

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade**



## **Dissertação**

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE DE ESPÉCIES DE *Monilinia* ASSOCIADAS À  
PODRIDÃO PARDA DO PÊSSEGO**

**Josiane Vergara Casarin**

Pelotas, 2007

**Josiane Vergara Casarin**

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE DE ESPÉCIES DE *Monilinia* ASSOCIADAS À  
PODRIDÃO PARDA DO PÊSSEGO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitopatologia).

Orientador: Prof. Dr. Edegar Antonio Rossetto

Pelotas, 2007

**Banca Examinadora:**

Dr: Edegar Antonio Rosseto

Dr: Cley Donizeti Martins Nunes

Dr: José Soares do Nascimento

Dr<sup>a</sup>: Vera Lucia Bobrowski

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida.

A meus pais Adélia e Erasmo Fernando e a meu irmão Flávio que sempre me deram o apoio, carinho e compreensão em todos os momentos difíceis.

As minhas queridas amigas Maria Augusta, Ana Carolina, Maria Angelita e a sua família pelo carinho e amizade.

Ao Departamento da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao Doutor Edemar Antonio Rosseto pelo apoio e carinho.

Aos grandes amigos que fiz nesses dois anos pelo companheirismo, apoio e carinho Ana Paula Afonso, Bianca Corrêa, Cândida Jacobsen de Farias, Daniel Lima, Juliane Ludwig, Lúcia Somavilla, Marília Marques, Maristela Borin, Nelson Lima, Rita Ariane Lopes e Victor Hugo Coila.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular pela dedicação e paciência Alexandre Carvalho, Guilherme, Letícia, Monalize e Luciane Arantes.

Aos funcionários da Universidade Federal de Pelotas Amanda, Claudinei, Borges e Sérgio.

Aos professores Valmor Bianchi, Andréia Moura e Nelson Garibaldi pela dedicação e atenção.

Aos professores Universidade Federal de Pelotas pelos conhecimentos transmitidos durante esses dois anos.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	07
Lista de Figuras.....	08
Resumo Geral.....	09
General Summary.....	11
Introdução Geral.....	13
Revisão de Literatura.....	17

### Capítulo 01: Identificação de Espécies de *Monilinia* spp Através de Técnicas Moleculares

Resumo.....	22
Abstract.....	21
1. Introdução.....	23
2. Materiais e Métodos.....	25
2.1 Obtenção dos isolados de <i>Monilinia</i> spp.....	25
2.2 Extração de DNA.....	26
2.3 Quantificação do DNA.....	26
2.4 Amplificação do DNA.....	27
3. Resultados e Discussão.....	27
4. Conclusões.....	29

### Capítulo 01: Caracterização Morfológica de Isolados de *Monilinia fructicola*

Resumo.....	30
Abstract.....	31
1. Introdução.....	32

<b>2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Obtenção dos isolados de <i>Monilinia fructicola</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Isolamento das colônias.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3 Crescimento micelial e caracterização morfológica de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> em diferentes meios de cultura.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4 Produção de micélio de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> (peso seco) em diferentes meios de cultura.....</b>	<b>36</b>
<b>2.5 Avaliação do crescimento micelial de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> em meio de cultura contendo Mancozeb ou Azoxistrobina.....</b>	<b>37</b>
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>38</b>
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>50</b>
<b>5 Conclusões Gerais.....</b>	<b>51</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 02: Caracterização Morfológica de Isolados de *Monilinia fructicola*

Tabela 01: Origem e procedência de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> . Pelotas, UFPEL, 2007.....	34
Tabela 02: Fungicidas avaliados quanto à sensibilidade <i>in vitro</i> com isolados de <i>Monilinia fructicola</i> . Pelotas, UFPEL, 2007. ....	38
Tabela 03: Médias de crescimento micelial radial (cm) de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> crescidos em meio de cultura de Suco de Pêssego, Pagnocca e BDA. Pelotas, UFPEL, 2007.....	39
Tabela 04: Médias do peso seco dos isolados de <i>Monilinia fructicola</i> nos meios de cultura: Pagnocca, Suco de Pêssego e BDA. Pelotas, UFPEL, 2007.....	40
Tabela 05: Origem dos isolados e características morfológicas das colônias de <i>Monilinia fructicola</i> cultivadas em meio de cultura BDA. Pelotas, UFPEL, 2007.....	43
Tabela 06: Origem dos isolados e características morfológicas das colônias de <i>Monilinia fructicola</i> cultivadas em meio de cultura de Suco de Pêssego. Pelotas, UFPEL, 2007.....	45
Tabela 07: Origem dos isolados e características morfológicas das colônias de <i>Monilinia fructicola</i> cultivadas em meio de cultura Pagnocca. Pelotas, UFPEL, 2007.....	45
Tabela 08: Médias de sensibilidade do crescimento micelial de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> em meio de cultura BDA com o princípio ativo mancozeb. Pelotas, UFPEL, 2007.....	48
Tabela 09: Médias de sensibilidade do crescimento micelial de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> em meio de cultura BDA com o princípio ativo azoxistrobina. Pelotas, UFPEL, 2007.....	49

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 01: Identificação de Espécies de *Monilinia* spp. Através de Técnicas Moleculares

Figura 01: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do DNA extraído dos isolados de *Monilinia fructicola* utilizando-se primers específicos as três espécies.....28

Figura 02: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do DNA extraído dos isolados de *Monilinia fructicola* utilizando-se primers específicos as três espécies.....28

### Capítulo 02: Caracterização Morfológica de Isolados de *Monilinia fructicola*

Figura 01: Variações dos isolados de *Monilinia fructicola* em meio de cultura Suco de Pêssego, BDA e Pagnocca.....42

## RESUMO GERAL

**CASARIN, Josiane Vergara. Universidade Federal de Pelotas, Setembro de 2007. Avaliação da variabilidade de espécies de *Monilinia* associadas à podridão parda do pêssego. 2007. 55f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.**

O Rio Grande do Sul é o principal produtor brasileiro de pêssegos (*Prunus persica* L. Batch) a produção comercial no estado está restrita em quatro pólos. Na região de Pelotas a produção de pêssegos é voltada para a indústria, na grande Porto Alegre, Serra Gaúcha e região da Campanha para pêssegos de mesa e consumo *in natura*. A cultura do pêssego é suscetível a várias doenças que comprometem a quantidade e qualidade dos frutos destacando-se entre elas a podridão parda. A podridão parda é uma doença cosmopolita e pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Monilinia*. Na América do Sul e do Norte encontram-se *Monilinia fructicola* (Wint) Honey e *Monilinia laxa* (Aderhold e Ruhland) Honey, e na Europa, *Monilinia fructigena*. Estudos baseados em caracterização morfológica são fundamentais à identificação e conhecimento da amplitude da variabilidade existente entre isolados. Paralelamente, a esses estudos as técnicas de biologia molecular são indispensáveis para a complementação da caracterização de fitopatógenos, destacando-se a PCR, como um método sensível, rápido e confiável na identificação de espécies de *Monilinia* visando distinção entre *M. fructicola* de *M. laxa* e *M. fructigena*. O trabalho teve como objetivos identificar espécies de *Monilinia* associadas à podridão parda do pêssego no Rio Grande do Sul e comparar os isolados de *Monilinia fructicola* em meio de cultura através de algumas características morfológicas como: crescimento micelial, peso seco, morfologia das colônias e sensibilidade a Mancozeb e Azoxistrobina. Para o estudo de identificação molecular foram avaliados 34 isolados de *Monilinia*. Após a extração o DNA, foi amplificado com primers específicos para as três espécies. Os produtos da amplificação foram eletroforisados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e as imagens captadas com sistema de fotodocumentação. Todos os isolados obtidos na região sul do Rio Grande do Sul produziram bandas de aproximadamente 534 pb, comprovando a ocorrência de somente uma espécie. Para o trabalho de

caracterização morfológica foram avaliados trinta e cinco isolados cultivados em três meios de cultura BDA, Suco de Pêssego e Pagnocca. O crescimento micelial dos isolados foi avaliado através da medida das colônias em sentido cruzado com o auxílio de uma régua milimetrada. No estudo da morfologia das colônias foram avaliadas a cor do emaranhado micelial, a forma, a margem e a elevação da colônia. O peso seco dos isolados foi determinado através do crescimento em Erlenmeyers contendo os meios de cultura líquido: BDA, Pagnocca e Meio de Suco de Pêssego após o período de incubação as culturas foram filtradas em papel filtro e secas em estufas. Em relação à sensibilidade aos produtos químicos Mancozeb e Azoxistrobina foram usados os princípios ativos nas concentrações de 5 e 100ppm, sendo avaliados a inibição dos isolados quanto à concentração de cada produto. Os resultados mostraram variações no crescimento micelial radial destacando o melhor meio o Suco de Pêssego, seguidos dos meios Pagnocca e BDA. Enquanto que para a variável resposta peso seco de micélio, os melhores resultados foram obtidos com o meio Pagnocca, BDA e Suco de Pêssego, respectivamente. Quanto à coloração do micélio houve uma variação de acordo com o meio de cultura utilizado apresentando maior variabilidade no meio BDA. Em relação à forma das colônias para a maioria dos isolados, nos meios testados, apresentou forma circular. Para a margem das colônias todos os isolados cultivados em meio de Suco de Pêssego apresentaram margem ondulada em BDA e em Pagnocca lobadas e onduladas. Quanto à sensibilidade a Mancozeb e Azoxistrobina os isolados mostraram diferentes reações de inibição ratificando a ampla variabilidade nas demais características morfológicas testadas. Nas concentrações de 100ppm, mancozeb inibiu maior número de isolados comparado com azoxistrobina.

**Palavras chaves:** Podridão parda, *Prunus persica*, Caracterização.

## GENERAL SUMMARY

**CASARIN, Josiane Vergara. Evaluation of *Monilinia* species variability associated to peach brown rot. 2007. 55f.** Disserttation (Master) – Program Pós-Graduação em Fitossanidade. Federal University of Pelotas, Pelotas. **Pelot**

State of Rio grande do Sul is the main brazilian peach-tree (*Prunus persica* L. Batch) grower, with the commercial production being restricted to four main centers. In the region of Pelotas peach production is directed to industry, whereas in Porto Alegre belt, Serra Gaúcha and region of Campanha, fruit production is directed to *in natura* consumption. Peach-tree culture is susceptible to several diseases endangering fruit quantity and quality, especially in relation to brown rot. This disease is cosmopolite and can be caused by different species of the *Monilinia* genus. In South and North America, *Monilinia fructicola* (Wint) Honey and *Monilinia laxa* (Aderhold and Ruhland) are found and in Europe *Monilinia fructigena*. Studies based on morphologic characteristics are essential to identification and knowledge on variability amplitude that exists among isolates. Parallely to these studies, molecular biology techniques e are indispensable to complement phytopathogens characterization, with PCR being reliable, quick and sensible method to identify species of *Monilinia* in order to differentiate *M. fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. The objective of this study was to identify species of *Monilinia* associated to peach brown rot in Rio Grande do Sul, and to compare isolates of *M. fructicola* in culture medium through some morphologic characteristics such as: mycelium growth, dry weight, morphology of colonies and susceptibility to Mancozeb and Azoxistrobine. For molecular identification 34 isolates of *Monilinia* were evaluated. After extraction, DNA was amplified with specific primers for the three species. Products of amplification were eletrophorized in 1% agarose gel and dyed with ethidium bromide. Bands of DNA were visualized under ultraviolet light and image captured with a photodocumentation system. All isolates obtained in the southern region of Rio Grande do Sul yielded bands of approximately 534 pb, corroborating the occurrence of a single species. For the morphologic characterization 35 isolates were evaluated and cultivated in three culture media: BDA, peach juice and

Pagnocca. Mycelium growth of isolates was evaluated through measurement of colonies in cross section with a millimetrated scale. Color of mycelial network, shape, margin and elevation of colony were evaluated for colonies morphology. For dry weight determination isolates were cultivated in Erlenmeyers containing liquid BDA, Pagnocca and peach juice culture media. After incubation period cultures were filtrated in paper filter and oven dried. In relation to tolerance to chemical products Mancozeb and Azoxistrobine, active ingredients concentrations of 5 and 100ppm were used and inhibition of isolates being evaluated for each product. Results showed variations in radial mycelium growth mainly for peach juice, followed by Pagnocca and BDA media. For mycelium dry weight best results were obtained with Pagnocca, BDA and peach juice, respectively. Variation in mycelium color occurred accordingly to the culture medium used, showing greater variability in BDA medium. As for shape of colonies, the majority of isolates, in the tested media, showed circular shape. For colony margins all isolates cultivated in peach juice showed undulated margins; in BDA and Pagnocca undulated and lobated margins appeared. In relation to tolerance to Mancozeb and Azoxistrobine isolates showed different reactions, confirming the ample variability in the remaining morphologic characteristics. Mancozeb concentration of 100ppm inhibited greater number of isolates compared to Azoxistrobine.

**Key Words:** Brown rot, *Prunus persica*, characterization

## INTRODUÇÃO GERAL

O Rio Grande do Sul é o principal produtor brasileiro de pêssegos (*Prunus persica* L. Batch), com cerca de 46% da produção nacional, ocupando uma área superior a 10 mil hectares. Sendo que a cidade de Pelotas, RS, concentra mais de 90% da produção regional, foram cerca de 60 mil toneladas na safra no ano de 2006 destinados ao processamento.

A cultura do pêssego é predisposta a várias doenças que comprometem a quantidade e qualidade dos frutos entre elas destaca-se a podridão parda.

A podridão parda apresenta como agente causal várias espécies de *Monilinia*, incluindo *M. fructicola* (Wint) Honey, *M. laxa* (Aderh. e Ruhl.) Honey e *M. fructigena* (Aderh. e Ruhl.) Honey. Entretanto, *Monilinia fructicola* ocorre freqüentemente em pêssegos e nectarinas, *M. fructigena* é encontrada em maçãs e pêras e *M. laxa* em damasco e amêndoas. Todavia, essas espécies podem infectar uma ampla gama de espécies como: *Prunus* (Ameixa), *Malus* (Maçã), *Pyrus* (Pêra), *Chaenomeles* (Marmeleiro japonês), *Crataegus* (Pirliteiro), *Cydonia* (Marmelo) e *Eriobotrya* (Nêspera), além de uvas e morangos (LANE, 2002). Essa doença é considerada um dos mais importantes problemas ligados à produção de pêssego no Sul do Brasil. Está distribuída em todas as regiões produtoras (BALARDIN et al., 1994). Os danos se estendem ao longo do florescimento, colheita, transporte e armazenamento dos frutos (BALARDIN et al., 1994; LANE, 2002; LUO e MICHAILIDES, 2003), porém, maiores prejuízos acontecem principalmente em anos úmidos advindo de ataque em pré e pós-colheita (GARRIDO e SÔNEGO, 2005).

O patógeno sobrevive nos tecidos mumificados, pedúnculos, flores murchas e em cancos sobre ramos. A fonte de inóculo primário é constituída por conídios em órgãos da planta doente e também por ascósporos e conídios produzidos por múmias dispersos no ar, que além de causarem infecções primárias na primavera funcionam como uma fonte de infecção oculta aos frutos (HONG et al., 1998; LUO et al., 2001).

O processo de patogênese de *Monilinia fructicola* inicia-se pela penetração do patógeno via ferimentos nos tecidos vegetais advindos de injúrias, tais como: perfurações, cortes, abrasões e amassamentos, comuns durante a colheita e manuseio dos frutos (SOUZA et al., 1999).

Os conídios são disseminados pelo vento associado à chuva e germinam rapidamente sob condições ambientais favoráveis. A temperatura ótima é de 25°C e o período de infecção exige um mínimo de 18 horas a 10°C e de 5 horas a 25°C (GARRIDO e SÔNEGO, 2005).

Algumas infecções sobre os frutos podem conduzi-las à produção de milhões de esporos capaz de causar uma epidemia, particularmente se perdurarem condições de campo úmidas três semanas antes da colheita (DAI et. al, 2003).

Dois fases de maior suscetibilidade do pêssigo à podridão parda são bem reconhecidas: floração e pré-colheita. Inicialmente a infecção começa durante a fase de floração, infectando os capulhos florais. Flores infectadas murcham, tornam-se marrons e ficam fixadas ao ramo por uma goma. Já durante a fase de pré-colheita, os frutos infectados apresentam lesões pequenas e pardacentas que evoluem para manchas marrons com a colonização dos tecidos vizinhos pelo fungo. Frutos maduros infectados pelo patógeno podem apresentar podridões visíveis dentro de 48 horas. Infecções latentes podem ocorrer nos frutos verdes, mas sua manifestação ocorrerá durante a maturação, a menos que os frutos sejam lesionados por insetos ou granizo (GARRIDO e SÔNEGO, 2005).

A crescente demanda mundial por frutas tropicais tem exigido dos produtores e exportadores uma preocupação quanto à produção de frutas de melhor qualidade fitossanitária, tornando essencial ao desenvolvimento de

programas de controle, incluindo a diagnose prévia desses patógenos, que são problemas em pós-colheita (PERES et al., 2003).

Os agentes fitopatogênicos apresentam em comum características de alta variabilidade. Como consequência dentro de uma mesma espécie, são encontrados muitos biótipos que diferem entre si em várias características morfológicas, fisiológicas e genéticas. Para o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes e também sobre a taxonomia, demandam-se estudos de variabilidade e especificidade do hospedeiro quanto aos diversos isolados (FERREIRA, 2005).

A utilização de caracteres morfológicos é um método relativamente fácil, podendo ser desenvolvido sem a necessidade de equipamentos sofisticados, levando a diagnósticos e informações de controle mais rápidas (NECHET e ABREU, 2002). Esses estudos são fundamentais à identificação e ao conhecimento da amplitude da variabilidade existente entre isolados de um determinado patógeno bem como para o desenvolvimento de métodos de controle, seja, químico, genético ou cultural, com vistas ao manejo adequado da doença (TOZZE JR et al., 2006).

Durante os últimos anos, o conhecimento da estrutura genética de populações de fitopatógenos tem se tornado necessário para a implementação de estratégias de controle efetivas. Apesar do número de estudos com fungos ter crescido significativamente, observa-se que os trabalhos têm focado um número restrito de fitopatógenos (NOZAKI et al., 2006).

Métodos fenotípicos, também denominados de clássicos como morfologia, testes bioquímicos e sorológicos utilizados para identificação de microrganismos são importantes, porém apresentam limitações que os tornam insuficientes, muitas vezes, para a discriminação acurada de espécies (DI CASTRI e YONES, 1990). Contudo, quando associados às técnicas de biologia molecular, os métodos taxonômicos clássicos tornam-se, em conjunto, ferramentas poderosas para a caracterização e a identificação inequívoca de patógenos (FIGUEIREDO et al., 2003).

Com o advento da biologia molecular os marcadores moleculares surgiram como uma metodologia alternativa para identificação e manipulação de genes de

interesse em biologia e genética de fitopatógenos. Com o desenvolvimento da técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) a biologia molecular experimentou um revolucionário avanço em função da produção de um grande número de cópias de uma seqüência específica de DNA, técnica utilizada eficientemente no estudo da diversidade de fungos fitopatogênicos (JULIATTI et al., 2006). Na maioria dos estudos de genética de populações, utilizam-se marcadores genéticos que são seletivamente neutros, altamente informativos e relativamente fáceis de serem estudados (NOZAKI et al., 2006).

Na literatura mundial há relatos de várias espécies de *Monilinia* associadas à podridão parda do pêssego, que embora são fisiologicamente diferentes e apresentam uma morfologia muito similar, o que dificulta sua identificação. Nessa vertente técnicas moleculares, entre elas o método por PCR constitui-se numa importante ferramenta na identificação rápida e confiável de espécies de *Monilinia* com base na distinta divergência genética entre espécies.

As técnicas moleculares são onerosas, mas são muito úteis, porque, reúnem características de especificidade, sensibilidade e precisão. O método de PCR vem sendo usado também para classificar fitopatógenos (MA et al., 2003) e caracterizar a diversidade genética entre indivíduos (MAVÁREZ et al., 2001; NOZAKI et al., 2006).

Diagnósticos baseados no método de PCR tem sido desenvolvido com sucesso para vários fungos fitopatogênicos (IOOS e FREY, 2000). Recentemente, estratégias de identificação molecular foram aplicadas para distinguir *M. fructicola* de *M. laxa* e *M. fructigena* (FULTON e BROWN, 1997; FÖRSTER e ADASKAVEG; IOOS e FREY, 2000).

## REVISÃO DE LITERATURA

O pêssego é uma espécie nativa da China, com registros que remontam a 20 séculos a.C. Estudos indicam que, provavelmente, teria sido levado da China para a Pérsia e de lá se espalhado pela Europa. No Brasil, segundo relatos históricos, o cultivo do pêssego foi introduzido em 1532 por Martim Afonso de Souza, por meio de mudas trazidas da Ilha da Madeira e plantadas em São Vicente atual estado de São Paulo (PROTAS e MADAIL, 2003).

No Brasil, o cultivo do pêssego ocupa uma área de aproximadamente 20.000 hectares (GOMES, 2003), com produção anual brasileira que ultrapassa 100 mil toneladas, destinando 57% para consumo *in natura* e 43% para industrialização. O Rio Grande do Sul é o principal produtor, com aproximadamente 80 mil toneladas/ano (PROTAS e MADAIL, 2003), concentrando a maior parte da produção nacional. A produção comercial no Rio Grande do Sul está restrita em quatro pólos que, juntos somam cerca de 13 mil hectares de pomares (PROTAS e MADAIL, 2003). Em seguida destacam-se os estados de São Paulo e de Santa Catarina.

Os estados do Sul e Sudeste apresentam condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo dessa espécie, exigindo apenas a escolha das cultivares com adaptações aos diferentes locais ou regiões. A produção brasileira é baixa se comparada a outros países produtores. Isto se deve a diferentes fatores, dentre eles estão as doenças, destacando a podridão parda responsável por danos econômicos consideráveis em pêssego (MONTEIRO et al., 2004).

A podridão parda é uma doença cosmopolita e pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Monilinia*. Na América do Sul e do Norte encontram-se *Monilinia fructicola* (Wint) Honey e *Monilinia laxa* (Aderhold e Ruhland) Honey, e na Europa, *Monilinia fructigena* (BLEICHER, 1997; MONTEIRO et al., 2004).

### **Sintomatologia**

Os sintomas da podridão parda ocorrem a partir da primavera onde os capulhos florais infectados ficam pardacentos e morrem com rapidez. Alguns botões infectados são cobertos pelas frutificações do fungo, apresentando aspecto de mofo. Sob condições de alta umidade, o fungo pode avançar pela flor até o pedúnculo e penetrar no ramo, resultando no desenvolvimento do cancro do ramo. À medida que a infecção progride, o cancro pode anelar o ramo ou galho, causando murcha e morte da parte terminal do mesmo.

Nos frutos, a doença ocorre próxima do estágio de maturação. Os sintomas iniciais são pequenas manchas pardacentas com encharcamento nos tecidos. A mancha desenvolve-se rapidamente, ocupando todo o fruto que, em condições úmidas, fica coberto de frutificações acinzentadas e densas do patógeno, podendo sofrer uma contínua desidratação culminando com a mumificação dos frutos (BLEICHER, 1997).

### **Etiologia e Características do Patógeno**

O patógeno pertence à Classe dos Discomycetes, que são Ascomicetos com formação de esporos sexuais, os ascósporos. No interior de estruturas globosas denominadas ascas o fungo produz escleródios bem desenvolvidos que permitem à sua sobrevivência no inverno, esses ao germinarem em condições ambientais favoráveis, formam apotécios onde são produzidos os ascos. Das quais os ascósporos são projetados e disseminados pelo vento, constituindo-se no inóculo primário da doença (BLEICHER, 1997).

*Monilinia fructicola* forma apotécios com ascos cilíndricos e ascósporos hialinos, elípticos de 6 a 15µm x 4 a 8µm. Os conídios de *M. fructicola* são limoniformes, elípticos, medindo de 15 a 25 x 8 a 14µm (BLEICHER, 1997).

No Brasil as condições para a ocorrência da fase perfeita são raras, o inóculo primário é constituído de conídios formados em cancrios de ramos. Frutos mumificados quando persistem na planta ou quando cobertos de terra não produzem apotécios, mas podem produzir conídios. O fungo penetra na planta basicamente pelos órgãos florais. Conídios formados em capulhos florais e ramos são disseminados por vento, água e insetos, atingindo os frutos nos quais podem penetrar diretamente pela cutícula ou por pequenos ferimentos, a colonização do fruto maduro é rápida, formando micélio inter e intracelular (BLEICHER, 1997).

Nas nossas condições climáticas a infecção é favorecida por temperatura e umidade elevadas e pela presença de ferimentos. Os sintomas mais freqüentes e característicos ocorrem nos frutos, em duas épocas diferenciadas do seu crescimento. À primeira, na queda fisiológica dos frutos e durante o processo de maturação. Nessa fase surgem as manchas de cor acastanhada com margens regulares, de rápido crescimento, concentradas em redor de ferimentos levando ao apodrecimento dos frutos. Posteriormente, condições de calor e baixa umidade o fruto infectado desidrata, mumifica e enegrece. Como é também considerada uma doença de armazenamento, nas câmaras frigoríficas, tem a capacidade de evoluir dissolvendo a cutícula e infectar os frutos adjacentes.

A presença de frutos infectados presos à planta ou sobre o solo constituem-se em importantes fontes de inóculo secundário para novas infecções, podendo aumentar a severidade da doença em pré e pós-colheita (MONTEIRO et al., 2004).

O controle da doença envolve a adoção de um conjunto de medidas voltadas ao controle integrado, onde além do controle químico são adotados uns conjuntos de medidas como tratamento de inverno, poda de limpeza com a eliminação de ramos doentes, restos florais e frutos mumificados visando a eliminar fontes de inóculo primário. Também é essencial o controle dos insetos-praga que ocasionam ferimentos nos frutos e atuam como vetores do patógeno.

Práticas culturais como: a poda de limpeza no inverno, remoção de frutos mumificados e capulhos florais e eliminação de ramos doentes, reduzem o nível de inóculo, mas esses procedimentos sozinhos não são eficientes para controlar a doença. Em regiões onde o estágio perfeito ocorre, é extremamente importante a limpeza do terreno e retirada de frutos mumificados para evitar ou restringir a formação de apotécios (MONTEIRO et al., 2004).

Outras medidas que auxiliam no controle da severidade da doença é o uso de adubação adequada e equilibrada, evitando o excesso de nitrogênio e o déficit de potássio (OGAWA et al., 1995).

### **Condições predisponentes**

A sobrevivência do fungo de uma safra para outra ocorre nos tecidos mumificados, pedúnculos, flores murchas e cancos. Sobre essas estruturas formam-se os conídios que são disseminados pelo vento e chuva. Em ambientes favoráveis germinam rapidamente podendo redundar em epidemias se perdurar à condição de tempo chuvoso. A temperatura ótima é de 25°C e o período de infecção exige um mínimo de 18 horas a 10°C e de 5 horas a 25°C (GARRIDO e SÔNEGO, 2005).

## RESUMO

### IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Monilinia* ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES

Doenças de pré e pós-colheita provocadas por fungos fitopatogênicos causam graves perdas à fruticultura. A podridão parda constitui um problema cosmopolita e é apontada como a principal doença do pêssego, causando perdas severas principalmente em anos com altas precipitações pluviométricas. Diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos com sucesso para vários fitopatógenos reunindo rapidez, alto grau de especificidade e sensibilidade. Atualmente, o método de PCR vem sendo utilizado com sucesso á detecção de muitas espécies de patógenos assegurando precisão na identificação dos mesmos para adoção de procedimentos quarentenários, inclusive. O conhecimento da estrutura genética de populações desses organismos tem se tornado um aliado a tomada de decisões à implementação de estratégias de controle mais efetivas. O trabalho teve como objetivo identificar espécies de *Monilinia* associadas à podridão parda do pêssego no Rio Grande do Sul. Foram avaliados 34 isolados de *Monilinia*. Após a extração de DNA, método CTAB, esse foi amplificado com primers específicos para as três espécies. Os produtos da amplificação foram eletroforisados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e as imagens captadas com sistema de fotodocumentação. Todos os isolados obtidos na região Sul do Rio Grande do Sul produziram bandas de aproximadamente 534 pb, comprovando a ocorrência de somente uma espécie.

**Palavras-chaves:** PCR, DNA e pêssego.

## ABSTRACT

### Identification species of *Monilinia fructicola* through molecular techniques

Pre and postharvest diseases provoked by pathogenic fungi cause severe losses to fruit growing. Brown rot is a cosmopolite problem and is the main peach disease, responsible for severe losses, mainly in excessively rainy years. Molecular diagnosis have been successfully developed for several phytopathogens, with high specificity, sensibility and quickness. Presently, the PCR method is being used with success in the detection of several pathogenic species assuring precise identification inclusively, in order to adopt quarantine procedures. The knowledge of the population genetic structure of such organisms has turned out an allied in decision making in the implementation of more effective controlling strategies. The objective of this study was to adjust the PCR technique for the identification of *Monilinia fructicola* species associated to peach brown rot. Thirty four (34) isolates of *Monilinia* were evaluated. After the DNA extraction, by the CTAB method, amplification was made with specific primers for the three species. Products of amplification were eletrophorized in 1% agarose gel and dyed with ethidium bromide. Bands of DNA were visualized under ultraviolet light and image captured with a photodocumentation system. All isolates obtained in the southern region of Rio Grande do Sul yielded bands of approximately 534 pb, corroborating to be pertinent to *Monilinia fructicola* species.

**Key words:** PCR, DNA, peach.

## 1. INTRODUÇÃO

A área cultivada com pessegueiros, no Brasil é superior a 20.000 hectares, com uma produção na ordem de 160.000 t.ano<sup>-1</sup>. Desse total, 14.000 hectares são cultivados em quatro regiões do Rio Grande do Sul, onde está localizada mais de 70% da produção nacional, destinada a conserva e ao consumo *in natura* (NUNES et al., 2004). Na região de Pelotas a produção de pêssegos é voltada para a indústria, na grande Porto Alegre, Serra Gaúcha e região da Campanha para pêssegos de mesa e dupla finalidade, respectivamente (GOMES, 2003; NUNES et al., 2004). Nos plantios mais recentes na região de Pelotas há predomínio de cultivares com dupla finalidade, que podem ser utilizadas tanto para consumo *in natura* como para a indústria (GOMES, 2003).

Em qualquer sistema de produção patógenos em pré e pós-colheita, causam grandes transtornos aos atacadistas, varejistas e principalmente aos importadores de frutas, uma vez que os sintomas das doenças irão aparecer durante o armazenamento e transporte, em frutos aparentemente saudáveis, podendo causar grandes perdas (TERAO et al., 2005).

Dessa forma, um sistema de identificação de doenças em pré-sintomas usando métodos moleculares pode ser funcional à certificação de frutos e controle de qualidade para os produtos destinados a exportação a países em que o patógeno é considerado uma praga quarentenária (FORSTER e ADASKAVEG, 2000).

Os sintomas da podridão parda causada por *Monilinia fructicola* podem surgir durante o armazenamento e transporte de frutos resultando na formação de

cancros os quais podem fornecer inóculo para que ocorram infecções latentes em frutos imaturos e podridão em pêssegos maduros (LANE, 2002; LUO e MICHAILIDES, 2003).

Nos métodos de identificação clássicos de patógenos a caracterização morfológica, embora útil é restrita (FUNGARO, 2000). A observação da morfologia, testes bioquímicos e sorológicos utilizados para identificação de microrganismos são importantes, porém apresentam limitações que os tornam insuficientes, muitas vezes, para a discriminação acurada de espécies (DI CASTRI e YONES, 1990). Contudo, quando associados às técnicas de biologia molecular, os métodos taxonômicos clássicos revestem-se em poderosas ferramentas para a caracterização e a identificação inequívoca de patógenos (FIGUEIREDO et al., 2003).

Com o advento da biologia molecular várias técnicas foram desenvolvidas que podem ser usadas como importantes ferramentas, na identificação de traços de patógenos em pré-sintoma, como na avaliação de níveis de diversidade genética entre e dentro de determinada espécie a nível de raças ou patótipos (BRUNELLI, 2004) vislumbrando em um futuro próximo, importantes ferramentas que podem ser usadas como parte de programas de controle de qualidade de frutos (PERES et al., 2003).

Os trabalhos de caracterização utilizando marcadores moleculares originam informações extremamente importantes para o conhecimento da variabilidade de determinadas espécies. Essas informações são de grande interesse quando se busca o controle das doenças causadas por essas espécies, seja por meio de resistência genética, uso de fungicidas ou tratamentos culturais (SUSSEL, 2005).

Atualmente, a técnica de PCR, vem sendo utilizada para a detecção de fitopatógenos e com o objetivo entre outros, de evitar a sua disseminação via a introdução de material vegetal contaminado (FUNGARO, 2000). Diagnósticos baseados no método de PCR tem sido desenvolvido com sucesso para vários fungos fitopatogênicos (IOOS e FREY, 2000), com alto grau de especificidade e sensibilidade (BOEHM et al., 2001). Recentemente, estratégias de identificação

molecular foram aplicadas para distinguir *M. fructicola* de *M. laxa* e *M. fructigena* (FULTON e BROWN, 1997; FÖRSTER e ADASKAVEG; IOOS e FREY, 2000).

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da técnica de PCR, à torna particularmente poderosa para estudos genéticos envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (primers), que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Esses oligonucleotídeos iniciadores, também denominados de primers são sintetizados artificialmente de maneira que sua seqüência de nucleotídeos seja complementar a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Devido à importância da doença para a cultura do pêssego o presente trabalho teve como objetivo identificar espécies de *Monilinia* associadas à podridão parda do pêssego no Sul do Rio Grande do Sul.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção dos isolados de *Monilinia* spp.**

Os isolados de *Monilinia* spp. utilizados foram obtidos de frutos e múmias de pêssegos com sintomas e/ou sinais típicos de podridão parda, oriundos de regiões produtoras de pêssego do Rio Grande do Sul (Tab. 01). Fragmentos de tecidos infectados desinfestados superficialmente e/ou crescimento fúngico, foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio de cultura BDA<sup>®</sup>. As quais foram incubadas sob fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro a 22°C ± 3°C durante 7 dias. A preservação das colônias foi feita em tubos de ensaio com BDA<sup>®</sup> e armazenados sob refrigeração a 4°C.

## **2.2 Extração de DNA**

Após o crescimento dos fungos em placas com meio BDA<sup>®</sup> o micélio foi retirado com auxílio de uma espátula e macerados com nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana. E posteriormente colocado em um microtubo (eppendorf) de 2mL, ao qual foi adicionado 900µL de tampão CTAB 2%.

A seguir as amostras foram colocadas em banho-maria a 60°C por 60 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos, após o período de incubação as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente.

Logo após, foi adicionado 900µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitados por 10 minutos formando uma mistura homogênea e depois foram submetidas à centrifugação a 13.000 rpm (rotação por minuto) por 10 minutos.

A fase sobrenadante (650µL) foi coletada e transferida para microtubos de 1,5mL, adicionando-se 650µL de etanol gelado (-20°C), agitado por inversão por 5-6 vezes e deixado a 4°C overnight.

A seguir as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e eliminado o sobrenadante, adicionando-se aos microtubos com formação do pellet 500µL de etanol a 70% deixado repousando por 20 minutos. Em seguida, novamente o sobrenadante foi vertido e adicionado 300µL de etanol 100%. As amostras foram secas a temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados de TE (10 mM tris-HCl, 1mM tris) e armazenadas a 4°C.

## **2.3 Quantificação do DNA**

O produto da extração foi submetido à quantificação após 24 horas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e fotodocumentado. A quantificação foi realizada através da comparação com um marcador de peso molecular conhecido ( $\lambda$ DNA).

## 2.4 Amplificação do DNA

Para a reação de amplificação foram utilizados primers específicos para cada uma das espécies de *Monilinia* em combinação com o primer comum as três espécies.

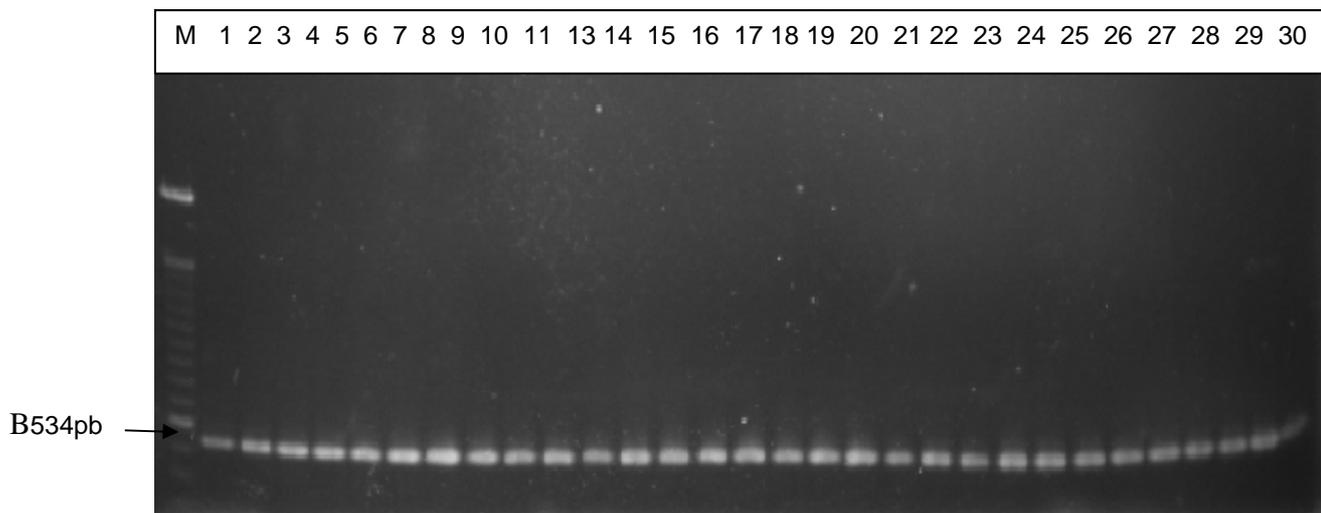
As seqüências dos primers utilizados foram: 5'-GCA AGG TGT CAA AAC TTC CA-3' como fase reversa comum e os 3 primers, específico para *M. fructigena* 5'-AGA TCA AAC ATC GTC CAT CT-3', específico para *M. fructicola* 5'-AAG ATT GTC ACC ATG GTT GA-3', específico para *M. laxa* 5'-TGG ACA TCA TAT CCC TCG AC-3' (MALVAREZ et al., 2001).

A amplificação foi conduzida em termociclador PTC-100 (MJ Research). A reação de PCR com a programação de um ciclo inicial de 95°C por 30 segundos, 60°C por 60 segundos, 72°C por 30 segundos durante 5 ciclos. E 95°C por 30 segundos, 58°C por 60 segundos 72°C por 30 segundos durante 35 ciclos com uma extensão final de 5 minutos a 72°C (MALVAREZ et al., 2001).

Os produtos da amplificação foram eletroforisados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e as imagens captadas com sistema de fotodocumentação.

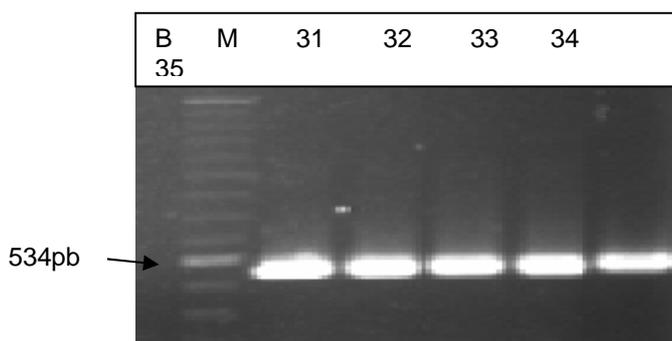
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras utilizadas amplificaram bandas de tamanho esperado, revelando se tratar de uma única espécie todos os isolados testados. Os primers utilizados no ensaio revelaram que os isolados pertenciam à espécie *Monilinia fructicola*, produzindo bandas de aproximadamente 534pb (pares de base) (Figs. 01 e 02).



**Fig 01:** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do DNA extraído dos isolados de *Monilinia fructicola* utilizando-se primers específicos as três espécies

**M = Marcador de 100pb**



**Fig 02:** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do DNA extraído dos isolados de *Monilinia fructicola* utilizando-se primers específicos as três espécies

**M = Marcador de 100pb**

Resultado semelhante foi obtido por Malvarez et al. (2001) usando a técnica de PCR multiplex para identificar isolados de *Monilinia* no Uruguai, revelando que todos os isolados pertenciam à espécie *Monilinia fructicola*.

Com relação aos trabalhos com esses primers específicos para detecção de fitopatógenos vários trabalhos já foram realizados entre eles destaca-se o realizado por Côté et al. (2004). Os autores trabalhando com os mesmos primers específicos pelo método de PCR multiplex conseguiram diferenciar as três espécies de *Monilinia*. Já Fulton e Brown (1997), conseguiram amplificar uma região 18S do

intron I para *M.fructicola*, mas obtiveram resultados negativos para as espécies *M. laxa* e *M. fructigena*.

Estudos realizados por Förster e Adaskaveg (2000), dos vinte um isolados analisados pertencentes à espécie *Monilinia fructicola* somente sete produziram bandas de tamanho esperado. Esse fato pode estar relacionado com a variabilidade genética entre os isolados de *Monilinia fructicola*.

Trabalhos conduzidos por vários autores já confirmaram a existência de diferenças entre isolados dentro de uma espécie fato comprovado por Gell et al. (2007), com isolados de *Monilinia laxa* obtidos de frutos de pêssago, comprovando através de técnicas moleculares a existência de diferenças entre os isolados. Ratificando observações da existência de diferenças anteriormente comprovadas por De Cal e Melgarejo (1999), através da caracterização morfológica e fisiológica. Fatos semelhantes também já foram comprovados, em outros patossistemas, como é o caso de *Botrytis cinerea* infectando frutos de kiwi relatado por Baraldi et al. (2002).

Os estudos confirmam as afirmações de Côté et al., (2004) que o método de PCR multiplex acelera significativamente o processo

de identificação de espécies de fungos fitopatogênicos, quando comparado com métodos baseados em características morfológicas. Sendo uma técnica relativamente simples e rápida para identificação de espécies de *Monilinia* que infectam frutas de caroço.

#### **4 CONCLUSÕES**

Há apenas a espécie *Monilinia fructicola* nas regiões produtoras de pêssago do Rio Grande do Sul;

A técnica de PCR apresenta praticidade e rapidez na identificação de espécies de *Monilinia*.

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola*

O Rio Grande do Sul é o principal produtor brasileiro de pêssegos (*Prunus persica* L. Batch), mas essa cultura é suscetível a várias doenças, entre elas a parda podridão. A podridão parda causada por *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey é uma das principais doenças pré e pós-colheita responsável por graves prejuízos à cultura. O trabalho teve por objetivo comparar os isolados de *Monilinia fructicola* em meio de cultura através de algumas características morfológicas como: crescimento micelial, peso seco, morfologia das colônias e sensibilidade a Mancozeb e Azoxistrobina. Foram utilizados trinta e cinco isolados cultivados em três meios de cultura BDA<sup>®</sup>, Suco de Pêssego e Pagnocca. O crescimento micelial dos isolados foram avaliados através da medida das colônias em sentido cruzado com o auxílio de uma régua milimetrada. No estudo da morfologia das colônias foram avaliadas a cor do emaranhado micelial, a forma, a margem e a elevação da colônia. Para o estudo do peso seco os isolados foram cultivados em Erlenmeyers contendo os meios de cultura líquidos BDA, Pagnocca e Meio de Suco de Pêssego após o período de incubação as culturas foram filtradas em papel filtro e levadas à estufa para secar. Em relação à sensibilidade aos produtos químicos Mancozeb e Azoxistrobina foram usados nas concentrações de 5 e 100ppm. Sendo avaliados a inibição dos isolados quanto à concentração de cada produto. Os resultados mostraram variações no crescimento micelial radial destacando o melhor meio o Suco de Pêssego, seguidos dos meios Pagnocca e BDA<sup>®</sup>. Enquanto que para a variável resposta peso seco de micélio, os melhores resultados foram obtidos com o meio Pagnocca, BDA<sup>®</sup> e Suco de Pêssego, respectivamente. Quanto à coloração do micélio houve uma variação de acordo com o meio de cultura utilizado apresentando maior variabilidade no meio BDA<sup>®</sup>. Em relação à forma das colônias para a maioria dos isolados, nos meios testados, apresentou forma circular. Para a margem das colônias todos os isolados cultivados em meio de Suco de Pêssego apresentaram margem ondulada em BDA<sup>®</sup> e em Pagnocca lobadas e onduladas. Quanto à sensibilidade a Mancozeb e Azoxistrobina os isolados mostraram diferentes reações de inibição ratificando a ampla variabilidade nas demais características morfológicas testadas. Nas concentrações de 100ppm, mancozeb inibiu maior número de isolados comparado com azoxistrobina.

**Palavras chaves:** Crescimento micelial, *Prunus persica* e Podridão parda.

## ABSTRACT

### Morphological characterization of *Monilinia fructicola* isolates

Brown rot caused by *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey is one of the main diseases in pre and postharvest of peaches (*Prunus persica* L. Batch), causing severe losses. In this study isolates of *Monilinia fructicola* in culture medium were compared for several morphological characteristics as micelial growth velocity, dry weight, diameter, colonies morphology and tolerance to Mancozeb and Azoxistrobine. Thirty five (35) isolates cultivated in three BDA culture media, peach juice and Pagnocca were utilized. Micelial growth of isolates was evaluated by measuring of colonies in cross section with milimetrated scale. In the colonies morphology study evaluation was made for micelial network, shape, margin and colony elevation. For dry weight determination, isolates were cultivated in Erlenmeyers containing BDA liquid culture media, Pagnocca and peach juice after incubation period cultures were filtrated in paper filter. In relation to tolerance to chemical products, Mancozeb and Azoxistrobine were used in the concentrations of 5 and 100 ppm and inhibition of isolates being evaluated for each product. Results showed variations in radial mycelial growth mainly for peach juice, followed by Pagnocca and BDA media. For mycelium dry weight best results were obtained with Pagnocca, BDA and peach juice, respectively. Variation in mycelium color occurred accordingly to the culture medium used, showing greater variability in BDA medium. As for the shape of colonies, the majority of the isolates, in the tested media, showed circular shape. For colony margin all isolates cultivated in peach juice showed ondulated margin; in BDA and Pagnocca ondulated and lobated margins appeared. As for tolerance to Mancozeb and Azoxistrobine isolates showed different reactions, confirming the ample variability in the remaining morphological characteristics.

**Key Words:** Mycelial growth, *Prunus persica*, Brown rot.

## 1. INTRODUÇÃO

A podridão parda é uma doença cosmopolita considerada a principal doença das rosáceas de caroço como: pêssigo, ameixa, nectarina (GARRIDO e SÔNEGO, 2005), damasco e cereja (MOREIRA, 2005), ocorrendo em quase todos os pomares, causando perdas severas principalmente em anos com altas precipitações pluviométricas (GARRIDO e SÔNEGO, 2005).

A doença é responsável por acentuada redução da produção de frutos, causando graves perdas econômicas para produtores de fruteiras de caroço (*Prunus* spp.) (HOLTZ et al., 1998).

Os agentes causais são três espécies de *Monilinia* sendo a mais importante *M. fructicola* (Wint.) Honey (DAI et al., 2003; LUO et al., 2001).

As espécies de *M. fructicola*, *M. laxa* e *M. fructigena* além de terem características culturais similares são difíceis de identificá-las por características morfológicas (tamanho dos esporos, diâmetro das hifas, formação do tubo germinativo, coloração e forma da colônia) e pelas interações dos isolados; porém mesmo assim são critérios usados na identificação das espécies (LANE, 2002). Apesar dessas características serem muito influenciadas pelas condições de incubação e tipo de meio de cultivo, o que dificulta utilizá-las como parâmetros sistemáticos entre espécies (LANE, 2002); reveste-se de grande valia como um método rápido e relativamente fácil, podendo ser desenvolvido sem a necessidade de equipamentos sofisticados ao diagnóstico, para adoção mais rápida de medidas de controle (NECHET e ABREU, 2002). Na caracterização morfológica, tradicionalmente empregada analisa-se a pigmentação, textura, forma marginal da colônia e velocidade de crescimento micelial (PERES et al., 2003). Esses estudos

são fundamentais à identificação e conhecimento da amplitude da variabilidade existente entre isolados de um determinado patógeno bem como para o desenvolvimento de métodos de controle, seja, químico, genético ou cultural, indispensáveis ao manejo adequado da doença (TOZZE JR et al., 2006).

Ao longo do tempo *Monilinia laxa*, *M. fructigena* e *M. fructicola* tem sido diferenciadas por características morfológicas. Todavia, alguns critérios morfológicos se sobrepõem, o que torna os métodos clássicos de diagnóstico não tão seguros o bastante para serem usados em rotina (IOOS e FREY, 2000).

A identificação das espécies de *Monilinia* fundamentada em características morfológicas é complexa, pois os aspectos de colônia podem variar de isolado para isolado dentro de uma espécie (CÔTÉ et al., 2004).

Fatores como a composição do substrato, temperatura, especialmente baixas temperaturas (BARALDI et al., 2002), além de luz e umidade entre outros fatores podem determinar a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação do patógeno. O fato de um organismo crescer melhor em um substrato e não em outro, pode estar relacionado a fatores de crescimento ou algumas substâncias específicas necessários ao desenvolvimento desse patógeno (CARNAÚBA et al., 2005). Muitos estudos relacionados com a biologia e genética de fitopatógenos demandam de conhecimento e fornecimento de condições adequadas em meios artificiais; constituindo-se em pré-requisito importante, para fornecer subsídios básicos para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro (ROSA e MENEZES, 2001). Sendo que algumas espécies exibem considerável plasticidade morfológica dependente das condições culturais como subst temperatura, luz e umidade (PRYOR e MICHAILIDES, 2002).

O trabalho teve por objetivo comparar os isolados de *Monilinia fructicola* em meio de cultura através de algumas características morfológicas como: crescimento micelial, peso seco, morfologia das colônias e sensibilidade a Mancozeb e Azoxistrobina.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados de *Monilinia fructicola*

Os isolados de *Monilinia fructicola* foram obtidos de frutos e múmias de pêssegos com sintomas típicos de podridão parda, oriundos das principais regiões produtoras de pêssego do Rio Grande do Sul (Tab. 01).

**Tabela 01: Origem e procedência de isolados de *Monilinia fructicola*\*, Pelotas, UFPEL, 2007.**

Identificação dos isolados	Cultivares	Procedência
1. 1A	Aldrighi	Cascata
2. AR	Amarelo	Pelotas
3. 1AR	Amarelo	Colônia Maciel
4. ARM	Amarelo Molar	Monte Bonito
5. 1B	Bolinha	Pelotas
6. 1BM	Branco Molar	Morro Redondo
7. 2BM	Branco Molar	Caxias
8. 4BM	Branco Molar	-**
9. 5BM	Branco Molar	Canguçu
10. 6BM	Branco Molar	Monte Bonito
11. 1CD	Cardeal	Canguçu
12. 1C	Chimarrita	Colônia Maciel
13. 1CP	Chiripá	-**
14. 2CP	Chiripá	Colônia Maciel
15. 1D	Diamante	Cascata
16. 1EL	El dourado	Cascata
17. 2EL	El dourado	Canguçu
18. 1E	Esmeralda	Rincão da Caneleira
19. 2E	Esmeralda	Canguçu
20. 1G	Granada	Cascata
21. 2G	Granada	Vila Nova
22. 3G	Granada	Rincão da Caneleira

<b>Identificação dos isolados</b>	<b>Cultivares</b>	<b>Procedência</b>
23. 4G	Granada	Canguçu
24. 5G	Granada	Caxias
25. 6G	Granada	7º Distrito
26. Jade	Jade	Cascata
27. JR	Jader	Piratini
28. 2JR	Jader	Cerrito
29. 3MV	Maciel	Colônia Maciel
30. M	Molar	Colônia Maciel
31. 1M	Molar	Cascata
32. 2M	Molar	Caxias
33. 3M	Molar	Porto Alegre
34. Pit	Pit	Vila Nova
35. T	Turquesa	Rincão da Caneleira

\*Isolados de frutos e múmias de pêssegos com sintomas/ou sinais do patógeno.

\*\* Procedência não identificada.

## **2.2 Isolamento das colônias**

Estruturas fúngicas em frutos e/ou múmias com sintomas de podridão parda foram transferidos assepticamente utilizando uma alça de platina para placas de Petri contendo meio de cultura BDA<sup>®</sup> e posteriormente incubadas sob fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro à temperatura de 22°C ± 3°C durante 7 dias.

## **2.3 Crescimento micelial e caracterização morfológica de isolados de *Monilinia fructicola* em diferentes meios de cultura**

Os isolados foram cultivados em placas de Petri (9cm de diâmetro), contendo os meios de culturas testados (8mL/placa). A semeadura foi realizada no centro de cada placa colocando um disco de micélio de 8mm de diâmetro com crescimento dos fungos testados (Tab. 01).

Os meios de cultura utilizados foram: BDA<sup>®</sup> (40g de BDA e 1000mL de água destilada), Suco de Pêssego Agar (200mL de suco de pêssego, 3.0g de CaCO<sub>3</sub>,

15g de agar e 800mL de água destilada) descrito por XIAO e SITTON, (2004) e Pagnocca (10g de glucose, 5g de NaCl, 5g de peptona, 10g de extrato de levedura, 17g de agar, 20g de caseína hidrolisada, 20g de flocos de soja, 20g de flocos de aveia e 1000 mL de água destilada) descrito por SILVA-PINHATI et al. (2005).

Após, as placas foram incubadas sob fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro a uma temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . A partir de 48 horas de incubação foram realizadas avaliações da morfologia das colônias e medições diárias de crescimento linear do micélio, utilizando-se uma régua milimetrada medindo-se em sentido cruzado a área de crescimento das colônias até o primeiro isolado de cada tratamento atingir a borda da placa. Cada observação dessa variável foi oriunda da média entre duas medidas opostas (sentido cruzado) do diâmetro da colônia.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A avaliação do tipo de margem, cores e elevação das colônias foram realizadas quando o primeiro isolado atingiu a borda da placa.

Para estudo da morfologia e crescimento das colônias foram avaliadas a cor do emaranhado micelial no verso da placa de acordo com o sistema de Munsell Color Company (1954) de notação de cores; a forma, a margem e elevação da colônia, segundo classificação de CAPUCCINO e SHERMAN (1998); e o diâmetro da colônia. Para cada colônia foram anotadas todas as cores presentes e não apenas a cor predominante.

#### **2.4 Produção de micélio de *Monilinia fructicola* (peso seco) em diferentes meios de cultura**

Em erlenmeyers de 125mL contendo 50mL dos meios de cultura líquido BDA, Pagnocca e Meio de Suco de Pêssego foram colocados dois discos de 8 mm de diâmetro com crescimento dos isolados (Tab. 01) e incubados a temperatura de

22°C ± 3°C e mantidos sob agitação constante por cinco dias. Ao final do período de incubação as culturas foram filtradas em papel filtro e a massa micelial foi levada para secar em estufa a 40°C durante três dias.

Ao final desse período determinou-se o peso da massa micelial de cada isolado. O delineamento experimental utilizado foi de três meios com quatro repetições e trinta e cinco isolados. Os dados foram analisados estatisticamente pela análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## **2.5 Avaliação do crescimento micelial de isolados de *Monilinia fructicola* em meio de cultura contendo Mancozeb ou Azoxistrobina**

Na avaliação da variabilidade quanto à sensibilidade entre isolados de *M. fructicola*, a produtos químicos foram realizados testes *in vitro*, com dois princípios ativos.

Os fungicidas Azoxistrobina (Amistar®) e Mancozeb (Manzate 800®) (Tab. 02) depois de solubilizados em água destilada foram adicionados ao meio BDA® fundente (45°C), obtendo-se os substratos nas concentrações de 5 e 100ppm de ingrediente ativo.

O meio BDA® com as diferentes concentrações dos fungicidas foram vertidos em placas (8mL/placa) e posteriormente transferiu-se para o centro de cada placa um disco de 8mm de diâmetro colonizado com o micélio do fungo, crescido em meio BDA®. Em seguida as placas foram incubadas sob fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro a uma temperatura de 22°C ± 3°C. As testemunhas consistiram de discos de micélio em meio BDA® sem o fungicida.

A partir de 48 horas de incubação foram realizadas medições diárias de crescimento linear do micélio utilizando-se uma régua milimetrada. Cada observação dessa variável foi oriunda da média entre duas medidas opostas (sentido cruzado) do diâmetro da colônia até que a testemunha atingisse a borda.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições por concentração, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Os dados foram analisados estatisticamente pela análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 02: Fungicidas avaliados quanto à sensibilidade *in vitro* com isolados de *Monilinia fructicola*. Pelotas, UFPEL, 2007.**

Produto comercial	Nome técnico	Formulação	Grupo químico	Modo de atuação
Manzate 800	Mancozeb	Pó molhável	Ditiocarbamatos	Contato
Amistar	Azoxystrobina	Granulado	estrobilurina	Sistêmico

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados observados (Tab. 03) evidenciam variações de comportamento de crescimento micelial radial de micélio entre isolados e também entre os meios de cultura testados. As maiores médias de crescimento micelial radial foram registradas nos meios de culturas: Suco de Pêssego, ratificando os resultados obtidos por Tian e Bertolini (1999) com *Monilinia laxa*. Seguidos de Pagnocca e BDA<sup>®</sup>, respectivamente. Os isolados com maior média de crescimento micelial radial para o meio de Suco de Pêssego foram: 1G, 6BM, 5BM e 1A, para o meio de cultura BDA<sup>®</sup> foram os isolados: 2G, 1G, 5G e 1A e para o meio Pagnocca as maiores médias foram constatadas para os isolados: 1G, 2E, 1AR e 2M. Esses dados comprovam que os isolados comportam-se de forma distinta entre si e entre os meios de cultura testados. No entanto, um isolado como foi o caso do 1G comportou-se de forma semelhante em todos os meios de cultura. Esse fato deve-se possivelmente a condições genética dos isolados.

**Tabela03: Médias de crescimento micelial radial (cm) de isolados de *Monilinia fructicola* crescidos em meio de cultura de Suco de Pêssego, Pagnocca e BDA. Pelotas, UFPEL, 2007.**

Isolados	Suco de Pêssego	Pagnocca	BDA.
1G	8.54 A	8.23 a	6.81 Ab
6BM	8.33 Ab	5.87 fghij	3.14 mn
5BM	8.18 Abc	4.24 lm	4.30 Hijkl
1A	7.95 Abcd	3.95 m	6.38 Bc
2G	7.68 Abcde	7.02 abc	7.85 A
5G	7.65 Abcde	4.53 klm	6.83 Ab
1C	7.61 Abcde	5.44 ghijkl	5.38 cdef
JR	7.55 Bcde	6.24 cdefghij	5.50 cdef
1D	7.54 Bcde	4.58 klm	5.41 cdef
4G	7.50 Bcde	7.11 abc	6.25 bcd
1EL	7.47 Bcde	4.22 lm	3.72 klmn
1BM	7.39 Bcde	4.97 jklm	4.93 efghij
3G	7.29 Cdef	5.09 ijklm	4.95 efghij
M	7.17 Defg	6.34 cdefghi	3.13 mn
PIT	7.14 Defgh	7.33 abc	5.89 bcde
AR	7.07 defghi	5.93 efghij	3.10 mn
3MV	6.84 Efghij	6.41 cdefgh	3.92 klm
1CD	6.79 efghijk	6.57 cdefg	3.93 jklm
1B	6.41 Fghijkl	7.33 abc	5.19 efghi
1AR	6.24 Ghijkl	8.09 ab	4.52 fghijk
JADE	6.19 Hijkl	7.05 abc	5.33 defgh
T	6.12 Ijkl	7.03 abc	3.52 klmn
2M	6.08 Jklm	7.51 abc	4.96 efghi
ARM	5.99 Jklmn	6.60 cdefg	2.74 n
4BM	5.87 Klmno	6.15 defghij	3.7 klmn
2JR	5.72 Lmno	7.11 abc	5.37 cdefg
2E	5.50 Lmnop	8.26 a	5.58 cde
3M	5.48 Lmnop	6.67 cdefg	5.96 bcde
1CP	5.12 Mnop	5.45 ghijkl	5.04 efghi
1E	5.12 mnop	6.68 cdefg	5.82 bcde
2CP	5.04 Nop	5.59 ghijk	3.46 lmn
2BM	4.93 Opq	7.17 abc	5.46 cdef
1M	4.74 Pq	5.18 hijklm	4.19 ijkl
2EL	4.72 Pq	6.93 bcdef	4.33 ghijkl
6G	4.05 Q	7.09 abc	5.28 defgh

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

\*Médias expressas em cm resultantes da medida cruzada quando o primeiro isolado atingiu a borda da placa

Entretanto se for considerado a produção de massa volumétrica de micélio, na ordem os melhores tratamentos foram: Pagnocca, BDA<sup>®</sup> e Suco de Pêssego, respectivamente. Cujos dados podem ser comprovados pelo peso seco de micélio (Tab. 04), também sendo constado diferenças entre meios de cultura e isolados, isso provavelmente devido à composição do substrato.

No meio Pagnocca destacaram-se os isolados 1CP e 2BM e os isolados 3G, 3M e 2JR por produzirem maior e menor peso seco de micélio, respectivamente. Nos meios de cultura Suco de Pêssego e BDA<sup>®</sup> também houve diferenças entre isolados com destaque para 1CD e ARM, respectivamente (Tab. 04).

Nos três meios de culturas testados, os isolados de *M. fructicola* oriundos da cultivar de pêssego Granada, por razões desconhecidas, mostraram uma tendência de maior vigor das colônias, especialmente o isolado 1G. Os isolados de outras cultivares não evidenciaram nenhuma tendência específica.

Em relação ao meio de cultura BDA<sup>®</sup> também teve isolados com maior crescimento (2G, 5G, 1G e 1A) e outros com crescimento mais lento (1EL, 4BM, T, 2CP, 6BM, M, AR e ARM). Em trabalho de natureza semelhante, porém com outro organismo Pereira et al. (2006), também observaram distinção no crescimento entre isolados e atribuíram essas diferenças a diversidade na composição genética entre os isolados.

**Tabela 04: Médias do peso seco dos isolados de *Monilinia fructicola* nos meios de cultura: Pagnocca, Suco de Pêssego e BDA, Pelotas, UFPEL, 2007.**

Isolados	Pagnocca			Suco de Pêssego		BDA
1CP	2.21	a	0.35	bc	0.44	abcdef
2BM	2.18	ab	0.31	bc	0.55	abc
1C	2.05	abc	0.64	abc	0.40	abcdefg
2G	1.95	abcd	0.60	abc	0.11	ghi
T	1.78	abcde	0.40	bc	0.39	abcdefg
4G	1.75	abcde	0.27	bc	0.50	abcd
1E	1.73	abcde	0.56	bc	0.21	defghi
5G	1.71	abcde	0.48	bc	0.49	abcde
1G	1.70	abcde	0.31	bc	0.50	abcd

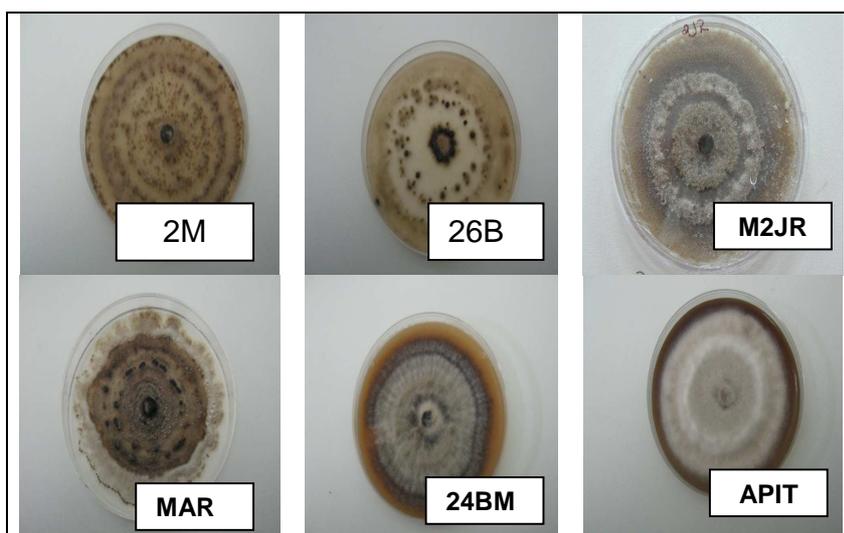
Isolados		Pagnocca		Suco de Pêssego		BDA
1AR	1.68	abcde	0.50	bc	0.27	bcdefghi
AR	1.66	abcde	0.40	bc	0.35	bcdefghi
1M	1.63	abcde	0.54	bc	0.41	abcdefg
4BM	1.59	abcde	0.37	bc	0.31	bcdefghi
ARM	1.56	abcde	0.62	abc	0.60	a
6G	1.53	abcde	0.41	bc	0.03	i
PIT	1.50	abcde	0.54	bc	0.50	abcd
1D	1.48	abcde	0.28	bc	0.45	abcdef
2CP	1.46	abcde	0.36	bc	0.44	abcdef
JR	1.42	abcde	0.30	bc	0.36	bcdefgh
2EL	1.34	abcde	0.48	bc	0.17	efghi
3MV	1.31	bcde	0.39	bc	0.58	ab
1B	1.30	cde	0.47	bc	0.04	hi
1EL	1.30	cde	0.72	ab	0.24	cdefghi
5BM	1.28	cde	0.37	bc	0.30	bcdefghi
M	1.27	cde	0.26	c	0.13	fghi
1 <sup>a</sup>	1.26	cde	0.55	bc	0.46	abcde
6BM	1.16	de	0.52	bc	0.52	abcd
2M	1.16	de	0.45	bc	0.31	bcdefghi
2E	1.16	de	0.22	c	0.06	hi
1BM	1.15	de	0.36	bc	0.29	bcdefghi
JADE	1.11	de	0.56	bc	0.57	abc
1CD	1.09	de	1.04	a	0.59	ab
3G	1.06	e	0.55	bc	0.53	abcd
3M	0.99	e	0.58	bc	0.47	abcde
2JR	0.92	e	0.54	bc	0.46	abcde

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A composição do meio de cultura também influenciou na expressão da coloração das colônias; a maior variabilidade foi registrada no meio de cultura BDA<sup>®</sup>; com tons de cinzas, pardos e oliváceos e as margens das colônias a tons mais claros como branco e amarelo (Fig. 01 e Tab. 05). Dados semelhantes foram obtidos por De Cal e Melgarejo (1999), onde a coloração de colônias de *Monilinia* spp. com meio de cultura BDA<sup>®</sup>, variou em tons de cinza, camurça e branco. Já Lane (2002), obteve coloração cinza para isolados de *Monilinia fructicola*, amarelo para *M. fructigena* e branco para *M. laxa*.

No meio de cultura de Suco de Pêssego houve pequena variação na coloração salvo os isolados 1A, 4G, 5G e 1M de cor pardo acinzentado e cinzento

rosado (Tab. 06) os demais apresentaram coloração branco rosado (Fig. 01). No meio de cultura Pagnocca a maior parte dos isolados apresentaram coloração branca com exceção dos isolados 4BM, 1C, 1CP, 6G, Jade e 2M que também apresentaram coloração cinzento claro (Fig. 01; Tab. 07).



**Fig 01: Variações dos isolados de *Monilinia fructicola* nos meios de cultura Suco de Pêssego, BDA e Pagnocca.**

Estudos realizados por Vechiato et al. (2003), com isolados de *Diaporthe* spp. atribuíram as diferenças na coloração micelial a variabilidade existente entre os isolados. Já para Pereira et al. (2006), variação nas características culturais de *Lasiodiplodia thebromae* em diferentes substratos é um indicativo que a maioria dos fungos, difere nas suas características morfológicas conforme modificações no substrato de desenvolvimento. Fato também observado por Rosa e Menezes (2001), com isolados de *Pseudocercospora musae* causador da cercosporiose da bananeira em diferentes meios de cultura testados.

Quanto à forma das colônias nos meios de cultura testados a maioria dos isolados apresentou forma circular, excetuando-se 1CD, 4G, 3MV e 1M em meio de cultura BDA<sup>®</sup> e 2CP em meio de cultura Pagnocca apresentaram também forma irregular (Tabs. 05 e 07). As margens das colônias em todos os isolados cultivados em meio de Suco de Pêssego apresentaram margem ondulada (Tab. 06) e para BDA<sup>®</sup> e Pagnocca variaram entre lobadas e onduladas (Tabs. 05 e 07). Resultados

semelhantes foram encontrados por Lane (2002), onde margem lobada e lisa foi caracterizada como *M. laxa* e margem lobada para *M. fructicola* e *M. fructigena*. Para esse autor a presença da margem da colônia lobada ajuda a identi<sup>M</sup> isolados de *M. laxa* de *M. fructicola* e *M. fructigena*.

No que se refere à topografia das colônias os isolados cultivados em meio de Suco de Pêssego apresentaram elevação plana com exceção do isolado 1CD (Tab. 06), já os isolados cultivados em meio de cultura BDA<sup>®</sup> e Pagnocca apresentaram variações entre planas e elevadas (Tabs. 05 e 07).

Variação nas características culturais também foi relatado por Couto e Menezes (2004), com isolados de *Colletotrichum musae* em meio de cultura BDA<sup>®</sup>, atribuindo que isolados da mesma espécie apresentam grande variabilidade no mesmo substrato devido ao fato de existir presença de raças fisiológicas.

Nos parâmetros avaliados (cor, margem, forma e elevação) observou-se diferença de comportamento do patógeno entre e em cada meio de cultura dependendo do isolado.

**Tabela 05: Origem dos isolados e características morfológicas das colônias de *Monilinia fructicola* cultivadas em meio de cultura BDA. Pelotas, UFPEL, 2007.**

Isolados	Cultivares	Origem	Cor	Margem	Forma	Elevação
1A	Aldrichi	Cascata	ci pa cl/ ci c/ pa ac/ pa ac mt es	lob	circ	elev/plan
AR	Amarelo	Pelotas	ci ol/ ci ol cl	ond/lob	circ	plan
1AR	Amarelo	Colônia Maciel	ci cl/ br/ am pa	lob	circ	elev
ARM	Amarelo molar	Monte Bonito	ci ol	ond	circ	plan
1B	Bolinha	Pelotas	pa ac mt es/ pa ac es/ pa ac/ ci pa cl	lob	circ	elev/plan
1BM	Branco molar	Morro Redondo	pa ac/ ci cl/ pa ac es/ ci pa cl	ond/lob	circ	elev/plan
2BM	Branco molar	Caxias	ci cl/ ci pa cl/ pa ac mt es	lob	circ	elev/plan
4BM	Branco molar	-	pa ac es/ pa ac/ ci pa cl/ ci cl	ond/lob	circ	plan
5BM	Branco molar	Canguçu	ci cl	ond/lob	circ	elev/plan
6BM	Branco molar	Monte Bonito	ci cl/ ci ol	ond/lob	circ	plan
1CD	Cardeal	Canguçu	ci ol/ pa es/ ci pa cl/ ci cl/ ci ol cl/ ol pa	ond/lob	circ/irreg	plan

Isolados	Cultivares	Origem	Cor	Margem	Forma	Elevação
1C	Chimarrita	Colônia Maciel	ci cl/ ci pa cl/ br	ond/lob	circ	elev/plan
1CP	Chiripá	-	pa ac mt es/ ci pa cl/ pa es	lob	circ	plan
2CP	Chiripá	Colônia Maciel	ci ol	ond/bol	circ	plan
1D	Diamante	Cascata	ci cl/ pa ac/ ci pa cl	lob	circ	elev/plan
1EL	El dourado	Cascata	pa ac cl/ pa ac/ pa ac es		circ	
2EL	El dourado	Canguçu	pa ac es/ pa ac/ ci pa cl/ pa ac mt es	ond/lob	circ	elev/plan
1E	Esmeralda	Rincão da Caneleira	pa ac/ ci cl/ pa ac es	lob	circ	elev/plan
2E	Esmeralda	Canguçu	pa ac mt es/ pa ac/ ci pa cl/ ci cl/ pa ac es	lob	circ	elev/plan
1G	Granada	Cascata	ci cl/ ci pa cl/ pa ac/ ol pa/ ci ol cl/ am pa	ond/lob	circ	elev/plan
2G	Granada	Vila Nova	ci pa cl/ ci cl/ pa ac/ br	ond	circ	elev
3G	Granada	Rincão da Caneleira	pa ac es/ pa ac/ ci cl/ ci pa cl	ond/lob	circ	elev/plan
4G	Granada	Canguçu	pa ac mt es/ ci cl/ pa ac/ ci pa cl/ pa ac es	ond/lob	circ/irreg	elev/plan
5G	Granada	Caxias	Pa ac/ ci pa cl/ ci cl/ ci es/ ci ol cl/ ci ol	ond	circ	elev/plan
6G	Granada	7º Distrito	ol pa/ ci cl/ pa ol	ond/lob	circ	plan
Jade	Jade	Cascata	pa ac/ ci pa cl/ ci cl/ br	lob	circ	elev/plan
1JR	Jader	Piratini	ci pa cl / ci cl/ br	ond/lob	circ	plan
2JR	Jader	Cerrito	ci cl/ ci ol/ ci me es/ pa aci mr es/ ol/ ci pa cl/ pa es	ond/lob	circ	elev/plan
3MV	Maciel	Colônia Maciel	ci cl/ ci ol cl	lob	circ/irreg	plan
M	Molar	Colônia Maciel	pa ac es/ pa ac/ ci pa cl/ ci cl	ond/lob	circ/irreg	plan
1M	Molar	Cascata	ci cl/ ol pa/ ci ol cl	ond/lob	circ	plan
2M	Molar	Caxias	pa ac mt es/ ci pa cl/ ci cl	lob	circ	elev/plan
3M	Molar	Porto Alegre	ci cl/ pa ac/ ci pa cl/ pa ac es	lob	circ	plan
Pit	Pit	Vila Nova	ci cl/ pa ac cl/ BR	ond/lob	circ	plan
T	Turquesa	Rincão da Caneleira	ci ol/ ci cl/ ci ol cl	ond/lob	circ	plan

Circ. Circular, Irreg. Irregular, Elev. Elevada, Plan. Plana. Ond. Ondulada, Lob. Lobada, Am pa. Amarelo pálido, Br. Branco, Ci cl. Cinzento claro. Ci pa cl. Cinzento pardacento claro, Ci ol. Cinzento oliváceo. Ci ol cl. Cinzento oliváceo claro, Pa ac. Pardo acinzentado. Pa ac es. Pardo acinzentado escuro, Pa ac mt es. Pardo acinzentado muito escuro. Ol. Oliváceo, Ol pa. Oliváceo pálido.

**Tabela 06: Origem dos isolados e características morfológicas das colônias de *Monilinia fructicola* cultivadas em meio de cultura Suco de Pêssego. Pelotas, UFPEL, 2007.**

Isolados	Cultivares	Origem	Cor	Margem	Forma	Elevação
1ª	Aldrighi	Cascata	br ro/pa ac/ci ro	ond	circ	plan
AR	Amarelo	Pelotas	br ro	ond	circ	plan

Isolados	Cultivares	Origem	Cor	Margem	Forma	Elevação
1AR	Amarelo	Colônia Maciel	br ro	ond	circ	plan
ARM	Amarelo molar	Monte Bonito	br ro	ond	circ	plan
	Bolinha	Pelotas	br ro	ond	circ	plan
1B						
1BM	Branco molar	Morro Redondo	br ro	ond	circ	plan
2BM	Branco molar	Caxias	br ro	ond	circ	plan
4BM	Branco molar	-	br ro	ond	circ	plan
5BM	Branco molar	Canguçu	br ro	ond	circ	plan
6BM	Branco molar	Monte Bonito	br ro	ond	circ	plan
1CD	Cardeal	Canguçu	br ro	ond	circ	elev/plan
1C	Chimarrita	Colônia Maciel	br ro	ond	circ	plan
1CP	Chiripá	-	br ro	ond	circ	plan
2CP	Chiripá	Colônia Maciel	br ro	ond	circ	plan
1D	Diamante	Cascata	br ro	ond	circ	plan
1EL	El dourado	Cascata	br ro	ond	circ	plan
2EL	El dourado	Canguçu	br ro	ond	circ	plan
1E	Esmeralda	Rincão da Caneleira	br ro	ond	circ	plan
2E	Esmeralda	Canguçu	br ro	ond	circ	plan
1G	Granada	Cascata	br ro	ond	circ	plan
2G	Granada	Vila Nova	br ro		circ	plan
				ond		
3G	Granada	Rincão da Caneleira	br ro	ond	circ	plan
4G	Granada	Canguçu	br ro/pa ac	ond	circ	plan
5G	Granada	Caxias	br ro/pa ac	ond	circ	plan
6G	Granada	7º Distrito	br ro	ond	circ	plan
Jade	Jade	Cascata	br ro	ond	circ	plan
1JR	Jader	Piratini	br ro	ond	circ	plan
2JR	Jader	Cerrito	br ro	ond	circ	plan
3MV	Maciel	Colônia Maciel	br ro	ond	circ	plan
M	Molar	Colônia Maciel	br ro	ond	circ	plan
1M	Molar	Cascata	br ro/pa ac	ond	circ	plan
2M	Molar	Caxias	br ro	ond	circ	plan
3M	Molar	Porto Alegre	br ro	ond	circ	plan
Pit	Pit	Vila Nova	br ro	ond	circ	plan
T	Turquesa	Rincão da Caneleira	br ro	ond	circ	plan

Circ. Circular, Irreg. Irregular. Elev. Elevada, Plan. Plana. Ond. Ondulada, Lob. Lobada. Br ro. Branco rosado, Pa ac. Pardo acinzentado, Ci ro. Cinzento rosado

**Tabela 07: Origem dos isolados e características morfológicas das colônias de *Monilinia fructicola* cultivadas em meio de Pagnocca. Pelotas, UFPEL, 2007.**

Isolados	Cultivares	Origem	Cor	Margem	Forma	Elevação
1 <sup>a</sup>	Aldrighi	Cascata	br	ond	circ	Plan
AR	Amarelo	Pelotas	br	ond	circ	elev/plan
1AR	Amarelo	Colônia Maciel	br	ond	circ	elev/plan
ARM	Amarelo molar	Monte Bonito	br	ond	circ	Plan
1B	Bolinha	Pelotas	br	ond	circ	elev/plan

Isolados	Cultivares	Origem	Cor	Margem	Forma	Elevação
1BM	Branco molar	Morro Redondo	br	ond	circ	elev/plan
2BM	Branco molar	Caxias	br	ond	circ	elev/plan
4BM	Branco molar	-	br/ci cl	ond	circ	elev/plan
5BM	Branco molar	Canguçu	br	ond	circ	elev/plan/umb
6BM	Branco molar	Monte Bonito	br	ond	circ	elev/plan
1CD	Cardeal	Canguçu	br	ond	circ	elev/plan
1C	Chimarrita	Colônia Maciel	br/ci cl	ond	circ	elev/plan
1CP	Chiripá	-	ci/ ci cl	ond	circ	Plan
2CP	Chiripá	Colônia Maciel	ci cl	ond	circ/irreg	Plan
1D	Diamante	Cascata	br	ond/lob	circ	elev/plan
1EL	El dourado	Cascata	br	ond	circ	Plan
2EL	El dourado	Canguçu	br	ond	circ	Plan
1E	Esmeralda	Rincão da Caneleira	br	ond	circ	Plan
2E	Esmeralda	Canguçu	br	ond	circ	Elev
1G	Granada	Cascata	br	ond	circ	elev/plan
2G	Granada	Vila Nova	br	ond	circ	elev/plan
3G	Granada	Rincão da Caneleira	br	ond	circ	elev/plan
4G	Granada	Canguçu	br	ond	circ	Plan
5G	Granada	Caxias	br	ond	circ	Plan
6G	Granada	7º Distrito	br/ci cl	ond	circ	elev/plan
Jade	Jade	Cascata	br/ci cl	ond	circ	elev/plan
1JR	Jader	Piratini	br	ond	circ	Plan
2JR	Jader	Cerrito	br	ond	circ	elev/plan
3MV	Maciel	Colônia Maciel	br	ond	circ	elev/plan
M	Molar	Colônia Maciel	br	ond	circ	elev/plan
1M	Molar	Cascata	br	ond	circ	Plan
2M	Molar	Caxias	br/ ci cl	ond	circ	Plan
3M	Molar	Porto Alegre	br	ond	circ	elev/plan
Pit	Pit	Vila Nova	br	ond	circ	elev/plan

Isolados	Cultivares	Origem	Cor	Margem	Forma	Elevação
T	Turquesa	Rincão da Caneleira	br	ond	circ	elev/plan

Circ. Circular, Irreg. Irregular. Elev. Elevada, Plan. Plana, Umb. Umbonada. Ond. Ondulada, Lob. Lobada. Br ro. Branco Ci cl. Cinzento claro.

Quanto à sensibilidade a substâncias fungicidas os isolados testados mostraram diferentes comportamentos aos princípios ativos Mancozeb e Azoxistrobina incorporados ao substrato BDA<sup>®</sup> (Tabs. 08 e 09). Na concentração de 5ppm de Mancozeb os isolados com maior inibição do crescimento micelial foram: 1M, ARM e 2M e com Azoxistrobina os isolados 3MV, 1D, 1JR, 2JR, 1EL, 5BM, ARM, 2M e 1G. DILL (2006), observou paralelamente redução no crescimento micelial de *M. fructicola* com baixas concentrações de Azoxistrobina, possivelmente pelo fato de se tratar de um fungicida mais recente onde houve menor pressão de seleção em função do tempo de sua utilização. Fato também relatado por MOREIRA (2005) para *Trichothecium roseum* e para *Colletotrichum gloeosporioides* causador da antracnose do mamão por TAVARES e SOUZA (2005).

As maiores doses dos princípios ativos mostraram maior eficiência em inibir o crescimento em maior número de isolados. Com 100ppm de princípio ativo no meio de cultura apenas os isolados 2CP, 1M, 1BM, 5BM, 6G e 4G tiveram o crescimento inibido por Mancozeb e os isolados 2CP e 2JR por Azoxistrobina (Tabs. 08 e 09). Resultado semelhante foi obtido por DILL (2006) com Azoxistrobina o qual inibiu completamente o crescimento micelial de isolados de *M. fructicola*. Estudos realizados por MOREIRA (2005) também constatou inibição do crescimento micelial de isolados de *Trichothecium roseum* com os princípios ativos Mancozeb e Azoxistrobina.

**Tabela 08: Médias de sensibilidade do crescimento micelial de isolados de *Monilinia fructicola* em meio de cultura BDA com o princípio ativo Manzeb. Pelotas, UFPEL, 2007.**

Isolados	Manzeb 100ppm	Manzeb 5ppm
5G	3.61 a	5.03 a
6BM	3.51 ab	3.9 abcde
2G	3.28 ab	3.88abcde
1C	3.20 ab	3.47 abcde
AR	2.97 ab	4.06 abcde
3G	2.85 abc	3.52 abcde
JADE	2.85 abc	2.90 abcde
2BM	2.82 abc	3.77 abcde
2E	2.73 abc	3.60 abcde
M	2.68 abc	3.66 abcde
1 A	2.66 abc	4.37 abcd
1EL	2.56 abc	3.84 abcde
1D	2.48 abc	3.10 abcde
2M	2.37 abc	1.83 e
1E	2.35 abc	3.61 abcde
T	2.18 abc	3.69 abcde
1G	2.10 abc	3.28 abcde
1CD	2.06 abc	3.79 abcde
4BM	1.90 abc	3.75 abcde
JR	1.59 abc	3.29 abcde
2JR	1.56 abc	4.63 abc
2EL	1.55 abc	2.79 abcde
1CP	1.27 abc	3.15 abcde
3MV	0.95 abc	4.81 ab
1B	0.87 abc	4.12 abcd
1AR	0.86 abc	3.56 abcde
PIT	0.48 bc	4.07 abcd
3M	0.45 bc	3.40 abcde
ARM	0.40 bc	2.37 de
2CP	0 c	3.17 abcde
1M	0 c	2.53 cde
1BM	0 c	2.84 abcde
5BM	0 c	2.74 bcde
6G	0 c	3.20 abcde
4G	0 c	3.71 abcde

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

\*Médias expressas em cm resultantes da medida cruzada quando a testemunha atingiu a borda da placa

**Tabela 09: Médias de sensibilidade do crescimento micelial de isolados de *Monilinia fructicola* em meio de cultura BDA com o princípio ativo Azoxistrobina. Pelotas, UFPEL, 2007.**

<b>Isolados</b>	<b>Azoxistrobina 100ppm</b>	<b>Azoxistrobina 5ppm</b>
1 <sup>a</sup>	3.61 a	3.59 abcd
2BM	3.33 ab	4.83 ab
4G	3.09 abc	3.58 abcd
2E	3.03 abcd	3.00 bcde
1C	2.91 abcd	2.82 abcd
1G	2.91abcd	0 f
2EL	2.73 abcd	2.94 bcde
PIT	2.47 abcde	3.97 abc
5G	2.41 abcde	3.41 abcde
T	2.39 abcde	3.62 abcd
M	2.38 abcde	2.87 bcde
4BM	2.23 abcde	2.48 bcde
1CD	2.22 abcde	3.48 abcd
1BM	2.21 abcde	3.28 abcde
3G	2.20 abcde	3.43 abcde
1B	2.17 abcde	2.61 bcde
1CP	2.10 abcde	3.11 bcde
1D	2.09 abcde	2.37 cdef
2JR	2.01 abcde	1.84 cdef
1E	1.85 abcde	2.83 bcde
1M	1.77 abcde	3.81 abcd
3M	1.73 abcde	5.72 a
ARM	1.69 abcde	1.38 def
1AR	1.68 abcde	4.01 abc
2G	1.54 abcde	2.95 bcde
3MV	1.46 abcde	2.37 cdef
6BM	1.14 abcde	3.16 bcde
6G	0.99 abcde	2.94 bcde
AR	0.86 bcde	3.11 bcde
5BM	0.76 bcde	1.61 cdef
2M	0.66 cde	0.98 ef
JADE	0.60 cde	3.96 abc
1EL	0.40 de	1.63 cdef
2CP	0 e	3.13 bcde
JR	0 e	2.02 cdef

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

\*Médias expressas em cm resultantes da medida cruzada quando a testemunha atingiu a borda da placa.

#### **4. Conclusões**

Há variabilidade no crescimento micelial em função da composição do meio e também quanto aos isolados;

Não há correspondência entre velocidade de crescimento radial e peso seco de micélio;

Há ampla variabilidade nas características morfológicas entre isolados de *M. fructicola* o que dificulta sua utilização na sistemática da espécie;

Os isolados respondem de forma diferente a doses de princípios ativos dos fungicidas Azoxistrobina e Mancozeb.

## **5. Conclusões Gerais**

Os isolados de *Monilinia fructicola* coletados na região Sul do Rio Grande do Sul apresentaram ampla variabilidade nas características morfológicas estudadas.

A técnica molecular de PCR é um método relativamente rápido e prático para identificação de fitopatógenos.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BARALDI, E.; BERTOLINI, P.; CHIERICI, E.; TRUFELLI, B.; LUISELLI, D. Genetic diversity between *Botrytis cinerea* isolates from unstored and cold stored kiwi fruit. **J. Phytopathology**. v.150, p.629–635, 2002.

BALARDIN, R.S.; BALARDIN, C.R.R.; CHAVES, L.C.S. Eficiência de fungicidas e diferentes doses no controle de *Monilinia fructicola* (Wint) sobre frutos do pessegueiro (*Prunus persicae* var. *Vulgaris*), em pós-colheita. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.1, p.15–17, 1994.

BLEICHER, J. Doenças de rosáceas de caroço. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN, F.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. ed. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1997. p.621-627.

BOEHM, E.W.A.; MA, Z.; MICHAILIDES, T.J. Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. **Phytopathology**. v.91, n.5, p.428-439, 2001.

BRUNELLI, K.R.; ***Cercospora zae-maydis*: esporulação, diversidade morfo-genética e reações de linhagens de milho**. Piracicaba, 2004. 105p. Tese (Doutorado em Agronomia) Setor de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

CAPUCCINO, J.G.; SHERMAN, N. **Microbiology: a laboratory manual**. 5. ed. New York: Benjamin/Cummings. 1998. 477p.

CARNAÚBA, J.P.; SOBRAL, M.F.; PEIXOTO, E.da R.A.; SILVA, J.C.; BORGES, V.; FÉLIX, K. C. da S. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*, agente causal da podridão negra da mandioca. In: XI Congresso Brasileiro de Mandioca, 2005, Campo Grande. **Anais do...** Campo Grande. 2005.

CÔTÉ, M-J.; TARDIF, M-C.; MELDRUM, A.J. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *M. polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. **Plant Disease**. v.88, n.11, p.1219-1225, 2004.

COUTO, F.E.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, n.4, p.406-412, 2004.

DAI, Q.; SUN, Z.; SCHNABEL, G. Development of spontaneous hygromycin B resistance in *Monilinia fructicola* and its impact on growth rate, morphology, susceptibility to demethylation inhibitor fungicides, and sporulation. **Phytopathology**. v.93, n.11, p.1354-1359, 2003.

DE CAL, A.; MELGAREJO, P. Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. **Plant Disease**. v.83, n.1, p.62-65, 1999.

DI CASTRI, F.; YONES, T. Ecosystem function and biological diversity. **Biology International**, Paris, n.22, 1990. Special issue.

DILL, A.M. Avaliação de resistência de *Monilinia fructicola* aos grupos de fungicidas dicarboximidas, benzimidazóis e estrubilurinas. In: 14º EVINCI, 2006, Paraná. Anais do... Paraná. 2006.

FERREIRA, L.F.R. **Diversidade genética de isolados polispóricos de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer**. Piracicaba, 2005. 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Setor de Microbiologia e Biotecnologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220p.

FIGUEIREDO, J.E.F.; QUINTÃO, P.L.; PAOLI, H.C.; COELHO, V.T. da S.; BRESSAN, W.; GUIMARÃES, C. T.; GOMES, E. A. **Caracterização molecular de microrganismos isolados do ecossistema agrícola do Cerrado: I- Bactérias endofíticas do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 10p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico 66).

FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, E. Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. **Phytopathology**. v. 90, n. 2, p. 171-178, 2000.

FULTON, C.E.; BROWN, A.E. Use of SSU rDNA group-I to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. **FEMS Microbiology Letters**. v.157, p.307-312, 1997.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia e Desenvolvimento**. v.3, n.14, p.12-16, 2000.

GARRIDO, L. da R.; SÔNEGO, O.R. **Doenças do pessegueiro na Região da Serra Gaúcha**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 11p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica 61).

GELL, I.; LARENA, I.; MELGAREJO, P. Genetic diversity in *Monilinia laxa* populations in peach orchards in Spain. **J. Phytopathology**. v.155, n.9, p.549-556, 2007.

GOMES, F.R.C. **Qualidade da fruta e do solo em pomares de pessegueiro manejados com aveia-preta**. Pelotas, 2003. 100f. Tese (Doutorado em Ciências).

Fruticultura de Clima Temperado. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. UFPEL, 2003.

HOLTZ, B.A.; MICHAILIDES, T.J.; HONG, C.X. Development of apothecia from stone fruit infected and stromatized by *Monilinia fructicola* in California. **Plant Disease**. v.82, n.12, p.1375-1380, 1998.

HONG, C.; MICHAILIDES, T.J.; HOLTZ, B.A. Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. **Plant Disease**. v.82, n.11, p.1210-1216, 1998.

IOOS, R.; FREY, P. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. **European Journal of Plant Pathology**. v.106, p.373-378, 2000.

JULIATTI, F.C.; NETO SILVA, C.C.; GIOVANINI, M.P.; GOULART, L.R.; JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.C. Agressividade e divergência genética por RAPD de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* coletados em lavouras cafeeiras de Minas Gerais. **Biosci. J.** v.22, n.2, p.159-169, 2006.

LANE, C.R.A Synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. **PP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**. n.32, p.489-493, 2002.

LUO, Y.; MORGAN, D.P.; MICHAILIDES, T.J. Risk analysis of rot blossom blight of prune caused by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**. v.91, n.8, p.759-768, 2001.

MA, Z.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J. Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. **J. Phytopathology**. v. 151, n. 6, p. 312-322, 2003.

MALVÁREZ, G.; RODRÍGUEZ, A.; AGUILAR, C.; SILVERA, E.; MONDINO, P. Identificación de especies de *Monilinia* spp., en aislamientos obtenidos de *Prunus* spp. por PCR con *primers* específicos. **Agrociencia**. v.5, n.1, p.48-53, 2001.

MONTEIRO, L.B.; MAY DE MIO, L.L.; SERRAT, B.M.; MOTTA, A.C.V.; CUQUEL, F.L. **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: UFPR, 2004. 309p.

MOREIRA, L.M. **Alternativas de controle integrado da podridão parda do pessegueiro**. Curitiba, 2005. 129f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

MUNSELL COLOR COMPANY. **Munsell soil color charts**. Baltimore, 1954. 34p.

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

NOZAKI, M.H.; CAMARGO, M.; LEMOS, E.G.M.; AUKAR, A.P.A.; BARRETO, M. Caracterização molecular através da técnica AFLP de isolados de *Diaporthe citri*. **Summa Phytopathologica.** v.32, n.2, p.147-150, 2006.

NUNES, J.L.S.; GUERRA, D.S.; ZANINI, C.; GRASSELLI, V.; ARGENTA, F.; FACCHIN, H.; MARODIN, G.A.B. Produção integrada e convencional de pêssegos cv. Marli. **Revista Brasileira de Fruticultura.** v.26, n.3, p.478-481, 2004.

OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIGGS, A.R. Part I. Infectious diseases, diseases caused by fungi. In: OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIRDE, G.W.; RITCHIE, D.F.; URIU, K.; UYEMOTO, J.K. ed. **Compendium of stone fruit diseases.** St. Paul, 1995. p.7-10.

PEREIRA, A.L., SILVA, G.S.; RIBEIRO, V.Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira.** v.31, n.6, p.572-578, 2006.

PERES, A. P.; MANN-SILVA, R.; VIEIRA, M. das G. G. C.; MACHADO, J. da C. Variabilidade morfocultural e genética de fungos associados a podridão peduncular do mamão. **Ciênc. Agrotec.** v. 27, n. 5, p. 1053-1062, 2003.

PRYOR, B.M.; MICHAILIDES, T.J. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. **Phytopathology.** v.92, n.4, p.406-416, 2002.

**Produtores de pêssego buscam tecnologia na Serra: fruticultores da fruta in natura visitam Pinto Bandeira**, 2006. Disponível em: <<http://www.sebrae-rs.com.br/>> Acessado em: 01 março de 2007.

PROTAS, J.F.S.; MADAIL, J.C.M. **Sistema de produção de pêssego de mesa na Região da Serra Gaúcha**, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/>> Acessado em: 31julho de 2007.

ROSA, R.C.T.; MENEZES, M. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*. **Fitopatologia Brasileira.** v.26, n.1, p.141-147, 2001.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; BACCI, JR.M.; SIQUEIRA, C.G.; SILVA, A.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. **Neotropical Entomology.** v.34, n.1, p.001-005, 2005.

SOUZA, A.L.B.; CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B.; MACHADO J. da C. Resistência pós-colheita do pêssego (*Prunus persica* cv. Biuti) a *Monilinia*

*fructicola*: indução de respostas bioquímicas pela aplicação de CaCl<sub>2</sub> no local da injúria. **Ciênc. e agrotec.** v.23, n.4, p.864-874, 1999.

SUSSEL, A.A.B. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose das cucurbitáceas.** Piracicaba, 2005. 68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Setor de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

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

TERAO, D.; OLIVEIRA, S.M.A.; VIANA, F.M.P.; ROSSETTI, A.G.; SOUZA, C.C.M.; Integração de fungicidas à refrigeração no controle de podridão em frutos de meloeiro. **Fitopatologia Brasileira.** v.3, n.1, p.1089-1093, 2006.

TIAN, S.P.; BERTOLINI, P. Effect of temperature during conidial formation of *Monilinia laxa* on conidial size, germination and infection of stored nectarines. **J. Phytopathology.** v.147, p.635-641, 1999.

TOZZE JR., H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JR., N.S. Caracterização Morfológica e Fisiológica de Isolados de *Colletotrichum* sp. Causadores de Antracnose em Solanáceas. **Summa Phytopathologica.** v.32, n.1, p.71-79, 2006.

VECHIATO, M.H.; MARINGONI, A.C.; MARTINS, E.M . F.; KOHARA, E.Y.; Caracterização de isolados de *Diaporthe* spp. e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. **Arquivos do Instituto Biológico.** v.70, n.2, p.159-167, 2003.

XIAO, C.L.; SITTON, J.W. Effects of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Potrebniomyces pyri*. **Mycological Research.** v.108, n.8, p. 926–932, 2004.