

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Phytophthora citrophthora* (RE Sm. & EH Sm.)
Leonian EM CITROS**

MARIA THIÊTA BRANDÃO LOBÃO TORRES

CRUZ DAS ALMAS-BA
2018

MARIA THIÊTA BRANDÃO LOBÃO TORRES

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Phytophthora citrophthora* (RE Sm. & EH Sm.)
Leonian EM CITROS**

Trabalho de conclusão submetido
ao Colegiado de Graduação de
Engenharia Florestal do Centro de
Ciências Agrárias, Ambientais e
Biológicas da Universidade
Federal do Recôncavo da Bahia
como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheiro
Florestal.

Orientador: Carlos Augusto Dórea Bragança

Co-orientador: Hermes Peixoto dos Santos Filho

CRUZ DAS ALMAS – BA
2018

CRUZ DAS ALMAS – BA
2018
MARIA THIÊTA BRANDÃO LOBÃO TORRES

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Phytophthora citrophthora* (RE Sm. & EH Sm.)
Leonian EM CITROS**

Trabalho de conclusão submetido ao Colegiado de Graduação de Engenharia Florestal do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Aprovado em 07 / fevereiro / 2018

BANCA EXAMINADORA

Maria Gardenny Ribeiro Pimenta

Maria Gardenny Ribeiro Pimenta - UFRB

Carolina Yamamoto Santos

Carolina Yamamoto Santos – UFRB

Bragança

Orientador - Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança -UFRB

CRUZ DAS ALMAS – BA
2018

Dedico este trabalho a minha querida e amada irmã, Maria Helena Brandão Lobão Neta, por ter sido exemplo de amor e luta!

AGRADECIMENTOS

- Ao pesquisador e orientador Dr. Hermes Peixoto dos Santos Filho, pela oportunidade e ensinamentos, sendo exemplo de sabedoria e doçura, sendo essencial em minha formação.
- Ao meu orientador de TCC Carlos Augusto Dórea de Bragança e ao estatístico da EMBRAPA Carlo Lêdo pelo apoio, ensinamentos e colaboração para execução do trabalho.
- A Paulo e Leandro que estiveram presentes em todos os dias de laboratórios trazendo muitos ensinamentos, sabedoria, amizade.
- A Uiara Sousa por ter sido amiga, companheira de pesquisa, não medindo esforços para alcançarmos nosso objetivo.
- Aos funcionários, pesquisadores, colegas e aos amigos de EMBRAPA por toda ajuda e apoio durante todos os dias, vocês foram grande alicerce durante essa jornada.
- A minha mãe Sandra Marcia Brandão Lobão Torres por ter sido guerreira em toda vida, não medindo esforços para me fazer feliz, e ao meu pai por ter está ao meu lado durante está jornada que agora se finda.
- As minhas irmãs Talita e Helena por terem dividido comigo desde a infância todo amor e amizade que pude ter, vocês fizeram com que esse sonho se realizasse.
- A Agenor pelo carinho e companheirismo todos os dias, me apoiando em todos os momentos.
- A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo acolhimento e todos os professores e funcionários que sempre estiveram disponíveis para passar toda a sabedoria.
- A todos os colegas de faculdade que junto comigo estiveram presentes nesta jornada. E as amigas que me fortaleceram nesta jornada: Camilo, Jessica, Verena, Rafaela, Nayara. Vocês fizeram meus dias mais felizes, dividindo comigo suas alegrias.
- A CNPQ, FAPESB E EMBRAPA que me apoiaram em minha pesquisa.

Nunca caminhei sozinha, obrigada!

RESUMO

A Citricultura tem alcançado destaque na economia brasileira. Os citros (*Citrus* spp.) estão entre as fruteiras mais plantadas, consumidas e pesquisadas no mundo. Porém o que tem interferido na sua produção são as doenças que afetam a cultura e, entre as principais doenças está a Gomose dos Citros. O objetivo deste trabalho foi selecionar um método eficiente de inoculação para estudos de resistência e susceptibilidade de porta-enxertos a esta doença. Neste caso presente diferentes métodos de inoculação de *Phytophthora citrophthora* foram testados sobre dois porta-enxertos: Limoeiro Siciliano (*Citrus lemon*) sabidamente susceptível ao patógeno e Poncírus (*Poncirus trifoliata* 'Kryder') considerado mais resistente que o anterior. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura situado no município de Cruz das Almas-BA. Os métodos utilizados foram: inoculação com gotas da suspensão de zoósporos em ramos, inoculação por disco de micélio em ramos, inoculação por imersão de ramos destacados em suspensão de zoósporos durante 20, 40 e 60 minutos, inoculação de suspensão de zoósporo em folhas com ferimento causado por abrasivo e sem ferimento nas faces abaxial e adaxial, inoculação de disco de micélio em folhas com ferimento causado por abrasivo e sem ferimento nas faces abaxial e adaxial. As avaliações foram feitas utilizando o programa Assess medindo o tamanho da lesão e posteriormente submetido à análise de variância (ANOVA), a fim de verificar a existência de diferenças significativas pelo teste F e teste de Scott-Knott entre as inoculações. Para as metodologias envolvendo folhas a avaliação foi feita usando análise fatorial multivariada. A partir dos resultados foi possível escolher um método eficiente para testes de resistência de materiais cítricos à Gomose em curto período de tempo e baixo custo. Os melhores resultados foram obtidos nas inoculações de *P. citrophthora* por meio da inserção de disco de meio de cultura contendo o patógeno em ramos destacados, método que pode ser utilizado em inoculações de plantas de Citros em diferentes fases de desenvolvimento. Por permitir a avaliação de genótipos com partes destacadas das plantas em curto espaço de tempo, a metodologia pode se constituir em ferramenta auxiliar para programas de melhoramento genético de Citros.

Palavras-chave: *Poncirus trifoliata*; limoeiro 'Siciliano'; *Citrus lemon*, Gomose

ABSTRAT

Citricultura has achieved prominence in the Brazilian economy. Citrus (Citrus spp.) Are among the most planted, consumed and researched fruit trees in the world. But what has interfered in its production are the diseases that affect the culture and, among the main diseases is Citrus Gum. The objective of this work was to select an efficient method of inoculation for studies of resistance and susceptibility of rootstocks to this disease. In this case present different methods of inoculation of Phytophthora citrophthora were tested on two rootstocks: Sicilian lemon tree (Citrus lemon) known to be susceptible to the pathogen and Poncirus (Poncirus trifoliata 'Kryder') considered more resistant than the previous one. The methods used were: inoculation with drops of the zoospore suspension in the branches, inoculation by mycelial disk in branches, inoculation by immersion of detached branches in suspension of zoospores for 20, 40 and 60 minutes, inoculation of zoospore suspension in leaves with wound caused by abrasive and without injury on the abaxial and adaxial surfaces, inoculation of mycelium disc on leaves with abrasive injury and without injury on the abaxial and adaxial surfaces. The work was developed in the Laboratory of Phytopathology of Embrapa Mandioca and Fruticultura located in the municipality of Cruz das Almas-BA. The evaluations were done using the Assess program measuring the size of the lesion and later submitted to analysis of variance (ANOVA), in order to verify the existence of significant differences by the F test and Scott-Knott test between inoculations. For methodologies involving leaves the evaluation was done using multivariate factorial analysis. From the results it was possible to choose an efficient method for tests of resistance of citrus materials to Gomose in a short period of time and at low cost. The best results were obtained in inoculations of P. citrophthora by means of disc insertion of culture medium containing the pathogen in detached branches, a method that can be used in inoculations of Citrus plants at different stages of development. By allowing the evaluation of genotypes with highlighted parts of the plants in a short time, the methodology can be an auxiliary tool for genetic breeding programs of Citrus.

Keywords: *Poncirus trifoliata; lemon tree 'Siciliano'; Gomose, Citrus lemon*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedência dos isolados de <i>Phytophthora citrophthora</i>	21
Tabela 2 - Médias das lesões nos diferentes métodos de inoculação de <i>P. citrophthora</i> em limoeiro 'Siciliano' e <i>P. trifoliata</i> em ramos.....	28
Tabela 3 - Médias das lesões dos métodos de inoculação de disco de micélio e Suspensão de zoósporo em ramos.....	29
Tabela 4 - Médias das lesões obtidas do resultado da interação de quatro fatores: Porta Enxerto (Siciliano e Poncirus); Lado da folha (Abaxial e Adaxial); Método de inoculação (Com ferimento e sem ferimento) e TI (Disco e Suspensão).	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-**Ciclo de vida da doença *Phytophthora* (ERWIN & RIBEIRO, 1996).....18
- Figura 2-** Obtenção da Suspensão: **A-** Placa de Petri contendo meio cenoura-ágar. **B-** Representação das etapas de obtenção da suspensão. **C-** Suspensão de *Phytophthora citrophthora*.23
- Figura 3-** Representação esquemática dos passos inoculação em ramos: **A-** Ramo com ferimento causado pelo furador, **B-** suspensão de *Phytophthora citrophthora*. **C-** placa contendo os discos de micelio para inoculação. **D-** Ramos após a inoculação24
- Figura 4-** Imersão em ramos. **A-** Ramos de *Poncirus Trifoliata* **B-** Ramos imersos em suspensão de *Phytophthora citrophthora* e os tempos correspondentes a imersão.....25
- Figura 5-** Inoculação em folhas utilizando abrasivo: **A-** abrasivo sendo friccionado sobre a folha. **B-** Abrasivo sendo removido em um becker com água. **C-** Suspensão sendo inoculada na folha. **D-** Disco de micélio sendo inoculado sobre a folha.27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. CITROS	14
2.2. <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Kryder’	15
2.3. LIMOEIRO ‘SICILIANO’	16
2.4. GÊNERO <i>Phytophthora</i>	17
2.5. A GOMOSE DOS CITROS	18
2.6. MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE <i>Phytophthora</i> spp.	19
3. OBJETIVO.....	20
4.1. OBTENÇÃO DO ISOLADO.....	21
4.2. TESTE DE PATOGENICIDADE	21
4.3. ISOLAMENTO DO PATÓGENO	22
4.4. OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO	22
4.5. MATERIAL VEGETAL USADO NO ENSAIO.....	23
4.6. INOCULAÇÕES EM RAMOS DESTACADOS DA PLANTA	23
4.6.1. Inoculação por meio de Disco de Micélio	24
4.6.2. Inoculação de Suspensão de Zoósporos.....	24
4.6.3. Inoculação por Imersão de Suspensão de Zoósporos	24
4.6.4. Avaliação	25
4.7. INOCULAÇÕES NAS FOLHAS	25
4.7.1. Inoculação com Suspensão de Zoósporo em Folhas com ferimento causado por abrasivo nas faces adaxial e abaxial	26
4.7.2. Inoculação com suspensão de zoósporo sem ferimento nas faces abaxial e adaxial	26
4.7.3. Inoculação de Disco de Micélio em Folhas com Ferimento Causado por Abrasivo.	26
4.7.4. Inoculação com disco de micélio, sem ferimento, nas partes abaxial e adaxial	27
4.7.5. Avaliação em Folhas	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28

6. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a citricultura é uma das mais importantes atividades do agronegócio, sendo o país maior produtor mundial de citros, com destaque para a produção de laranjas que em 2015 apresentava 665.174 ha de área colhida correspondendo a um volume de 16.746.247 toneladas de frutos, segundo dados do IBGE. O país também lidera a exportação de suco concentrado e derivados equivalente em cerca de 50% do total da produção mundial, registrando 31.086.047 kg de suco para exportação e gerando receita de 12.316.635 dólares em 2016 (CARVALHO, 2017).

Embora a Citricultura tenha se destacado na economia brasileira, o grande número de doenças limita ganhos na produtividade. Entre as principais doenças que afetam a planta cítrica a Gomose, causada por *Phytophthora* spp. é considerada uma das mais importantes doenças da cultura (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Apesar de existir uma grande quantidade de espécies cítricas, há limitação de variedades que possam ser utilizadas como porta-enxerto, o que torna a cultura vulnerável ao surgimento de pragas e doenças já que a base genética fica bastante limitada (OLIVEIRA et al., 2014). Associada à presença de outras doenças muito graves e as mudanças climáticas a cultura torna-se ameaçada e as cultivares têm o seu desenvolvimento afetado o que interfere drasticamente nos índices de produção (NEVES et al., 2010).

Os sintomas da Gomose de Citros são caracterizados pela exsudação de uma goma, resultante de transformações internas dos tecidos da planta atacados pelo patógeno que pode afetar diversos tecidos da planta principalmente da parte basal do tronco e das raízes onde ocorrem mais frequentemente as lesões. Com os tecidos condutores de seiva destruídos, a interrupção da passagem da seiva ocasiona sintomas reflexos na parte aérea como intenso amarelecimento das folhas e podridão seca de cloração marrom nos tecidos da casca e do lenho, podendo causar a morte da planta adulta. O ataque pode se dá também na fase de viveiro, com sintomas de tombamento da parte aérea das plântulas recém emergidas. A ocorrência em frutos, principalmente os que se encontram próximos ao solo, se dar por respingos de chuva ou água de irrigação, afetando também precocemente as sementes (ROSSETTI, 1947).

O estudo das doenças provocadas por *Phytophthora* spp. em citros está intimamente ligado ao estudo do porta-enxerto, já que o agente causador da doença, que se encontra no solo, age sobre as raízes e o colo dos porta-enxertos (SIVIEIRO, 2001). A utilização de porta-

enxertos resistentes é uma ótima alternativa de controle, visto que minimiza gastos com outros métodos mais caros e mais ofensivos à natureza.

O limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) é um dos portas-enxertos mais utilizados pela citricultura, porém é menos resistente à infecção de *Phytophthora* spp. do que outros portas-enxertos como a laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium*), por exemplo. A utilização deste porta-enxerto tem gerado maior incidência da Gomose de Citros e alcançado maiores danos em decorrência da atuação do patógeno (MEDINA FILHO, 2003).

A resistência genética de porta-enxertos pode ser muito eficaz no controle da Gomose dos Citros. A interação citros-*Phytophthora* spp. pode levar à elaboração de estratégias para o controle do patógeno (TEIXEIRA, 2005). Embora seja muito importante para a produção da citricultura brasileira que existam estudos sobre a Gomose de Citros e métodos de inoculação de *Phytophthora citrophthora* em Citros, estes ainda são limitados, e ainda existe uma grande carência de estudos mais aprofundados sobre o assunto.

Este trabalho tem como objetivo testar diversos métodos de inoculação de *Phytophthora citrophthora* em partes destacadas da planta de Citros, com a finalidade de selecionar um método de inoculação eficaz que permita futuramente uma avaliação mais rápida de genótipos de porta-enxertos e combinações copa/porta-enxerto de híbridos de citros com resistência à Gomose. A escolha do método de inoculação utilizado em nível de laboratório pode ser uma ótima alternativa, visto que a escolha de um método eficaz de avaliação de genótipos por inoculação em partes destacadas da planta poupa tempo e recursos financeiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CITROS

Os Citros são originários da Ásia meridional, foram cultivados desde muito tempo nos jardins da Babilônia e também na Palestina. Sua introdução no Brasil se deu por meio dos portugueses durante o processo de colonização, espalhando-se rapidamente por todo território brasileiro graças a sua fácil adaptação aos diversos tipos de solos, ainda que prefira um solo sílico-argiloso e com profundidade média de 50 a 70 cm, que possibilita um melhor desenvolvimento radicular da planta. Em locais de baixa pluviosidade como em zonas semiáridas é necessário o uso de irrigação em meses mais secos (GOMES, 1972).

A temperatura média de crescimento dos citros está entre 12°C a 27°C. Em regiões com temperaturas mais baixas os frutos têm melhor coloração da casca e da polpa, assim como teores mais altos de açúcares e sólidos solúveis. Já em climas quentes os frutos são menos coloridos, mais doces e o sabor é considerado mais pobre. Climas quentes são propícios ao cultivo dos pomelos, laranjas, limas doces e ácidas e limões verdadeiros (EMBRAPA, 2017).

As espécies que compõem o gênero *Citrus* são plantas dicotiledôneas pertencentes à família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae* (*Citroidea*), tribo *Citreae*, subtribo *Citrinae* dentro desta subtribo existem aproximadamente treze gêneros, a exemplo *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* de grande relevância no mercado de importância econômica mundial (GOMES, 1972).

As Rutáceas, de acordo com as suas características morfológicas, são árvores ou arbustos, raramente ervas, suas folhas são alternas ou opostas, geralmente compostas, sem estípulas, com glândulas secretórias, translúcidas; por vezes transformadas em espinhos sobre ramos curtos, sua inflorescência são cimeiras, e as flores hermafroditas raramente unissexuais, geralmente actinomórficas, com um grande disco por baixo do gineceu; flores tetra-ou pentâmeras; cálice dialisépalo ou sinsépalo; corola dialipétala, com as pétalas imbricadas; estames 8-10, obdiplostémonos, com anteras introrsas; ovário súpero, raramente semi-ínfero ou 104 ínfero, 4-5-carpelar, carpelos frequentemente livres na base mas unidos no ápice pelo estilete, plurilocular, com 1 a vários óvulos anatrópicos em cada lóculo. O Fruto pode ser drupa ou baga (LOUSÃ, 2001).

A propagação dos Citros é na maioria das vezes feita por meio da enxertia, por isso a necessidade de se utilizar porta-enxertos sadios, para a preservação das copas neles

enxertadas. Os porta-enxertos podem ser afetados, nas sementeiras e viveiros por fungos causadores de tombamento ou "damping-off" tais como *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. (SILVA e SANTOS FILHO, 1981).

O citros apresenta grande diversidade de gêneros, espécies, variedades e clones. No entanto, o número de cultivares nos plantios comerciais é pequeno, principalmente no que diz respeito a porta-enxertos, e com isso a base genética é limitada, aumentando a influência de doenças (OLIVEIRA et al., 2014). É fundamental ampliar essa base genética para estabelecer mais combinações e utilizar híbridos resistentes aos patógenos que interferem na cultura.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de Citros, sendo o maior produtor mundial de laranja, a maior parte da produção é destinada para produção de sucos, sendo o maior exportador em escala global (CARVALHO, 2017).

A produção de laranja no Brasil em 1970 foi de 15.497.198 toneladas e área colhida de 202.037 ha, em 1980 a área colhida foi de 575.249 ha 54 59.072 toneladas, e alcançou o seu pico de produção nos anos 90 com área colhida 912.996 ha e produção de 87.602.607 toneladas, após esse período houve queda na produção de laranja em 2010 alcançou a área de produção de 775.881 a produção representou 18.101.708 toneladas, essa queda pode ser justificada pela exigência do mercado de exportações que exigem frutos com maior padrão de qualidade. (IBGE, 2012) Já em 2015 a área colhida correspondeu a 665.174 ha da cultura e um volume de 16.746.247 toneladas (IBGE, 2017).

No que se refere à produção de laranja nos municípios brasileiros, destaca-se São Paulo como maior produtor do Brasil com 15.293.506 toneladas, já a Bahia aparece em segundo lugar com área de produção correspondendo 65.129 ha e produção de 1.036.841 toneladas (IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2012.).

A produção de Citros no Brasil é de importância mundial, tendo liderança na produção e exportação em diversos países, por isso são necessárias ações para melhorar a sanidade da cultura, buscando alternativas para controle das doenças (CAIXETA et al., 2013).

2.2. *Poncirus trifoliata* 'Kryder'

Embora *Poncirus trifoliata* 'Kryder' seja um dos porta-enxertos mais utilizados, em certas regiões, devido sua resistência a doenças como Gomose e Tristeza dos Citros, suas sementes exigem condições especiais de armazenamento e condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento. As melhores condições de armazenamento foram obtidas em câmara fria com temperatura de 4°C e umidade relativa do ar de 70%, em que resultou em um total de

57% de sobrevivência em 150 dias, o tempo médio de germinação das sementes foi de 3 a 5 dias (OLIVEIRA, 2002).

Um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético é obter maior resistência a doenças. Um dos cruzamentos mais explorados é entre os parentais *C. sunki* x *P. trifoliata*, pois a morfologia contrastante entre estes resulta em híbridos com maior resistência a diversos patógenos (MATHERON et al., 1998).

O '*Poncirus trifoliata*' quando usado como porta-enxerto de copa Laranja 'Lima' tem menor produção quando comparado ao porta-enxerto limoeiro 'Cravo'. Entretanto o *P. trifoliata* pode proporcionar um aumento da densidade de plantio e conseqüentemente uma maior produção por área, ou mesmo similar àquela obtida para plantas enxertadas sobre porta-enxertos mais vigorosos em relação ao desenvolvimento da copa e produção de frutos, apresenta maior eficiência produtiva. Outra vantagem é que plantas com copas menores necessitam de menos tratamentos culturais e facilitam a colheita (LIMA et al., 2014).

P. trifoliata quando inoculado com *Phytophthora* spp por meio do método de inoculação dupla em seu tronco, obteve melhores resultados quanto à resistência/susceptibilidade, demonstrando maior resistência ao patógeno, desenvolvendo lesões menores quando comparado a Tangerina Sunki e ao limão 'Cravo' (MEDINA FILHO, 2003).

2.3. LIMOEIRO 'SICILIANO'

O limoeiro Siciliano tem frutos ácidos tipo baga, apresenta como característica plantas tipo arbóreas ou arbustivas de porte médio, a estrutura da copa é volumosa de forma arredondada, com presença de espinhos, as folhas são coriáceas, alternadas e simples (LORENZI et al., 2006).

O limoeiro Siciliano tem como característica: baixa resistência a seca, boa resistência ao frio, possui alta qualidade de fruto, e a forma de plantas de tamanho médio e com alta longevidade. Como fator limitante apresenta susceptibilidade Gomose dos Citros. Isso limita a produção, pois a doença atinge a cultura exigindo ações que inibam a sua proliferação (SOUZA et al., 2010)

O limoeiro Siciliano apresenta suscetibilidade a diversas doenças, incluindo a Gomose dos Citros. Como forma de minimizar tais prejuízos e garantir a sua produção para que não seja afetada pela ação de patógenos, são enxertados em porta-enxertos resistentes ou medianamente resistentes às doenças que afetam o cultivar. Esta estratégia ajuda, porém, é

necessário medidas para evitar que o porta-enxerto não passe doenças para a parte superior da copa, o que pode gerar queda na produção em decorrência do tamanho dos frutos ou morte da planta (BARBASSO et al., 2003).

Em experimento conduzido por Loureiro (2016), ficou determinado que o citrandarin ‘Riverside’ destacou-se como porta-enxerto promissor ao limoeiro ‘Siciliano’, superando os outros tratamentos formados por limoeiro Cravo ‘Santa Cruz’, Híbrido 059 [*C. sunki* x (limoeiro ‘Cravo’ x *P. trifoliata*)], citrandarin ‘Indio’, citrumeleiro ‘Swingle’ tangerineira ‘Sunki Tropical’. O citrandarin ‘Riverside’ apresentou desenvolvimento vegetativo superior com diâmetro médio da copa e o volume médio de copa maiores.

2.4. GÊNERO *Phytophthora*

O gênero *Phytophthora*, do Grego Phyton = planta e pthora =destruidor (destruidor de plantas), foi estabelecido por Anton De Bary em 1876, pertence ao Reino Chromista, filo Oomicota, classe Oomycetes, ordem Pythiales e família Pythiaceae. O gênero *Phytophthora* anteriormente era considerado pertencente ao reino Fungi, porém por apresentar características diferentes ao reino Fungi passou a pertencer ao Reino Chromista (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Segundo Feichtenberger et al. (2005) existem diversas espécies de *Phytophthora* que afetam a cultura do citros, dentre elas *P. nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. palmivora*, *P. boehmeria*, *P. cactorum*, *P.capsici*, *P. citricola*, *P. cinnamomi*, *P. drechsleri*, *P. hibernales*, *P. megasperma* e *P. syringae*. Para que o estudo da doença seja feito de forma eficaz é necessário identificar a espécie, pois essas informações poderão ser de utilidade no controle da doença.

Phytophthora spp. são patógenos do solo e agentes causais de importantes doenças. Este patógeno age em plantas ainda em condições de viveiros, telados e até em condições de campo. Sua infecção ocorre nas radículas, raízes, colo das plântulas, folhas, ponteiros, e também nos frutos (SIVIEIRO et. al., 2001).

A caracterização das estruturas microscópicas de *P. citrophthora* são esporângios persistentes, papilados, de diferentes formatos variando de ovóides, elipsóides ou quase esféricos a formas distorcidas; esporângios dispostos irregularmente nas hifas (SIQUEIRA, 1985).

Espécies de *Phytophthora* produzem estruturas de resistências que mesmo em condições inóspitas ao seu desenvolvimento sobrevivem, quando encontram condições favoráveis, alta umidade e temperaturas mais altas por períodos prolongados, clamidósporos e os esporângios

podem germinar e produzir esporângios ou microesporângios que podem germinar diretamente sobre a superfície dos órgãos atacados ou produzir zoósporos em contato com a superfície das raízes de hospedeiros suscetíveis, perdem seus flagelos, encistam e germinam, penetrando no hospedeiro, se diferenciam e formam cistos que germinam e originam hifas que infectam raízes e caule, com colonização dos tecidos e o aparecimento de sintomas. Após a colonização dos tecidos, novos esporângios são formados e a infecção se repete em condições favoráveis (Figura 1) (LARANJEIRA et al., 2005).

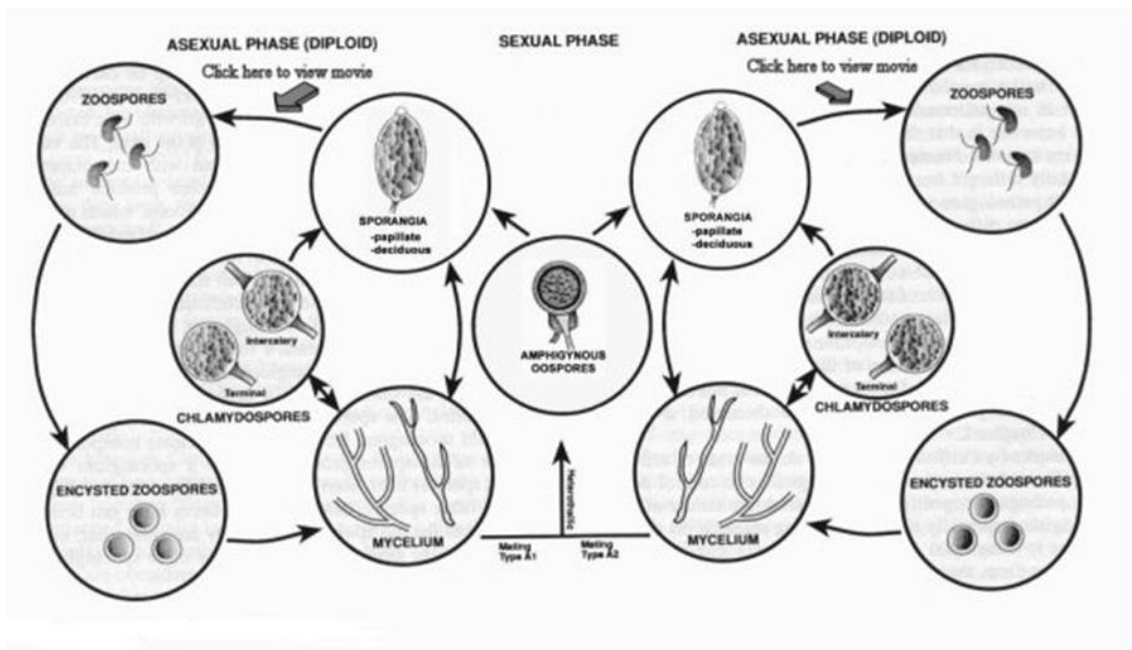


Figura 1. Ciclo de vida da doença *Phytophthora* (ERWIN & RIBEIRO, 1996).

O gênero *Phytophthora* não é somente encontrado nas Rutáceas, mas também em várias plantas cultivadas e plantas florestais como seringueira, acácia-negra; pupunheira, araucária, *P. cinnamomi* e *P. citrophthora* já foram associadas a diversas espécies florestais como Seringueira (*Hevea brasiliensis*, *Hevea* spp.); Cacaueiro (*Theobroma cacao*) (SANTOS et al., 2013).

2.5. A GOMOSE DOS CITROS

A ocorrência de gomose dos Citros foi verificada há muitos anos, mas sua importância ganhou destaque quando em aproximadamente 1940 com o aparecimento do vírus da tristeza dos citros, doença que eliminou 90% da citricultura brasileira, o porta-enxerto laranja Azeda

(*Citrus aurantium*), muito resistente à *Phytophthora*, mas altamente suscetível a esse vírus, foi substituído pelo limão ‘Cravo’ (SIVIEIRO, 2002).

A gomose dos Citros é um problema existente em todas as áreas de produção de citros do mundo. No nosso país a doença é umas das que mais afetam a cultura, tendo destaque nacional como um grande limitante de produção. Existem treze espécies de *Phytophthora* relacionadas a cultura do citros, cinco podem ser encontradas no Brasil, e três podem ser associadas como agente causal de diversas doenças do complexo Citros-*Phytophthora* (ERWIN & RIBEIRO, 1996).

Os sintomas da Gomose dos Citros são lesões no colo da planta e em outras partes do tronco; exsudação de goma; descoloração do tecido afetado. Sintomas secundários envolvem amarelecimento, murcha e queda de folhas. Folhas, frutos e ramos novos podem ser afetados diretamente pela *Phytophthora* (TEIXEIRA, 2005).

Os principais sintomas da gomose em condições de campo envolvem a morte dos tecidos internos da epiderme e do floema, formação de calos, exsudação de goma, rachaduras e fendas longitudinais no tronco, podridões do colo e raízes, clorose uniforme e progressiva nas folhas, baixo desenvolvimento das folhas, murcha, desfolha e, finalmente, morte da planta (FUNDECITRUS, 2017).

O desenvolvimento da doença está relacionado com altas temperaturas, umidade relativa do ar alta e ao grau de umidade do solo, que estimulam a ocorrência do Oomiceto no solo em condições favoráveis a ele (FEICHTENBERGER, 2001).

2.6. MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Phytophthora* spp.

Segundo Siviero (2002), a escolha da metodologia de inoculação de *Phytophthora* spp. depende do objetivo do trabalho com a doença alvo, parte da planta em estudo e espécie da planta e do patógeno. O autor utilizou os seguintes métodos de inoculação: contato planta sem ferimento-patógeno, casca destacada, inserção de disco de meio de cultura contendo micélio sob a casca, método do disco e inserção de agulha e palito infestados em plântulas e plantas jovens de citros. A avaliação foi realizada usando a medida da área total. O método do disco e o da inserção sob casca foram os melhores quando utilizados em plantas jovens.

Como estratégia de garantir avaliações em porta-enxertos, são realizadas metodologias de inoculação com o objetivo de avaliar a resistência de materiais vegetais e definir a suscetibilidade ou resistência do porta-enxerto por meio de lesões características da Gomose dos Citros (SIVIEIRO et. al. 2002).

Rossetti, (1947) desenvolveu seu trabalho utilizando como método de inoculação do patógeno por meio de discos de micélio, que foram inoculados em partes da planta como frutos, ramos e caule. Nos dias atuais, essa metodologia tem sido muito usada principalmente em *Phytophthora citrophthora*.

MEDINA FILHO, (2003) utilizou o método para a inoculação descrito por Rossetti (1947), porém através de dois ferimentos em cada planta foram feitas duas inoculações, sempre nas posições NE e SO, na altura de 10 cm do solo, verificou que não houve diferença significativa entre as lesões, utilizando como avaliação o resultado obtido da média das duas lesões em cada planta. No ensaio foram testados clones e híbridos de Citros.

Aguilar-Vildoso & Pompeu Junior, (1997), utilizaram a inserção do patógeno em um palito de dente infestado. Em 2001, Siviero também usou este método, porém substituiu o palito por uma agulha infestada em plântulas desenvolvidas *in vitro*.

3. OBJETIVO

Avaliar métodos de inoculação em partes destacadas da planta que possibilitem uma avaliação precoce de resistência à *Phytophthora citrophthora* em citros.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar métodos de inoculação mais propícios e que melhor possibilite a avaliação quanto a resistência à *Phytophthora* spp.
- Utilizar o método mais eficaz para selecionar genótipos resistentes à *Phytophthora citrophthora* visando sua utilização como porta-enxerto.
- Reduzir o número de genótipos a serem testados em campo, já que esses ensaios preliminares garantirá respostas a resistência a Gomose antes de serem submetidos a campo.
- Promover eficácia do Programa de melhoramento genético de citros

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no município de Cruz das Almas, Bahia, utilizando métodos de inoculações de *Phytophthora citrophthora* em Citros. Foram utilizados dois genótipos de Citros: limoeiro ‘Siciliano’ (*Citrus lemon*) sabidamente susceptível ao patógeno e Poncirus (*Poncirus trifoliata* ‘Kryder’) que apresenta resistência ao patógeno.

4.1. OBTENÇÃO DO ISOLADO

Os isolados de *Phytophthora citrophthora* foram cedidos pelo pesquisador Eduardo Feichtenberger (Unidade de Pesquisa e desenvolvimento de Sorocaba, APTA Regional), oriundos de diversas regiões localizadas no estado de São Paulo. Foram usados no teste de patogenicidade sete isolados de *Phytophthora citrophthora* (LRS 13/15; LRS 15/15; LRS 41/17; LRS 42/17; LRS 43/17; LRS 44/17 e LRS 45/17) descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Procedência dos isolados de *Phytophthora citrophthora*.

Cultura n°	Hospedeiro	Propriedade	Município	Data de isolamento
LRS 13/15	Lar. Shamouti T.Cleópatra	Fazenda Arcanjo Miguel	São Miguel Arcanjo- SP	13/10/2015
LRS 15/15	Lar. Natal/Citr. Swingle	Fazenda Arcanjo Miguel	São Miguel Arcanjo- SP	13/10/2015
LRS 41/17	Lar. Pineapple	Fazenda Monte Verde	Itapetininga-SP	23/06/2017
LRS 42/17	Lar.Pineapple	Fazenda Monte Verde	Itapetininga-SP	23/06/2017
LRS 43/17	Lar. Pineapple	Fazenda Monte Verde	Itapetininga-SP	23/06/2017
LRS 44/17	Lar.Pineapple	Fazenda Monte Verde	Itapetininga-SP	23/06/2017
LRS 45/17	Lar. Pineapple	Fazenda Monte Verde	Itapetininga-SP	23/06/2017

4.2. TESTE DE PATOGENICIDADE

O teste de Patogenicidade foi realizado em frutos e folhas de limoeiro ‘Siciliano’ que foram coletados em plantas mantidas em casa de vegetação, higienizados com água corrente e imersos por 2 minutos em solução com 0,5% de hipoclorito de sódio, sendo posteriormente lavados com água estéril. Em seguida, foram colocados em câmara úmida, sendo os frutos

acondicionados em sacos de polietileno contendo algodão umidificado em água estéril, e as folhas foram acondicionadas em caixas plásticas gerbox (12 cm x 12 cm) cobertas por uma camada de espuma de aproximadamente 2 cm de espessura e igual tamanho, ambos esterilizados, umidificada em água estéril. A inoculação foi realizada por meio de disco de micélio de 3 mm, sendo retirado do fruto um pequeno fragmento do epicarpo e mesocarpo, onde foi depositado o micélio sendo posteriormente recoberto o local da inoculação com o tecido retirado (ROSSETTI, 1947). Nas folhas, a inoculação ocorreu por meio de um disco de micélio dos isolados de aproximadamente 3 mm colocado na parte abaxial em um lado contendo ferimento e do outro sem causar ferimento. Cada gerbox continha duas folhas. As avaliações dos frutos e das folhas foram realizadas respectivamente em 48 h e 72h. Observaram-se os sintomas em resposta à área de lesão nos frutos e folhas inoculados, o isolado 45/17 foi o que apresentou maior agressividade e que foi utilizado em todos os experimentos.

4.3. ISOLAMENTO DO PATÓGENO

Após a avaliação do teste de patogenicidade o 45/17 foi isolado por meio da técnica de isolamento de microrganismos fitopatogênicos, retirando-se da área lesionada no fruto e na folha fragmentos contendo a lesão e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura com ágar simples (20 gr de ágar/L). Posteriormente, foi realizado a repicagem do isolado retirando-se um disco da área próxima a borda de aproximadamente 3 mm em placas de Petri contendo meio cenoura-ágar (200 gr de cenoura e 20gr de ágar/L) e, para o desenvolvimento da cultura, as placas foram submetidas em condições de fotoperíodo de 12 horas e temperatura constante de 25 ° C durante 7 a 10 dias em BOD (AMORIM SALGADO, 1995).

4.4. OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO

Para obtenção da suspensão as placas de *P. citrophthora* contidas em meio cenoura-ágar em período de 7 a 10 dias foram repicadas para placas de Petri contendo meio de cultura cenoura-líquido durante período de 48 horas. Após esse período o meio líquido foi retirado da placa e é adicionado 10 ml de água esterilizada, as placas foram mantidas em BOD com temperatura constante de 24°C, luz contínua fluorescente durante 48 h para a formação de esporângios. Com um auxílio de microscopia ótica utilizando um hemocitômetro (Câmara

Neubauer), as suspensões de zoósporos foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 zoósporos/mL.



Figura 2- Obtenção da Suspensão: **A-** Placa de Petri contendo meio cenoura-ágar. **B-** Representação das etapas de obtenção da suspensão. **C-** Suspensão *Phytophthora citrophthora*.

4.5. MATERIAL VEGETAL USADO NO ENSAIO

O material vegetal para o ensaio definitivo foi obtido em campo, coletado nas primeiras horas da manhã, momento em que as plantas se encontram com maior turgescência e vigor. Foram utilizados nos estudos folhas e ramos de limoeiro ‘Siciliano’ (*Citrus lemon*) e Poncirus (*Poncirus trifoliata* ‘Kryder’); as folhas coletadas estavam em estado fisiológico correspondendo cerca de 50 % de seu desenvolvimento, e os ramos foram obtidos utilizando uma tesoura de poda deixando-os com aproximadamente 10 cm de comprimento com desenvolvimento de maturação fisiológica também intermediário. Para a desinfecção, as folhas e ramos foram higienizadas em hipoclorito de sódio durante 2 minutos e lavadas com água estéril. Para a montagem do experimento, a câmara úmida utilizada foram caixas plásticas (Gerbox) higienizadas utilizando metodologia padrão em hipoclorito de sódio a 0,5 %, contendo espumas autoclavadas que foram umidificadas com água estéril.

4.6. INOCULAÇÕES EM RAMOS DESTACADOS DA PLANTA

Foram testados três métodos de inoculação em ramos: inoculação com gotas da suspensão de zoósporos, inoculação por imersão em suspensão de zoósporos e inoculação por disco de micélio. O experimento foi instalado em condições ambientes de laboratório, utilizando limoeiro ‘Siciliano’ e *Poncirus trifoliata*. Em todos os casos foi adotado delineamento inteiramente casualizado, utilizando três caixas plasticas transparentes gerbox,

com oito ramos em cada. Nos tratamentos de controle, as testemunhas foram inoculadas com água estéril nas inoculação por suspensão, e nas inoculações contendo disco de Micélio foram usados meio de cultura estéril.

4.6.1. Inoculação por meio de Disco de Micélio

Foram feitos ferimentos com um furador de 3mm de diâmetro na parte central dos ramos, no mesmo local foi depositado um disco de micélio de igual diâmetro sobre a área lesionada, recoberto pela casca que havia sido removida, sendo toda a área coberta por algodão umedecido e o conjunto envolvido por uma fita plástica.

4.6.2. Inoculação de Suspensão de Zoósporos

Na inoculação com gotas da suspensão em ramos, foi feito um ferimento com auxílio de um furador medindo 3 mm de diâmetro na parte central do ramo da planta, onde a suspensão foi colocada utilizando uma pipeta de 10 μ L contendo a suspensão de esporos na concentração de 5×10^5 zoósporos/mL. Após a inoculação o pedaço retirado foi colocado sobre o ferimento, o tecido foi envolto com algodão umedecido e coberto por uma fita plástica.

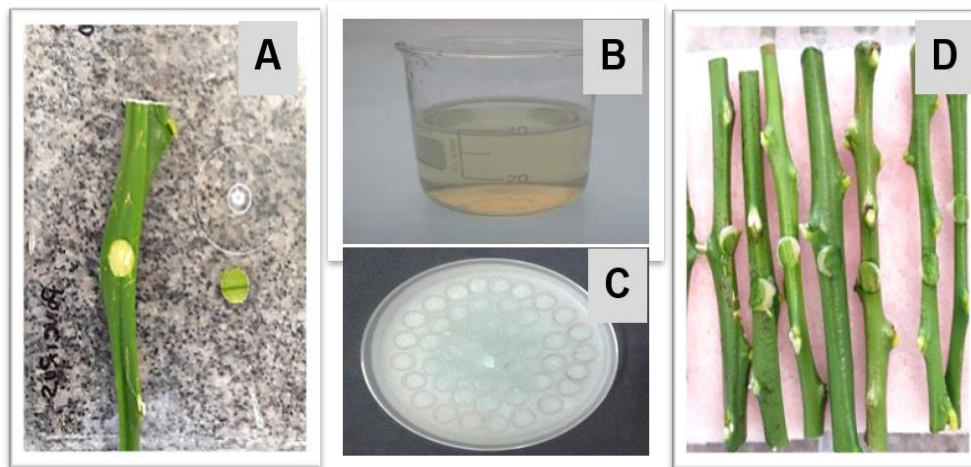


Figura 3- Representação esquemática dos passos de inoculação em ramos: **A-** Ramo com ferimento causado pelo furador, **B-** Suspensão de *Phytophthora citrophthora*. **C-** Placa de Petri contendo os discos de micélio para inoculação. **D-** Ramos após a inoculação

4.6.3. Inoculação por Imersão de Suspensão de Zoósporos

Os ramos foram imersos em 40 ml de uma suspensão de zoósporos contidos em um

Becker na concentração de 5×10^5 zoósporos/mL, em que cada tratamento foi realizado durante três períodos de 20 minutos, 40 minutos e 60 minutos.

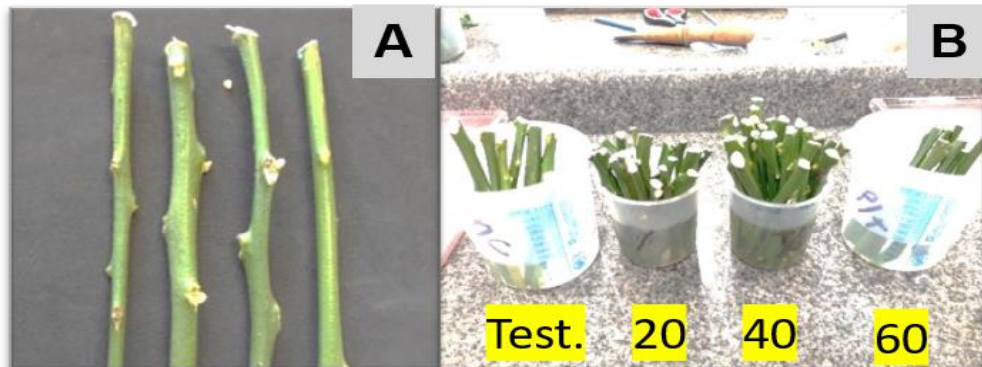


Figura 4- Imersão em ramos. **A-** Ramos de *Poncirus Trifoliata* **B-** Ramos imersos em suspensão de *Phytophthora citrophthora* com registro de tempo de imersão em minutos.

4.6.4 Avaliação

As avaliações em ramos foram realizadas após sete dias, retirando a casca exterior do ramo com um bisturi, e sobre a lesão, porventura existente, foi colocada uma fita transparente e decalcada a área lesionada para a obtenção de um valor bidimensional, foi digitalizada utilizando uma câmera fotográfica digital, analisadas no software ASSESS 2.0 (LAMARI, 2002) para mensuração da área lesionada. O programa, através de análise de cores, calcula a área lesionada em pixels, a medida foi dada em centímetros, no programa foi calibrado uma área de 4 cm² que foram usados para obter a área da lesão. Os dados obtidos foram transformados e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA) a fim de verificar a existência de diferenças significativas pelo teste F entre as inoculações e ao Teste de Scott-Knott (SCOTT KNOTT, 1974).

4.7. INOCULAÇÕES NAS FOLHAS

Para cada genótipo, os métodos testados foram:

- Inoculação com suspensão de zoosporo com ferimento por abrasivo nas faces abaxial e adaxial.
- Inoculação com suspensão de zoosporo sem ferimento nas faces abaxial e adaxial.

- Inoculação com disco de micélio, com ferimento, por abrasivo nas partes abaxial e adaxial.
- Inoculação com disco de micélio, sem ferimento, nas partes abaxial e adaxial

Após a aplicação dos métodos de inoculação as caixas plásticas transparentes gerbox, foram acomodadas em BOD com temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12 h. Os tratamentos com as testemunhas foram inoculados apenas com água destilada esterilizada no método utilizando suspensão, e no método de inoculação com disco estes continham apenas meio de cultura estéril. Foram usados três caixas plásticas transparentes gerbox, contendo duas folhas por gerbox, totalizando 6 folhas em cada tratamento.

4.7.1. Inoculação com Suspensão de Zoósporo em Folhas com ferimento causado por abrasivo nas faces adaxial e abaxial

O experimento constituiu-se em tratamentos de inoculação de zoósporos nas faces adaxial ou abaxial das folhas, com ferimentos causados por abrasivos (Carbeto de Silício). O ferimento foi causado nas folhas com abrasivo, esfregando-o levemente nas duas faces das folhas, depois removendo o abrasivo com água estéril abundante, e enxugando as folhas com um papel toalha estéril. As folhas receberam 10µL de suspensão na concentração de 5×10^5 zoósporos/ml utilizando uma pipeta.

4.7.2 Inoculação com suspensão de zoósporo sem ferimento nas faces abaxial e adaxial

O experimento constituiu-se em tratamentos de inoculação de zoósporos nas faces adaxial ou abaxial das folhas que receberam 10µL de suspensão na concentração de 5×10^5 zoósporos/mL.

4.7.3. Inoculação de Disco de Micélio em Folhas com Ferimento Causado por Abrasivo.

O ferimento foi causado nas folhas com abrasivo como descrito em 4.7.1 e, em seguida, foi colocado um disco de micélio de 3mm sobre a área lesionada. Este procedimento foi realizado nos tratamento em folhas nas faces abaxial ou adaxial.

4.7.4 Inoculação com disco de micélio, sem fermento, nas partes abaxial e adaxial

Foi adicionado um disco de micélio de 3mm sobre a área da folha e, este procedimento foi realizado nos tratamentos em folhas nas faces abaxial ou adaxial em ambos os genótipos descritos.

4.7.5 Avaliação

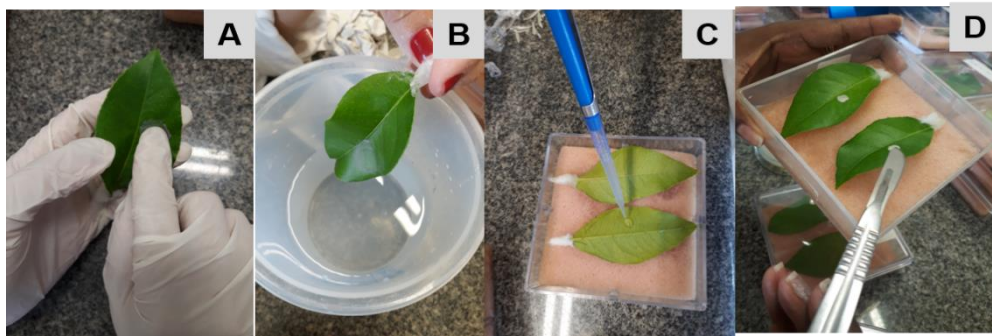


Figura 5- Inoculação em folhas utilizando abrasivo: **A-** Abrasivo sendo friccionado sobre a folha. **B-** Abrasivo sendo removido em um Becker com água. **C-** Suspensão sendo inoculada na folha. **D-** Disco de micélio sendo inoculado sobre a folha.

4.7.5. Avaliação em Folhas

As folhas foram avaliadas após cinco dias. As folhas foram digitalizadas utilizando uma câmera fotográfica digital com obtenção de imagens em escala real. Estas imagens foram analisadas no software ASSESS 2.0 (LAMARI, 2002) para mensuração da área lesionada. O programa, por meio de análise de cores, calcula a área lesionada em pixels, apresentando a relação entre o número de pixels desta área pela área total da folha, obtendo-se assim a porcentagem de área lesionada.

Na avaliação em folhas foi feita uma análise multivariada, um esquema de composição dos tratamentos. Os experimentos fatoriais nos permitem tirar conclusões mais amplas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições, quatro fatores em estudo e dois níveis cada, perfazendo um fatorial $2^4=2 \times 2 \times 2 \times 2$, totalizando 16 tratamentos. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e testes de médias com auxílio do programa estatístico R.

Os dados obtidos foram transformados em $[(\arcsen \sqrt{x}) \cdot 100]$ e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA), e ao Teste de Scott-Knott (SCOTT KNOTT, 1974)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações mostraram que em todos os métodos testados, seja em folhas ou em ramos, as lesões foram sempre menores em *Poncirus trifoliata* ‘Kryder’ (Tabela 2 e 4). No limoeiro “Siciliano” observou-se uma tendência para desenvolvimento de lesões maiores. Estes resultados são semelhantes aos de Medina Filho (2003) que também encontrou em *P. trifoliata* ‘Kryder’ sempre uma reduzida área lesionada e uma reduzida amplitude de variação, justificando porque os *trifoliatas* são conhecidos como porta-enxertos resistentes/tolerantes à Gomose dos Citros.

Tabela 2 - Médias das lesões nos diferentes métodos de inoculação de *P. citrophthora* em limoeiro ‘Siciliano’ e *P. trifoliata* em ramos

Métodos de inoculação	Siciliano	<i>Poncirus trifoliata</i> ‘Kryder’
Imersão em ramos	14.09 cm ²	5.80 cm ²
Suspensão em Ramos	7.99 cm ²	6.52 cm ²
Disco de Micélio em Ramos	13.71cm ²	8.03cm ²

A análise estatística realizada nos tratamentos com imersão dos ramos, mostrou diferença significativa entre os genótipos testados nos tempos de 40 e 60 minutos. O limoeiro Siciliano se comportou como altamente suscetível com a média de lesão de 14.09 cm², já o *Poncirus trifoliata* ‘Kryder’ apresentou uma média de lesão de 5.80 cm². Nos tratamentos realizados com a inoculação por imersão, o tempo de 40 minutos foi considerado o mais eficiente, provocando as maiores lesões em ambos os genótipos, com média de 11.95 cm². Na imersão de 60 minutos a média de lesão entre dos genótipos foi de 9.16 cm². Nos tratamentos onde a imersão dos ramos foi durante 20 minutos, os resultados registraram lesões menores, sem diferença significativa entre os genótipos, o que impossibilita a seleção de resistência/suscetibilidade podendo proporcionar interpretações não verdadeiras em relação as respostas dos genótipos e a suscetibilidade ou resistência a doença.

O método de inserção de disco sob a casca foi considerado o melhor, sendo mais eficiente até mesmo quando comparado com a inoculação por suspensão de zoósporos. Ambas apresentaram diferenças significativas entre os dois genótipos em estudo, confirmando que o *Poncirus trifoliata* ‘Kryder’ apresenta lesões menores. O método de inserção de disco apresentou maiores amplitudes de médias de lesões entre os genótipos que o método de suspensão de zoósporo o que está de acordo com resultados de Siviero (2001) que o

considera o melhor método. As maiores áreas lesionadas verificadas neste método pode ser em virtude da abertura feita na casca para a inserção do disco de micélio, forçando uma maior área de contato exposta pelo ferimento. O autor também destaca a importância da homogeneidade do ferimento causado na casca, e recomenda a adoção de uma padronização de ferimento.

Tabela 3- Médias das lesões dos métodos de inoculação de disco de micélio e Suspensão de zoósporo em ramos

Tratamento	Disco	Suspensão
Siciliano	13.71 cm ²	7.99 cm ²
<i>Poncirus trifoliata</i>	8.03 cm ²	6.52 cm ²

As Folhas sem ferimento, inoculadas com *P. Citrophthora*, não apresentaram lesões nas avaliações que foram realizadas até 72 horas em ambos os genótipos. Nas folhas de limão ‘Siciliano’, após este período apareceram sintomas em folhas com ou sem ferimentos. No *P. trifoliata* os sintomas só apareceram nas folhas com ferimento. Este resultado é importante para precisar o período destinado às avaliações. Sivieiro (2001) afirma que quando houve a ocorrência do ferimento aconteceu uma maior susceptibilidade do genótipo à infecção do patógeno. O autor percebeu essa tendência em seu estudo quando avaliou genótipos anteriormente descritos na literatura como resistentes à *Phytophthora* spp, como: laranja ‘Azeda’, citrumelo ‘Swingle’ e o limoeiro ‘Cravo’, respectivamente, resistentes e moderadamente resistentes ao patógeno que se comportaram como suscetíveis em dois experimentos realizados. O autor constatou que o ferimento ajuda a penetração do patógeno na planta e causa a doença.

No experimento realizado em folhas, a análise fatorial multivariada e a aplicação do teste de Tukey permitiram médias superiores e a formação de quatro grupos onde as maiores lesões correspondem ao genótipo Limoeiro ‘Siciliano’ (Tabela 4).

As inoculações utilizando suspensão obtiveram os maiores resultados em folhas de limoeiro ‘Siciliano’ mesmo quando não houve a ocorrência do ferimento, sendo obtido as maiores áreas de lesões do ensaio. Já o *Poncirus trifoliata* ‘Kryder’ quando não houve ferimento não aconteceu o aparecimento de lesões mesmo após os cinco dias de avaliação, e naquelas com ferimento a maior média obtida foi na inoculação com disco 12.79 % (tabela 4).

Tabela 4 - Médias das lesões obtidas do resultado da interação de quatro fatores: Porta Enxerto (Siciliano e Poncirus); Lado da folha (Abaxial e Adaxial); Método de inoculação (Com fermento e sem fermento) e TI (Disco e Suspensão).

Tratamentos (Interações)	Médias
Siciliano/Abaxial/Com fermento/ Suspensão	90.86 % a
Siciliano/Adaxial/Com fermento/ Suspensão	89.09% a
Siciliano/Abaxial/Sem fermento/ Suspensão	84.38% a
Siciliano/Abaxial/Com fermento/ Disco	40.06% b
Siciliano/Adaxial/Sem fermento/ Suspensão	13.41% bc
Poncirus/Abaxial/Com fermento/ Disco	12.79 % bc
Siciliano/Adaxial/Com fermento/ Disco	10.65% bc
Siciliano/Adaxial/Sem fermento/ Disco	9.04% bc
Poncirus/Adaxial/Com fermento/ Suspensão	8.02% bc
Poncirus/Adaxial/Com fermento/ Disco	6.30% c
Poncirus/Abaxial/Com fermento/ Suspensão	3.22% c
Poncirus/Abaxial/Sem fermento/ Disco	0,00 c
Poncirus/Abaxial/Sem fermento/ Suspensão	0,00 c
Poncirus/Adaxial/sem fermento/ Disco	0,00 c
Poncirus/Adaxial/sem fermento/ Suspensão	0,00 c
Siciliano/Abaxial/Sem fermento/ Disco	0,00 c

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Quando analisadas as médias das inoculações realizadas em relação a face da folha, aquelas inoculadas na face abaxial obtiveram áreas de lesão maiores que as inoculadas nas faces adaxial em ambos os genótipos.

O método de inoculação utilizando suspensão de zoósporo a 5×10^5 , inoculada em folhas com fermento e na face abaxial foi o método que ocasionou maior lesão (90,86%), no Siciliano, confirmando a sua suscetibilidade e causando a menor lesão no *P. Trifoliata* (3,22%), confirmando a sua resistência.

6. CONCLUSÃO

Para as condições de realização do estudo, os resultados obtidos são boas alternativas para testes iniciais, de resposta rápida, a fim de testar a resistência/suscetibilidade de genótipos, com ênfase para os métodos de disco de micélio em ramos destacados com ferimento e o método de inoculação utilizando suspensão de zoósporo a 5×10^5 , inoculada em folha com ferimento e na face abaxial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L. & SALGADO, C. L. **Diagnose**. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, h. & Amorim, L. (Eds). Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronômica: Ceres. 1995. p.224-231.
- BARBASSO, D.V.; SIVIERO, A.; MASUDA, Y.; BUENO Jr., J.A.S.; FIGUEIREDO, J.O. de; MACHADO, M.A. **Reação de clones de limão ‘Siciliano’ à gomose de *Phytophthora***. Laranja, Cordeirópolis, v.24,n.1, p.125-134, 2003.
- CARVALHO, C. **Anuário brasileiro da fruticultura 2017**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017. 136p
- CAIXETA, M. P.; NUNES, W. M. de C.; SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. **Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil**. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 39, n. 4, p. 242-247, 2013.
- EMBRAPA – Disponível : <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/citros>. Acesso em 15 de janeiro de 2018.
- ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. ***Phytophthora* diseases worldwide**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1996.
- FEICHTENBERGER, E. **Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros**. In. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas. Livraria e Editora Rural Ltda. 2001. pp.283-342.
- FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JR, J. **Doenças dos citros**. Manual de Fitopatologia – doenças das plantas cultivadas. Sao Paulo, Ed. Agron. Ceres, v. 2, p. 239-269. 2005.
- FELZENER, L. T et al. **Efeitos de reguladores vegetais no enraizamento de estacas caulinares de *Poncirus trifoliata* var. monstrosa (T. Ito)**. Revista Brasileira de Fruticultura. Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 29, n. 2, p. 399-402, 2007.
- FUNDECITRUS. **Gomose de *Phytophthora***. Disponível em: < www.fundecitrus.com.br> acessado em: 01 de abril de 2017.
- GOMES, P. **Fruticultura Brasileira**. Nobel. 13 edição. 1972.

GRAHAM, J.H.; TIMMER, L. W.; DROIILLARD, D.L.; PEEVER, T. L. Characterization of *Phytophthora* spp. Causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. **Phytopathology**, v. 88, p. 724-729, 1998

IBGE, 2017- disponível : <https://www.ibge.gov.br/> acesso: 08 de janeiro de 2018.

IBGE - **Produção Agrícola Municipal**, 2012.). – disponível: <https://www.ibge.gov.br/> acessado: 21 de dezembro de 2017.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLETTA-FILHO, H.D. **Fungos, Procariotos e doenças abióticas**. In: Mattos Junior, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M & POMPEU JUNIOR, J. (eds).Citros, Cordeirópolis, p. 223-277, 2005.

LIMA, C. F. ; MARINHO, C. S. ; COSTA, E. S. ; ALMEIDA T. R. V. ; AMARAL, C. O. **Qualidade dos frutos e eficiência produtiva da laranjeira ‘Lima’ enxertada sobre ‘Trifoliata’, em cultivo irrigado**. Rev. Bras. Ciênc. Agrár. Recife, v.9, n.3, p.401-405, 2014.

LOPES, J.M.S.; DÉO, T.F.G.; ANDRADE, B J. M.; GIROTO, M.; FELIPE, A.L. S.; JUNIOR, C.EI.; BUENO, C. E. M.S.; SILVA, T. F.; LIMA, F.C.C..**Importância econômica dos citros no Brasil**. Revista Científica Eletrônica de Agronomia. Garça – SP.20^a Ed. 2011.

LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 640p.

LOUSÃ, M. et. al. MÓDULO de BOTÂNICA. **Instituto Superior de Agronomia UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA**. 2001.

MATHERON, M. E., WRIGHT, G. C., PORCHAS, M. **Resistance to *Phytophthora parasitica* and nurse characterisitic of several citrus rootstocks**. Plant disease, v.82, v12, p.12171225. 1998.

MEDINA FILHO, H.P., BORDIGNON, R., SIQUEIRA, W.J., FEICHTENBERGER, E., CARVALHO, M.R.T. & TEÓFILO SOBRINHO, J. **Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica***. Fitopatologia Brasileira 28:534-540. 2003.

NEVES, M. F. et al. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: CitrusBR, 2010. 137 p.

OLIVEIRA, R. P. de; SOARES FILHO, W. dos S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. da S. **Melhoramento genético de plantas cítricas**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 22 - 29, jul. / ago. 2014.

OLIVEIRA, 2002 **Procedimentos para o armazenamento de sementes de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.** (PDF Download Available). Available from: https://www.researchgate.net/publication/26351411_Procedimentos_para_o_armazenamento_de_sementes_de_Poncirus_trifoliata_L_Raf [accessed Jan 04 2018].

ROSSETTI, V.V. **Doenças causadas por fungos. Manual ilustrado de doenças dos citros - Fundecitros**. p.103-170, 2001.

ROSSETTI, V. **Estudos sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros I - Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de *Phytophthora***. Arquivos do Instituto Biológico 18:97-124. 1947.

SANTOS A. F & EDMUNDO L.; ***Phytophthora* em espécies florestais**. In: Patologia florestal: desafios e perspectivas / NEFIT – Núcleo de Estudos em Fitopatologia. 1. Ed. São Carlos, SP: Suprema Gráfica e Editora, p. 157 – 167, 2013.

SILVA, M. J.; SANTOS FILHO, H. P. **Interação dos fungos *Rhizoctonia*, *Pogonochytrium* e *Pythium* sobre o tombamento das sementeiras de citrus**. In: Congresso brasileiro de fruticultura. Anais. Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. v.2, p.688-692.

SIVIERO, A. **Métodos de inoculação da *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* a gomose**. (Tese de Doutorado) Botucatu. Faculdade de Ciências Agrônômicas. 2001.

SIVIERO, A., FURTADO, E.L., BOAVA, L.P., BARBASSO, D.V. & MACHADO, M.A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros**. Fitopatologia Brasileira 27:574-580. 2002.

SIQUEIRA, C. B, REIFSCHNEIDER F. J. B, CORDEIRO, C. M. T. **Índice de doenças de hortaliças no Brasil: bactérias e fungos**. Brasília, EMBRAPA, v.2. 89p. 1985.

SOUZA, P. V. D.; SOUZA, E. L. S.; OLIVEIRA, R. P.; BONINE, P. **Indicações Técnicas para a Citricultura no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2010. 126 p.

SCOTT, A.; KNOTT, M. **Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance**. Biometrics, Washington D.C., v.30, n.3, p.507-512, 1974.

TEIXEIRA, J. E. de C. **Genes de defesa de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora parasítica***. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.