 2013. Ao analisarmos os resultados em distintos períodos notou-se diferença significativa ($P < 0.05$), de julho a novembro de 2012 e abril a julho de 2013 entre as amostras coletadas no interior e na periferia da copa da planta. Não foi observada diferença significativa ($P = 0.086$) entre a quantidade de DNA do patógeno nas amostras coletadas no interior e na periferia da planta de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013 (Figura 3.7). A

variação pluviométrica apresentada na Figura 3.10 é a mesma ilustrada na Figura 3.6 e já discutida anteriormente.

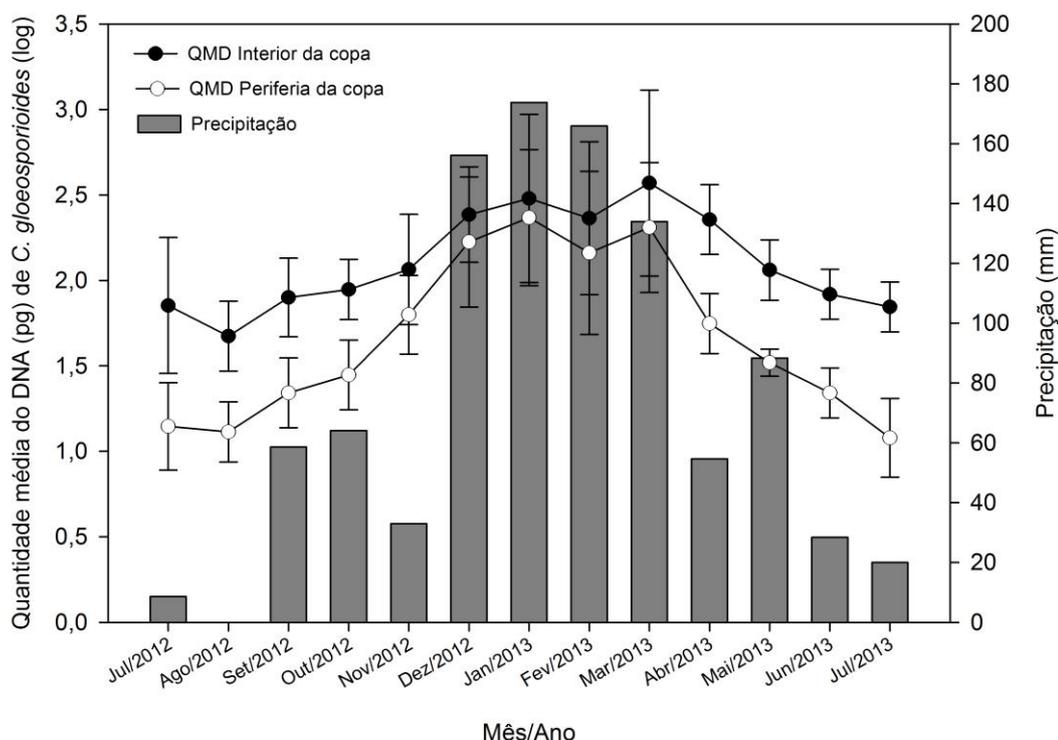


Figura 3.7 - Quantidade média do DNA (QMD) de *Colletotrichum gloeosporioides* presentes em folhas de laranjeira 'Valencia', localizadas no interior e periferia da copa, e precipitação média mensal registradas na área experimental de Barretos-SP entre julho de 2012 e julho de 2013

A quantidade média do DNA de *C. acutatum* presente nas amostras analisadas e a precipitação mensal registrada entre julho de 2012 e julho de 2013 na área experimental de Santa Cruz do Rio Pardo são apresentadas na Figura 3.8.

Verificou-se que ocorreu variação na quantidade do DNA de *C. acutatum* entre os meses avaliados. A quantidade de DNA do patógeno presente nas amostras coletadas de julho a novembro de 2012 foi consideravelmente menor que as amostras coletadas de dezembro de 2012 a julho de 2013. Foi observada diferença significativa ($P < 0.05$) entre a quantidade de DNA do patógeno nas amostras coletadas no interior e na periferia da copa da planta de julho a novembro de 2012. A precipitação mensal variou consideravelmente durante o período do ensaio conduzido (Figura 3.8). Observou-se baixo volume de chuvas entre julho e novembro de 2012 e abril e julho de 2013, sendo registrados índices pluviométricos abaixo de 90 mm. Volume de chuva mediano foi registrado em maio e junho de 2013

e alto índice pluviométrico entre dezembro de 2012 e março de 2013. A temperatura média mensal variou de 16.8 °C a 25.5 °C entre o período de avaliação do experimento. Em relação a quantidade de dias com chuvas (DCCH) foi constatada frequência acima de 10 dias em julho de 2012 e entre dezembro de 2012 e julho de 2013 (Figura 3.10).

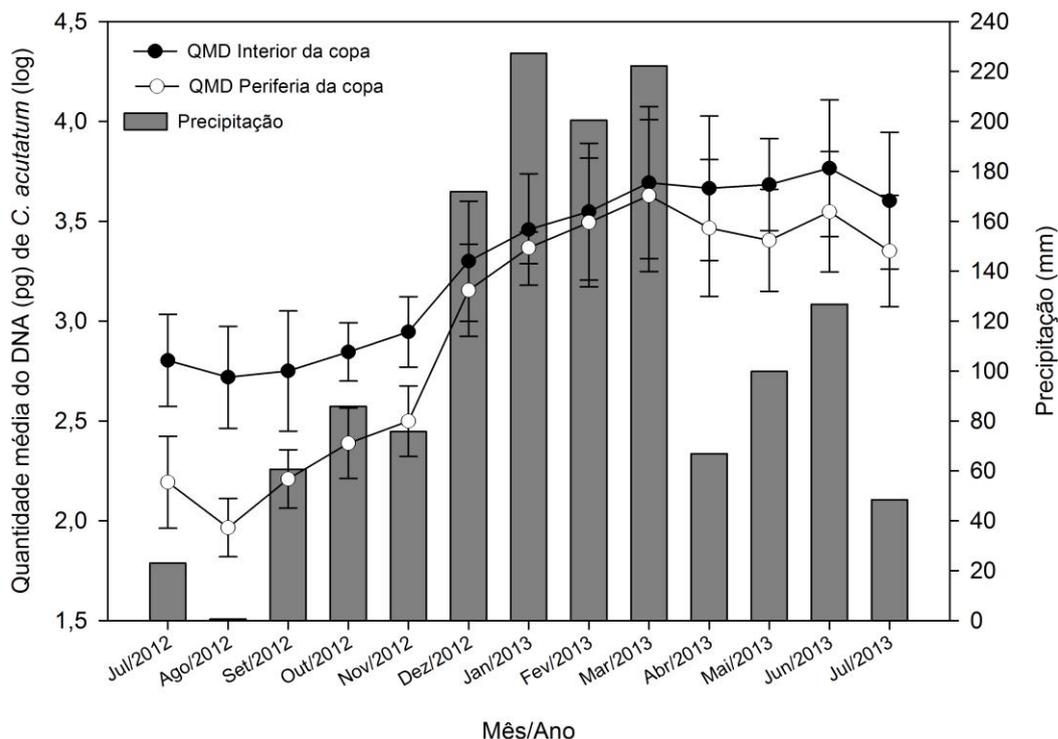


Figura 3.8 - Quantidade média do DNA (QMD) de *Colletotrichum acutatum* presentes em folhas de laranja 'Valencia', localizadas no interior e periferia da copa, e precipitação média mensal registradas na área experimental de Santa Cruz do Rio Pardo-SP entre julho de 2012 e julho de 2013

Na figura 3.9 encontram-se plotados os resultados referentes a quantidade média do DNA de *C. gloeosporioides* presente nas amostras analisadas e a precipitação mensal, registradas entre julho de 2012 e julho de 2013, na área experimental de Santa Cruz do Rio Pardo. Observa-se que a quantidade do DNA de *C. gloeosporioides* presente nas amostras variou consideravelmente entre os meses avaliados.

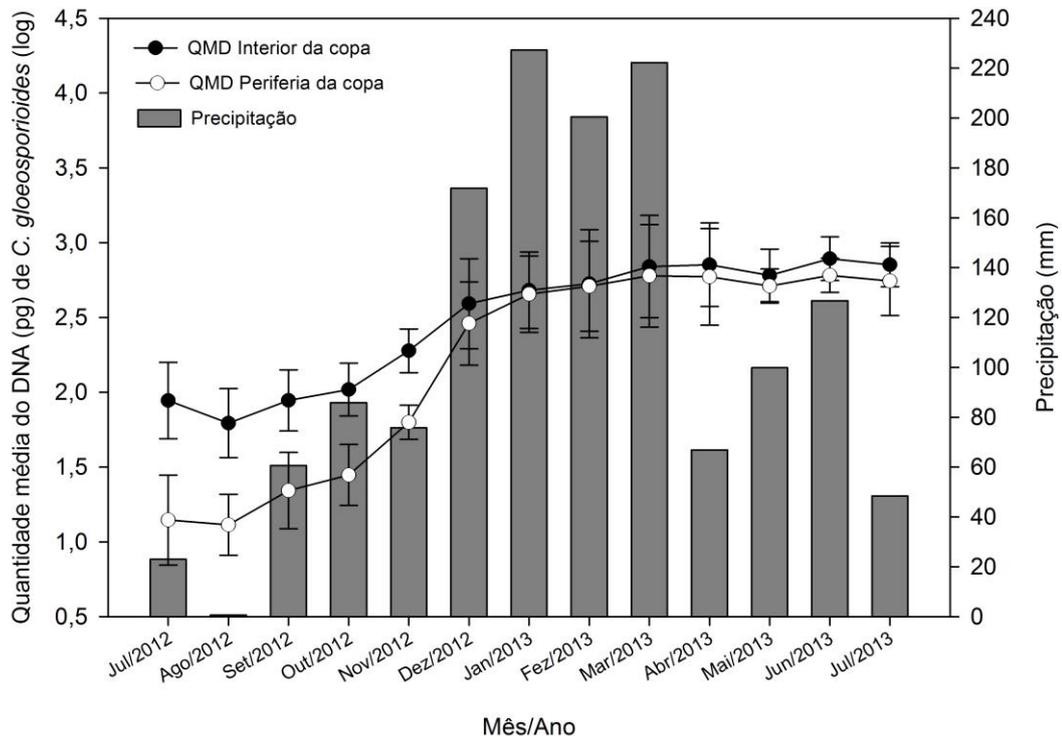


Figura 3.9 - Quantidade média do DNA (QMD) de *Colletotrichum gloeosporioides* presentes em folhas de laranja 'Valencia', localizadas no interior e periferia da copa, e precipitação média mensal registradas na área experimental de Santa Cruz do Rio Pardo-SP entre julho de 2012 e julho de 2013

Nota-se menor quantidade do DNA do patógeno de julho a novembro de 2012 tanto nas amostras coletadas no interior quanto na periferia da copa da planta. Quantidade superior do DNA do patógeno foi constada nas amostras coletadas de dezembro de 2012 a julho de 2013. Somente foi possível constatar diferença significativa ($P < 0.05$) entre a quantidade de DNA obtida de amostras coletadas no interior e na periferia da copa da planta no período de julho a novembro de 2012 (Figura 3.9).

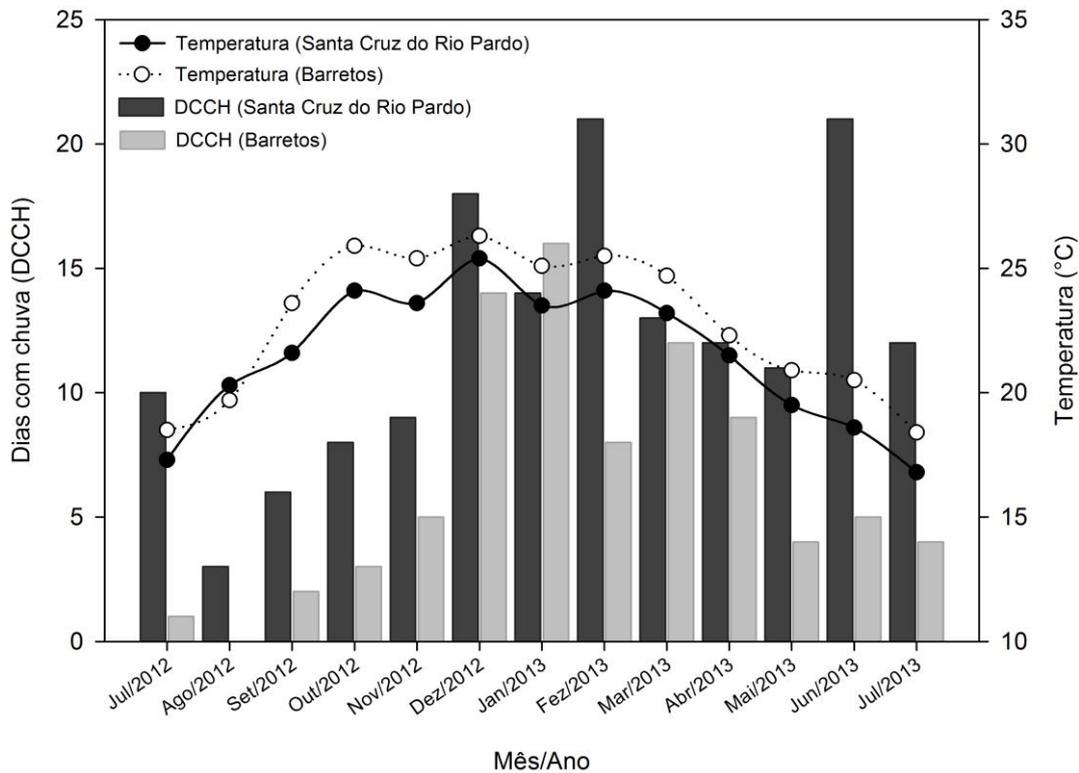


Figura 3.10 - Precipitação média mensal e temperatura média mensal, registradas entre os meses de julho de 2012 e julho de 2013, nas áreas localizadas em Barretos e Santa Cruz do Rio Pardo, ambas localizadas no Estado de São Paulo

3.4 Discussão

Para melhor compreensão da dinâmica populacional e a presença assintomática de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em folhas de citros, métodos de detecção quantitativos, sensíveis e específicos são necessários para detectar e quantificar os patógenos diretamente em materiais vegetais.

Na busca desses métodos, iniciadores e sondas TaqMan® tiveram sua sensibilidade e especificidade avaliadas.

A especificidade foi determinada pela avaliação de 16 isolados de *C. acutatum* e 9 isolados de *C. gloeosporioides*, além de outras espécies de *Colletotrichum* e outros fungos frequentemente associadas as plantas cítricas. Os isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* utilizados no ensaio foram provenientes de diferentes regiões produtoras de cítricos. Segundo Tooley et al. (2006), a utilização de isolados provenientes de distintas regiões, confere maior segurança aos resultados referentes à especificidade dos iniciadores e sondas

(TOOLEY et al., 2006). Nesse sentido, o presente trabalho constatou que independente da origem dos isolados, os iniciadores e sondas foram capazes de detectar somente os isolados de *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides*. Essa constatação demonstra que os iniciadores e as sondas utilizadas na qPCR foram altamente específicos à detecção dos agentes causais da PFC.

A PCR em tempo real, específica para a detecção de *C. acutatum*, mostrou ser 1000 e 10000 vezes mais sensível que a Nested-PCR e PCR convencional, respectivamente. Por outro lado, a qPCR específica para a detecção de *C. gloeosporioides* foi 100 e 1000 vezes mais sensível que a Nested-PCR e PCR convencional, respectivamente. Embora sejam notadas essas diferenças entre a sensibilidade das técnicas, ambas as qPCR apresentam a mesma sensibilidade por proporcionarem a detecção dos patógenos até a concentração de 1×10^2 conídios mL^{-1} . Considerando que para a extração do DNA foram utilizados 100 μL de cada suspensão de conídios analisadas, pode-se estimar que a detecção limite de ambas as qPCR desenvolvidas para a detecção de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* foi de 10 esporos. A diferença de sensibilidade entre essas técnicas está muito bem relatada por inúmeros trabalhos (CULLEN, et al., 2001; LEES, et al. 2002; EDWARDS, et al. 2007; VAN GENT-PELZER, et al., 2007; GARRIDO et al, 2009). Garrido et al. (2009), avaliaram distintas técnicas para a detecção de *C. acutatum* em folhas de morangueiro utilizando os mesmos iniciadores e sondas empregados nesse trabalho. Os autores constataram que a qPCR desenvolvida por eles foi 100 vezes mais sensível que a PCR convencional para a detecção do fitopatógeno. No presente estudo, a sensibilidade para a detecção do fitopatógeno foi maior que a encontrada no trabalho de Garrido et al. (2009). Esse fato corrobora a ideia de que a qPCR desenvolvida foi altamente sensível para a detecção de *C. acutatum*.

As qPCR desenvolvidas foram altamente sensíveis, com os limites de detecção tão baixo quanto a 25 fg de DNA de *C. acutatum*, 2.5 fg de DNA de *C. gloeosporioides* e 10 esporos de cada espécie. Esses limiares de detecção são menores que 25 conídios ou 50 fg de DNA de *C. acutatum* encontrados no trabalho de Debode et al. (2009) para detecção desse patógeno em folhas de morangueiro e 6.2 pg de DNA de *C. coccodes* descritos no trabalho de Cullen et al. (2002), para detecção do patógeno em tubérculos de batata e semelhante aos 20 fg de DNA de *C. acutatum* relatados no trabalho de Samuelian et al. (2011) para a detecção do patógeno em uvas. Vários trabalhos, conduzidos para a detecção de outras espécies

fúngicas, também corroboram com os resultados de sensibilidade obtidos nesse trabalho (GAO et al., 2004; HAYDE et al., 2004; ATALLAH; STEVENSON, 2006; TOOLEY et al., 2006; NICOLAISEN et al., 2009; SAMUELIAN, et al., 2011).

Muitos constituintes presentes no tecido foliar de plantas podem agir inibindo a amplificação da PCR (THEMIS; MICHAILIDES, 2007; SCHARADER et al., 2012). Esses inibidores geralmente exercem seus efeitos por meio da interação direta com o DNA ou pela interferência da DNA polimerase, bloqueando a sua atividade. Para determinar o efeito inibitório das substâncias presentes numa preparação de ácido nucleico, tem sido sugerido o uso de controle na PCR. Isto é especialmente necessário para excluir os resultados falso negativos, que podem levar à inibição total da PCR, mesmo na presença da sequência alvo (TOOLEY et al., 2006). Considerando esses aspectos, esse trabalho buscou avaliar a influência do DNA da planta na amplificação do DNA dos patógenos alvos em reações de qPCR. Os resultados dessas análises demonstraram que a presença do DNA da planta não alterou a sensibilidade da qPCR para detecção dos patógenos em estudo. Os reagentes da extração com o clorofórmio e polivinilpirrolidona (PVP) podem ter eliminado grande parte dos inibidores (SCHRADE et al, 2012; DEMEKE; JEKINS, 2010). Mumford et al., (2000) ressalta em seu trabalho que a PCR em tempo real é geralmente menos influenciada por inibidores.

Embora a PCR multiplex em tempo real seja um método promissor para a detecção e quantificação de fitopatógenos, por apresentar inúmeras vantagens em relação às demais técnicas moleculares, muitos fatores devem ser levados em consideração para o estabelecimento de um método eficiente e de alta reprodutibilidade (KLEIN et al., 2000; MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2002; TOOLOY et al., 2006; ATALLAH et al., 2007; ELNIFRO et al., 2009; SMITH; OSBORN, 2009). Os diferentes iniciadores e sondas, numa mesma reação, não devem interagir entre si e os amplicons devem compartilhar os reagentes disponíveis, tais como iniciadores, DNA polimerase e nucleotídeos, sem que ocorra redução na eficiência da reação. As concentrações de iniciadores devem ser otimizadas para permitir amplificação de vários alvos na mesma reação. Também requer cuidadosa escolha dos corantes fluorescentes e “quencher” correspondentes para que não ocorra sobreposição espectral entre os fluoróforos das sondas marcadas (WITTWER et al., 2001; MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2002). Neste trabalho todos os fatores acima mencionados foram levados em consideração

para iniciar o desenvolvimento da PCR multiplex em tempo real. As sondas foram marcadas com o fluoróforo FAM ou VIC, por apresentarem diferentes comprimentos espectrais, evitando a sobreposição entre eles. Os iniciadores, sondas e os reagentes para a condução da qPCR multiplex foram ajustados para condução dos ensaios. Foi observado que tanto as amostras analisadas pela qPCR quanto as amostras analisadas pela qPCR multiplex apresentaram valores de C_T bastante semelhantes e sem diferenças significativas entre elas, demonstrando que a qPCR multiplex foi bem ajustada para a detecção e quantificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*.

Métodos de preparo das amostras e de obtenção do DNA foram avaliados para detectar e quantificar *C. acutatum* em folhas de citros. A maceração do tecido foliar e o congelamento foram os métodos de preparo das amostras que melhor permitiram a remoção de *C. acutatum* na superfície foliar. Tradicionalmente, a quantificação dos microrganismos no tecido vegetal tem sido feita a partir do DNA de extratos produzidos pela maceração das amostras (ATALLAH, et al, 2007). A maceração proporciona a quantificação do patógeno tanto no interior do tecido quanto na superfície foliar. Por outro lado, o congelamento quantifica somente os microrganismos na superfície foliar. Esse método tem como princípio a remoção total dos microrganismos aderidos à superfície foliar por meio da remoção da camada de cera dessa superfície (HEUSER; ZIMMER, 2002). Este procedimento de remoção da camada de cera da superfície foliar foi descrita pela primeira vez por Ensikat et al. (2000), melhorada por Jetter, Schäffer e Riederer (2000) e adaptada por Heuser e Zimmer (2002). Heuser e Zimmer (2002) utilizaram esse método para a remoção e identificação de fungos fitopatogênicos associadas à superfície de folhas de árvores de carvalho e constataram que esse procedimento permitiu remover, identificar e quantificar todas as estruturas fúngicas aderidas à superfície foliar. Essas observações obtidas por Heuser e Zimmer (2002) corroboram os resultados obtidos nesse trabalho. Como o método da maceração não diferiu do método do congelamento, tudo indica que o último método removeu todas as estruturas de *C. acutatum* da superfície da folha. Waculicz-Andrade (2009) estudando a variabilidade genética de fungos endofíticos em folhas de laranjeira 'Valencia', oriundas de pomares com relatos da PFC, constatou que *C. gloeosporioides* era um endófito muito frequente nas folhas cítricas. Dessa forma, outra vantagem do método do congelamento é que ele desloca apenas as estruturas do patógeno aderidas à

superfície foliar, não sendo capaz de remover os endófitos da folha. Diante dessas informações e, sabendo que os endófitos poderiam interferir nos resultados deste trabalho, o método do Congelamento foi o adotado para o processamento das amostras nos ensaios de monitoramento do patógeno no campo. O método da lavagem foliar apresentou resultados intermediários na remoção do patógeno na superfície foliar, não sendo portanto, um método eficiente para ser utilizado na quantificação do patógeno. A literatura especializada aponta outros métodos, tais como a sonicação, agitação com Tween 20 e agitação, como eficazes para o deslocamento das estruturas fúngicas na superfície foliar (PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2008). Contudo, no presente trabalho, devido à baixa capacidade de quantificação de *C. acutatum* na superfície das folhas, esses métodos não se revelaram eficazes.

No que diz respeito aos métodos para a obtenção de DNA, verifica-se que os tradicionalmente utilizados, como CTAB e Qiagen, foram os que propiciaram melhor quantificação do DNA do patógeno. Isso por apresentarem menor variação entre os resultados (C.V = 11,58), garantindo assim maior reprodutibilidade dos ensaios. Por outro lado, os métodos Spot e Diluição, além de proporcionarem menor quantidade de DNA, apresentaram alta variabilidade entre os resultados, demonstrando que não são eficazes quando se deseja quantificar *C. acutatum* na superfície foliar. De fato, o Spot não foi eficaz para quantificação do DNA; no entanto, sua sensibilidade de detecção foi semelhante aos métodos CTAB e Qiagen, indicando que esses métodos têm a mesma eficácia para detecção do patógeno. Os resultados obtidos nos ensaios com diluições seriadas do extrato vegetal a partir de folhas inoculadas com o patógeno indicaram que a extração de DNA (CTAB) e Spot apresentaram alta sensibilidade de detecção, sendo que ambos foram capazes de detectar *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides* numa diluição de até 10000 e 100000 vezes, respectivamente.

Os métodos da Diluição, Spot e extração do DNA (CTAB e/ou Qiagen) foram avaliados para validar o melhor método de detecção das amostras contendo *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Para isso diferentes parâmetros foram determinados, tais como: sensibilidade, especificidade, falsos positivos, falsos negativos, coincidência e índice Kappa. Baseados nos resultados desses parâmetros foi observado que a Di-qPCR foi o método que apresentou menor sensibilidade, especificidade e o maior número de falsos negativos, sendo, portanto, ineficaz para

a detecção dos patógenos. O Sp-qPCR apresentou sensibilidade semelhante aos métodos CTAB-qPCR e Qiagen-qPCR, além de apresentar maior especificidade e menor percentagem de falsos negativos. O índice Kappa compara duas técnicas entre si e revela o quanto uma técnica é similar da outra. Considerando isso, e sabendo que a extração do DNA é a técnica usualmente estabelecida para a detecção de fitopatógenos, esse método (CTAB-qPCR) foi comparado com a Di-qPCR e Sp-qPCR. Alta similaridade (índice kappa acima de 0,81) foi observada entre a DNA-qPCR e Spot-qPCR e elevada percentagem (acima de 90,78%) dos resultados coincidentes foi observada. Segundo Landis e Koch (1977), índice Kappa acima de 0,80 indica que uma técnica é altamente similar a outra, de modo que ambas podem ser usadas para obtenção de resultados semelhantes. Os principais laboratórios preconizam a utilização de dois diferentes métodos para considerar se uma amostra está infectada (CAPOTE et al, 2009; GARRIDO, et al., 2009). Métodos micológicos tradicionais (isolamento do patógeno em meio de cultura e identificação por meio de suas estruturas fúngicas) e métodos moleculares (PCR convencional) são os rotineiramente utilizados para a diagnose do fitopatógeno. No entanto, esses métodos são laboriosos, demorados e menos sensíveis que a DNA-qPCR e Sp-qPCR. Sp-qPCR pode representar um método alternativo à PCR convencional para fins de diagnose, por ser um método pouco laborioso, rápido e de elevada sensibilidade para detecção dos fitopatógenos. A principal vantagem deste método é que as amostras podem ser imobilizadas em papel Whatman 3 MM ou membrana de nylon carregada positivamente. Além disso, essas amostras podem ser armazenadas antes do processamento, à temperatura ambiente ou à temperatura de -20 °C por 2 anos sem perda de sensibilidade (CAPOTE et al, 2009). Isso permite o envio de materiais a serem testado para outros laboratórios e o armazenamento das amostras por longos períodos de tempo.

A área de Barretos apresentou, durante a condução do ensaio, precipitação média mensal variando de 0 a 64 mm entre julho e novembro de 2012 e de 20 a 88 mm entre abril e julho de 2013. Entre dezembro de 2012 e março de 2013, a precipitação média mensal variou entre 134 e 173,8 mm, ficando evidente que as chuvas estão concentradas em alguns meses do verão. Na área de Santa Cruz do Rio Pardo, a precipitação média mensal variou de 0,6 a 85,8 mm entre julho e novembro de 2012 e de 48,4 a 227 mm entre dezembro de 2012 e julho de 2013. O volume de chuva na área de Santa Cruz do Rio Pardo foi consideravelmente maior

que à área de Barretos. Maio e junho de 2013, por apresentarem precipitação acima de 100 mm, foram considerados meses atípicos, com chuvas acima do previsto para esse período (ROLIM et al, 2007).

Na área de Barretos, verificou-se, entre julho 2012 e julho de 2013, que a quantidade de inóculo de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* foi semelhante. Diferentemente, na área de Santa Cruz do Rio Pardo, a quantidade de inóculo de *C. acutatum* foi significativamente superior ($P < 0.05$), sendo em média seis vezes maior que a quantidade de *C. gloeosporioides*, demonstrando a prevalência de *C. acutatum* nessa região. A quantidade de inóculo de *C. gloeosporioides* presente nas folhas das plantas foi semelhante nas duas áreas; entretanto, a quantidade de *C. acutatum* nas folhas das plantas localizadas na área de Santa Cruz do Rio Pardo foi em média 70 vezes superior à quantidade do mesmo patógeno na área de Barretos.

Em ambas as áreas observou-se que a quantidade de inóculo foi influenciada pela precipitação e pelo número de DCCH. Na área de Barretos, quando houve aumento da precipitação e do número de dias com chuvas ocorreu, também, aumento significativo na quantidade de DNA dos patógenos nas amostras analisadas. Essa constatação pode ser comprovada observando isoladamente os meses de fevereiro e março de 2013. Em fevereiro de 2013 a precipitação média foi de 166 mm, considerada alta para essa região; no entanto, houve ligeira queda na quantidade de inóculo dos patógenos nas folhas. Nesse mesmo mês houve queda significativa no número de DCCH (8 dias), bem inferior ao mês anterior (18 dias). Em março ocorreu diminuição da precipitação e aumento no número de DCCH, quando comparados ao mês anterior; no entanto, houve um incremento na quantidade de inóculo dos patógenos. Fato semelhante foi observado na área de Santa Cruz do Rio Pardo, onde a quantidade de inóculo aumentou em função do aumento da precipitação e, principalmente, pelo aumento da quantidade DCCH. Maio e junho de 2013 foram considerados meses atípicos nessa região por apresentar alto volume de chuva. Nesses meses, em razão da regularidade de chuvas, foi notada alta quantidade de inóculo nessa área. A associação do alto índice pluviométrico com a ocorrência da PFC foi bem relatada por alguns autores (DENHAM; WALLER, 1981; AGOSTINI; GOTTWALD; TIMMER 1993; SILVA-JÚNIOR, 2011). Silva-Júnior (2011), trabalhando com a PFC nas regiões de Taquarituba-SP e Santa Cruz do Rio Pardo-SP, observou que as epidemias ocorridas entre 2008 e 2011 eram devidas a ocorrência das chuvas associadas ao aumento do período de molhamento foliar. O

mesmo autor verificou que quanto maior o número de dias com chuvas, maior a incidência da PFC no final do florescimento. Os resultados apresentados aqui corroboram essa afirmação, uma vez que a associação entre alto índice pluviométrico e maior número de DCCH acarretou aumento significativo na quantidade de inóculo presente na superfície foliar. De maneira semelhante, Agostini, Gottwald e Timmer (1993) relataram que as epidemias de PFC estão associadas à alta pluviosidade durante o florescimento. Vale ressaltar que somente o alto volume de chuvas não garante o aumento do inóculo na superfície foliar. Denham e Waller (1981), relataram aumento da doença quando o período de molhamento foliar era prolongado com pelo menos dois dias de chuvas seguidos.

Em relação a quantidade de inóculo no interior e na periferia da planta, ambas as áreas apresentaram resultados semelhantes. Na região de Barretos, nos períodos de julho a novembro de 2012 e abril a julho de 2013, a quantidade de inóculo no interior da copa foi significativamente superior ($P < 0,05$) que na periferia. Da mesma forma, na área de Santa Cruz do Rio Pardo, de julho a novembro de 2012 a quantidade de inóculo no interior da copa foi significativamente maior ($P < 0,05$) que na periferia da planta. Nota-se que essa diferença só é obtida nos meses onde ocorre menor volume de chuvas e poucos DCCH. Os patógenos alojados nas folhas da periferia da copa, por estarem expostos a altas temperaturas, intensa radiação solar e baixa umidade, podem permanecer viáveis por um curto período de tempo (ARNOLD; HERRE, 2003; HENSHAL et al., 2005; SANTOS, et al. 2008). Por outro lado, o inóculo presente nas folhas no interior da copa, por estarem protegidos desses fatores podem sobreviver mais tempo nesse ambiente. Esse fato ajuda a explicar a maior quantidade do inóculo no interior da copa da planta. Por outro lado, em épocas de alta pluviosidade, o patógeno encontra-se distribuído tanto na periferia quanto no interior da copa da planta, não sendo notadas diferenças entre a quantidade de inóculo dos patógenos. Esse fato pode ser explicado pela maneira de dispersão do patógeno. Agostini, Gottwald e Timmer (1993), observaram que respingos de água da chuva parece ser importante fator da dispersão localizada do patógeno. Da mesma forma, Denham e Waller (1981) relataram que a disseminação de *C. acutatum* em citros, a curtas distâncias, ocorre principalmente por meio da associação de chuvas e ventos. Nesse trabalho, notou-se que não ocorreu diferença entre a quantidade de inóculo presente no interior e periferia da planta em épocas de alta pluviosidade. Dessa forma, é possível, que nas épocas com alto índice

pluviométrico, o patógeno tenha sido disperso na planta e, o por isso, mesmo encontrou-se distribuído uniformemente tanto no interior quanto na periferia da planta.

Não foi observada nenhuma relação direta entre a temperatura e o aumento de inóculo na superfície foliar. Feichtenberger et al. (2005), relataram que a temperatura não tem um efeito direto sobre o desenvolvimento da PFC. A temperatura pode ter um indireto, influenciando a duração do período de florescimento das plantas cítricas.

3.5 Conclusões

A qPCR e qPCR multiplex desenvolvidas neste trabalho representam métodos eficientes e altamente sensíveis para a detecção e quantificação de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* em folhas de laranjeira.

A técnica do spot foi validada como método alternativo para a detecção dos agentes causais da podridão floral dos citros.

O método de preparo de amostras pelo congelamento é eficaz para a remoção de estruturas dos agentes causais da podridão floral dos citros da superfície foliar.

Chuvas regulares contribuem para o aumento do inoculados agentes causais da podridão floral dos citros sobre folhas de laranjeira.

Os patógenos sobrevivem dispersos por toda a copa da planta em épocas de alta precipitação e no das mesmas em períodos com baixa volume de chuvas.

Referências

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 4, p. 420-425, 1994.

AGOSTINI, J.P.; GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 485-490, 1993.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 11, p.1377-1382, 1992.

ARNOLD, A.E; HERRE, E.A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, Corvallis, v. 95, n. 3, p. 388–398, 2003.

ATALLAH, Z.K.; STEVENSON, W.R. A Methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using real-time quantitative polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 9, p. 1037-1045, 2006.

ATALLAH, Z.K.; BAE, J.; JANSKY, S.H.; ROUSE, D.I.; STEVENSON, W.R. Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to *Verticillium* Wilt. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 7, p. 865-872, 2007.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 5, p. 523-527, 1996.

CAPOTE, N.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; VIDAL, E.; MARTÍNEZ, M.C.; CAMBRA, M. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. **International Microbiology**, Berlin, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2009.

CULLEN, D.W.; LEES, A.K.; TOTH, I.K.; DUNCAN, J.M. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 387-398, 2001.

_____. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. **Plant Pathology**, London, v. 51, p. 281-292, 2002.

DEBODE, J.; VAN HEMELRIJCK, W.; BAEYEN, S.; CREEMERS, P.; HEUNGENS, K.; MAES, M. Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* in strawberry leaves using real-time PCR. **Plant Pathology**, London, v. 58, p. 504-514, 2009.

DEMEKE, T.; JENKINS, R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 396, p. 1977-1990, 2010.

DENHAM, T.G. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. **PANS**, London, v. 25, p. 30-36, 1979.

DENHAM, T.G.; WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 98, n. 1, p. 65-77, 1981.

EDWARDS, J.; CONSTABLE, F.; WIECHEL, T.; SALIB, S. Comparison of the molecular tests – single PCR, nested PCR and quantitative PCR (SYBR[®]Green and TaqMan[®]) - for detection of *Phaeoemoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 46, p. 58-72, 2007.

ELNIFRO, E.M.; ASHSHI, A.M.; COOPER, R.J.; KLAPPER, P.E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 4, p. 559-557, 2000.

ENSIKAT, H.J.; NEINHUIS, C.; BARTHLOTT, W. Direct access to plant epicuticular wax crystals by a new mechanical isolation method. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 161, n. 1, p. 143-148, 2000.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 91, p. 13-20, 1979.

_____. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: I. Disease epidemiology. **Turrialba**, San Jose, v. 34, p. 173-177, 1984.

FEICHTENBERGER, E. Queda dos frutos jovens de citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 12, n. 2, p. 513-521, 1991.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR, J. Doenças dos citros (Citrus spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 239-269.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 1, p. 367-371, 2004.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.

GAO, X.; JACKSON, A.; LAMBERT, K.N.; LI, S. Detection and quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots with real-time quantitative polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 12, p. 1372-1380, 2004.

GARRIDO, C.; CARBÚ, M.; FERNÁNDEZ-ACERO, F.J.; BOONHAM, N.; COLYER, A.; CANTORAL, J.M.; BUDGE, G. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. **Plant Pathology**, London, v. 58, n. 1, p. 43-51, 2009.

HAYDEN, J.K.; RIZZO, D.; TSE, J.; GARBELOTTO, M. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 10, p. 1075-1083, 2004.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **BioTechniques**, Natick, v. 23, n. 1, p. 504-511, 1997.

HENSHALL, W.R.; BERESFORD, R.W.; CHYNOWETH, R.W.; RAMANKUTTY, P. Comparing surface wetness inside and outside grape canopies for region-wide assessment of plant disease risk. **New Zealand Plant Protection**, Hasting, v. 58, p. 80-83, 2005.

HEUSER, T.; ZIMMER, W.; Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 209, n. 2, p. 295-299, 2002.

JETTER, R.; SCHAFFER, S.; RIEDERER, M. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 619-628, 2000.

KLEIN, D.; BUGL, B.; GUNZBURG, W.H.; SALMONS, B. Accurate estimation of transduction efficiency necessitates a multiplex real-time PCR. **Gene Therapy**, Basingstoke, v. 7, n. 6, p. 458-463, 2000.

LANDIS, J.R.; KOCK, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LEES, A.K.; CULLEN, D.W.; SULLIVAN, L.; NICOLSON, J. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. **Plant Pathology**, London, v. 51, p. 293-302, 2002.

LIMA, W.G.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; MELO DE FILHO, P.A. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 1, p. 157-165, 2011.

LIN, Y.; STOVER, E.; SONODA, R.; ROSSKOPF, E. Stigma and style necrosis is associated with postbloom fruit drop disease in citrus following artificial inoculation. **Hortscience**, Alexandria, v. 36, n. 6, p. 1138, 2001.

MA, Z.; MICHAILIDES, T.J. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 145-161, 2007.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, p. 47-51, 2002.

- MCCARTNEY, H.A.; FOSTER, S.J.; FRAAIJE, B.A.; WARD, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 1, p. 129-142, 2003.
- MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 137-143, 1992.
- MUMFORD, R.; BOONAHM, N.; TOMLINSON, J.; BARKER, I. Advances in molecular phytodiagnostics: new solutions for old problems. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 116, n. 1, p. 116-119, 2006.
- MUMFORD, R.A.; WALSH, K.; BARKER, I.; BOONHAM, N. Detection of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using a multiplex real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 5, p. 448-453, 2000.
- NICOLAISEN, M.; SUPRONIENE, S.; NIELSEN, L.K.; LAZZARO, I.; SPLIID, N.H.; JUSTESEN, A.F. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 76, p. 243-240, 2009.
- PERÉZ-HERNÁNDEZ, O.; NAM, M.H.; GLEASON, M.L.; KIM, H.G. Development of a nested polymerase chain reaction assay for detection of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 12, p. 1655-1661, 2008.
- PORTO, O.M.; ROSSETTI, V.; DORNELLES, C.M.M. Queda de frutos jovens de citros, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p. 681-692.
- ROJAS, E.I.; REHNER, S.A.; SAMUELS, G.J.; BAEL, S.A.V.; HERRE, E.A.; CANNON, P.; CHEN, R.; PANG, J.; WANG, R.; ZHANG, Y.; PENG, Y.Q.; SHA, T. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Treobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, Corvallis, v. 102, n. 6, p. 1318-1338, 2010.
- ROLIM, G.S.; CAMARGO, M.B.P.; LANIA, D.G.; MORAES, J.F.L. Classificação climática de Koppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 711-720, 2007.
- SAMUELIAN, S.K.; GREER, L.A.; SAVOCCHIA, S.; STEEL, C.C. Detection and monitoring of *Greeneria uvicola* and *Colletotrichum acutatum* development on grapevines by real-time PCR. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 3, p. 298-303, 2011.

SANTOS, E.A.; SENTELHAS, P.C.; PEZZOPANE, J.E.M.; ANGELOCCI, L.R.; MONTEIRO, J.E.B.A. Spatial variability of leaf wetness duration cotton, coffee and banana crop canopies. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 18-25, 2008.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors: occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, p.1014-1026, 2012.

SILVA-JUNIOR, G.J. **Podridão Floral dos Citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença**. 2011. 131 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SMITH, C.J.; OSBORN, M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 67, p. 6-20, 2009.

SONODA, R.M.; HEBB, J.W. Postbloom fruit drop in the Indian River citrus growing area: history and present status. **Citrus Industry**, Bartow, v. 72, p. 12-81, 1991.

SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. **Plant Pathology**, London, v. 45, p. 650-655, 1996.

TOOLEY, P.W.; MARTIN, F.N.; CARRAS, M.M.; FREDERICK, R.D. Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 4, p. 336-345, 2006.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop of citrus, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, p. 329-334, 1994.

VAN GENT-PELZER, M.P.E; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; KOX, L.F.F.; BONANTS, P.J.M. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. **Journal Phytopathology**, Lancaster, v. 155, p. 357-363, 2007.

VIDAL, E.; YOKOMI, R.K.; MORENO, E.; BERTOLINI, E.; CAMBRA, M. Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*: a model for other plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 1, p. 114-121, 2012.

WACULICZ-ANDRADE, C.E. **Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas e da vegetação espontânea**. 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

WARD, E.; FOSTER, S.J.; FRAAIJE, B.A.; MCCARTNEY, H.A. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 145, n. 1, p. 1-16, 2004.

WHITE, T.J.; BRUNS, S.L.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WITTEWER, C.T.; HERMANN, M.G; GUNDRY, C.N; ELENITOBA-JOHNSON, K.S. Real-Time Multiplex PCR: assays. **Methods**, Philadelphia, v. 25, n.4, p. 430-442, 2001.