

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**IDENTIFICAÇÃO DA RAÇA 1 DE *Venturia inaequalis* NO SUL DO BRASIL E
REAÇÃO DE ACESSOS DE MACIEIRA À SARNA**

**Paula Guerra Schenato
Bióloga / UCS**

**Dissertação apresentada como um dos
Requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade**

**Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2007**

HOMOLOGAÇÃO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Aos meus pais, Gilberto e Regina, e meus irmãos Diogo e Giovana, pelo carinho, incentivo e apoio.

Ao meu noivo, Marlon, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão, paciência e incentivo.

À Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Centro Nacional de Pesquisa da Uva e do Vinho, pela oportunidade de realização da pesquisa.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Valmir Duarte e à Dra. Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza pelos ensinamentos, orientação, compreensão e oportunidades.

Ao Dr. Paulo Ricardo Dias de Oliveira, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, pela colaboração.

Aos funcionários da Embrapa Uva e Vinho, Vanderlei, Heitor e Ari, pela colaboração.

Aos funcionários da Estação Experimental de Vacaria, Tina, João Paulo, José e Nereu, e à estagiária Carla, pela colaboração.

À secretária do PPG Fitotecnia da UFRGS, Marisa, pelo apoio.

Às minhas amigas Vaneila, Rita, Juliana, Aícha, Isabel e Prescila, pelo carinho, apoio e acolhimento.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

IDENTIFICAÇÃO DA RAÇA 1 DE *Venturia inaequalis* NO SUL DO BRASIL E REAÇÃO DE ACESSOS DE MACIEIRA À SARNA¹

Autora: Paula Guerra Schenato

Orientador: Valmir Duarte

Co-Orientadora: Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

RESUMO

A maioria dos programas de melhoramento da macieira incluem a resistência à sarna, causada pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.. A resistência codificada pelo gene *Vf*, presente em cerca de 80% das cultivares lançadas como resistentes à sarna, foi superada com o surgimento das raças 6 e 7, na Europa. No Brasil, não há relatos sobre raças e a maioria das cultivares lançadas como resistentes possui o gene *Vf*. Na busca por novas fontes de resistência, acessos de macieiras antigas podem ser promissores. Esta pesquisa objetivou comparar a reação de *V. inaequalis* entre folhas de macieira destacadas ou não; identificar as raças de *V. inaequalis* existentes em pomares comerciais no Sul do Brasil; e, avaliar a resistência de acessos de macieiras antigas à sarna. Trabalho preliminar mostrou que embora houve produção de conídios de *V. inaequalis* em folhas destacadas de macieira, esta foi significativamente maior em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar-Extrato de Levedura (40; 5; 17; 3.L⁻¹), após 12 dias de incubação à 16 °C e luz contínua. Não houve diferença nas reações entre folhas destacadas ou não quando inoculadas por aspersão com três isolados de *V. inaequalis*. A reação de plantas de macieira, diferenciadoras de raças, inoculadas em casa de vegetação, com nove isolados de *V. inaequalis*, oriundos de pomares comerciais de três municípios do Rio Grande do Sul e três de Santa Catarina, indicou que todos pertencem à raça 1. Em experimento com seis acessos de macieiras antigas, quatro mostraram evidências de maior resistência à raça 1 de *V. inaequalis*.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (108p.). Março, 2007.

IDENTIFICATION OF RACE 1 OF *Venturia inaequalis* OF SOUTH OF BRAZIL AND REACTION OF APPLE TREES ACCESSES OF APPLE SCAB¹

Author: Paula Guerra Schenato
Adviser: Valmir Duarte
Co-Adviser: Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

ABSTRACT

The most apple breeding programs includes the resistance of apple scab, caused by fungi *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.. The resistance codified by the *Vf* gene, present in around 80% of cultivars released as resistant to the apple scab, was overcome with the appearance of races 6 and 7, in Europe. In Brazil, there aren't reports about races and most cultivars released carry the *Vf* gene. Searching for new sources of resistance, old apple trees can be promising. The objective of this research was to compare the reactions of *V. inaequalis* between apple detached leaves or not; to identify the races of *V. inaequalis* prevalent in commercial orchards in South of Brazil; and, to evaluate the resistance of old apple trees for the apple scab. Preliminary work showed that although were produced conidia of *V. inaequalis* in apple detached leaves, this was significantly greater in medium Potato-Dextrose-Agar-Yeast-Extract (40; 5; 17; 3 g.L⁻¹), after 12 days, 16 °C and continuous light. There wasn't difference in the reactions between detached leaves or not when inoculated for dispersion with three strains of *V. inaequalis*. The apple trees reaction, differential of races, inoculated in a greenhouse, with nine strains of *V. inaequalis*, deriving from commercial orchards of three cities of Rio Grande do Sul and three of Santa Catarina, indicated that all pertain to race 1. In experiment with six old apple trees, four had shown evidences of greater resistance to race 1 of apple scab.

¹Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (108p.) March, 2007.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 A macieira	4
2.2 A sarna da macieira	5
2.2.1 Sintomas	5
2.2.2 Agente causal	7
2.2.3 Raças fisiológicas de <i>Venturia inaequalis</i>	12
2.2.4 Requerimentos nutricionais de <i>Venturia inaequalis</i>	15
2.2.5 Outros fatores que afetam o crescimento de <i>Venturia inaequalis</i>	19
2.3 O controle da sarna da macieira	20
2.3.1 Práticas culturais	20
2.3.2 Controle químico	20
2.3.3 Melhoramento genético	21
2.3.3.1 Fontes de resistência	23
2.3.3.2 Resistência ontogênica	25
2.4 Métodos de identificação de raças de <i>Venturia inaequalis</i>	26
2.5 Métodos de isolamento de <i>Venturia inaequalis</i>	28
2.6 Métodos de produção de conídios de <i>Venturia inaequalis</i>	28
2.7 Métodos de estudo da virulência de <i>Venturia inaequalis</i> em espécies de <i>Malus</i>	30
CAPÍTULO II	
3. PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>Venturia inaequalis</i> EM MEIO DE CULTURA	
3.1 Introdução	34
3.2 Material e métodos	38
3.2.1 Meios de cultura semi-sintéticos	38
3.2.2 Produção de conídios em meio de cultura	38
3.2.3 Desenvolvimento de colônias em meio de cultura	39
3.2.4 Produção de conídios em folhas destacadas de macieira..	40
3.3 Resultados e discussão	41
3.3.1 Produção de conídios e desenvolvimento de colônias de <i>V. inaequalis</i> em meio de cultura	41
3.3.2 Produção de conídios em folhas destacadas de macieira.	45
CAPÍTULO III	
4. IDENTIFICAÇÃO DA RAÇA 1 DE <i>Venturia inaequalis</i> NO SUL DO BRASIL	
4.1 Introdução	47
4.2 Material e métodos	51
4.2.1 Acessos de macieira	51
4.2.2 Tratamentos fitossanitários	51
4.2.3 Obtenção dos isolados de <i>Venturia inaequalis</i>	52

4.2.4	Produção de inóculo	52
4.2.5	Método de inoculação de plantas	53
4.2.6	Avaliações	54
4.3	Resultados e discussão	56
CAPÍTULO IV		
5.	VIRULÊNCIA DE <i>Venturia inaequalis</i> EM FOLHAS DE MACIEIRA DESTACADAS OU NÃO	
5.1	Introdução	66
5.2	Material e métodos	69
5.2.1	Acessos de macieira	69
5.2.2	Tratamentos fitossanitários	69
5.2.3	Obtenção dos isolados de <i>Venturia inaequalis</i>	70
5.2.4	Produção de inóculo	70
5.2.5	Método de inoculação por gotas em folhas destacadas	71
5.2.6	Método de inoculação por aspersão em folhas destacadas	71
5.2.7	Método de inoculação em folhas não destacadas	72
5.2.8	Avaliações	72
5.3	Resultados e discussão	74
5.3.1	Reação das folhas destacadas inoculadas por gotas	75
5.3.2	Reação das folhas destacadas inoculadas por aspersão ..	76
5.3.3	Comparação das reações entre folhas de macieira destacadas e não destacadas	77
CAPÍTULO V		
6.	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ACESSOS DE MACIEIRAS ANTIGAS A <i>Venturia inaequalis</i>	
6.1	Introdução	84
6.2	Material e métodos	87
6.2.1	Acessos de macieira	87
6.2.2	Tratamentos fitossanitários	87
6.2.3	Obtenção do isolado de <i>Venturia inaequalis</i>	88
6.2.4	Produção de inóculo	89
6.2.5	Método de inoculação de plantas	89
6.2.6	Avaliações	90
6.3	Resultados e discussão	92
7.	CONCLUSÕES	98
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

CAPÍTULO II

1. Produção de conídios de *Venturia inaequalis* em cinco meios de cultura durante quatro períodos de incubação. Bento Gonçalves, RS. 2006 43
2. Tamanho das colônias de *Venturia inaequalis* crescidas em cinco meios de cultura durante dois períodos de incubação. Bento Gonçalves, RS. 2006 45
3. Produção de conídios de dois isolados de *Venturia inaequalis* em folhas destacadas de macieira da cultivar Gala durante dois períodos de incubação. Bento Gonçalves, RS. 2006 46

CAPÍTULO III

1. Acessos de macieiras usados como diferenciadoras de raças de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2005 .. 52
2. Origem dos isolados de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2005 53
3. Reações de acessos de macieira a isolados da raça 1 de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2006 62

CAPÍTULO IV

1. Acessos de macieiras inoculados com *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2005 70
2. Origem dos isolados de *Venturia inaequalis* inoculados em nove acessos de macieiras. Bento Gonçalves, RS. 2005 71
3. Reações da interação de nove acessos de macieira com três isolados de *Venturia inaequalis*, com três métodos de inoculação. Bento Gonçalves, RS. 2006 82
4. Aparecimento dos sinais e/ou sintomas observados nas interações entre nove acessos de macieira com três isolados de *Venturia inaequalis*, com três métodos de inoculação. Bento Gonçalves, RS. 2006 83

CAPÍTULO V

1. Acessos de macieiras avaliados quanto a resistência a *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2005 88
2. Local de coleta dos seis acessos de macieiras antigas avaliados neste experimento. Bento Gonçalves, RS. 2006. 88

3.	Interação entre 19 acessos de macieira e o isolado A8-3 de <i>Venturia inaequalis</i> . Bento Gonçalves, RS. 2006	97
----	---	----

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Páginas
CAPÍTULO I	
1. Estruturas reprodutivas de <i>Venturia inaequalis</i> . (A) Ascósporos (BONETI et al., 2001a). (B) Conídios. (Foto: Guerra Schenato, 2005)	8
2. Ciclo de vida de <i>Venturia inaequalis</i> , agente causal da sarna da macieira (BONETI et al., 2001a)	10
CAPÍTULO II	
1. Regressão do tipo potência da produção de conídios de <i>Venturia inaequalis</i> em cinco meios de cultura durante quatro períodos de incubação. Bento Gonçalves, RS. 2006	43
CAPÍTULO III	
1. Reações observadas entre nove acessos de macieira diferenciadores de raças de <i>Venturia inaequalis</i> com três isolados. Bento Gonçalves, RS. 2006	65
CAPÍTULO IV	
1. Reação de nove acessos de macieiras inoculados com o isolado A8-3 de <i>Venturia inaequalis</i> com três métodos de inoculação. Bento Gonçalves, RS. 2006	81
CAPÍTULO V	
1. Reação das macieiras antigas e outros acessos ao isolado A8-3 de <i>Venturia inaequalis</i> . Bento Gonçalves, RS. 2006..	96

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da macieira teve seu início no Brasil na primeira década de 1900, no Instituto Agrônomo de São Paulo, quando um pomólogo alemão iniciou trabalhos com espécies frutíferas. A produção brasileira de maçãs foi feita a seguir em outros Estados brasileiros e em 1975 atingiu 1.528 t (BONETI et al., 2001b). Em 2005, a produção do país abasteceu o consumo interno e consolidou a presença deste produto no mercado externo alcançando 843.919 t (FAO, 2006). Na atualidade os Estados que lideram a produção são Santa Catarina, com 59,8% da produção, seguido pelo Rio Grande do Sul, com 36,7% (IBGE, 2006).

Nas principais cultivares de macieira (*Malus x domestica* Bork.) em uso comercial no Brasil, 'Gala' e 'Fuji' (BONETI et al., 2002b), observa-se alta suscetibilidade às principais doenças da cultura, o que limita a competitividade do sistema produtivo, especialmente, nos sistemas alternativos de cultivo, tais como na Produção Integrada e na Produção Orgânica.

A sarna da macieira, causada pelo fungo ascomiceto *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint., é a principal doença do cultivo na maioria dos países produtores, sendo mais importante nas regiões de clima temperado e úmido. A infecção nas folhas se manifesta através de manchas cor verde-oliva e nos frutos provoca rachadura, deformação, além da sua queda prematura. Os danos causados pela

doença se manifestam pela queda das folhas, flores e frutos, o que causa redução do vigor das plantas, e depreciação do valor comercial das maçãs.

No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez no ano de 1950, no Estado de São Paulo. Com a expansão da cultura no sul do país a doença tornou-se amplamente distribuída.

O controle da sarna da macieira é realizado, principalmente, com aplicação de fungicidas. Contudo, o uso de fungicidas “sítio específico”, como os IBEs e estrobirulinas, a longo prazo, podem ocasionar pressão de seleção sobre o patógeno induzindo o aparecimento de isolados resistentes. O uso inadequado destes produtos pode contaminar o meio ambiente e comprometer a saúde humana, além de aumentar significativamente o custo de produção.

Estima-se que os gastos com tratamentos fitossanitários representem cerca de 28% do custo da produção de maçãs no Brasil. Considerando que o custo por hectare varia em torno de R\$ 12.500,00, em Santa Catarina onde há uma área plantada de 18.428 ha, os gastos com fungicidas podem ultrapassar R\$ 60 milhões por ano. Desse modo, a incorporação da resistência genética coloca-se como estratégia, dos pontos de vista econômico e ambiental, relevante para todos os sistemas de cultivo, quer seja convencional ou não.

Cultivares de macieira, dotadas de resistência à sarna, têm sido lançadas em diversos países. O gene *Vf*, derivado do clone 821 da espécie silvestre *Malus floribunda* Sielbold ex Van Houtte, tem sido amplamente usado nos programas de melhoramento estando em mais de 80% das cultivares lançadas como resistentes à sarna até hoje. O emprego dessa fonte de resistência tem sido explorado no Brasil pelo programa de melhoramento genético de macieira da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI).

O surgimento, em diferentes locais da Europa, de isolados de *V. inaequalis*, capazes de superar a resistência existente nos materiais lançados, aponta para a necessidade de revisão das estratégias adotadas nos programas de melhoramento no sentido de explorar a resistência durável. Com esse enfoque, o consórcio DARE (Durable Apple Resistance in Europe), estabelecido por vários países europeus, tem buscado detectar fontes de resistência durável a doenças em materiais antigos de macieira.

Nas principais regiões produtoras de maçã da Europa e de outros continentes, se conhece a existência de pelo menos oito raças fisiológicas de *V. inaequalis*. No Brasil diversas instituições vêm conduzindo programas de melhoramento da macieira para resistência à sarna sem ainda serem conhecidas as raças de *V. inaequalis* presentes no país. Este fato constitui um risco, pois se no país ocorressem raças que infectassem as cultivares resistentes já desenvolvidas, muito do investimento feito até o presente seria perdido.

Este trabalho teve como objetivos: a) identificar as raças fisiológicas de *V. inaequalis* existentes em pomares de macieira no Sul do Brasil; b) comparar a reação de *V. inaequalis* em folhas de macieira destacadas ou não; e, c) avaliar a resistência de acessos de macieiras antigas à sarna.

CAPÍTULO I

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A macieira

Pertencente à família Rosaceae, subfamília Pomoideae e gênero *Malus*, a macieira cultivada é denominada *Malus x domestica* Borkhausen. Esta descrição foi proposta em 1803 e reconhecida pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica (IUCHI, 2002).

A macieira possui características típicas de árvores frutíferas de clima temperado caducifólias, com grande período de juvenilidade. São necessários, em média, de três a quatro anos para a produção de frutos. É uma frutífera que necessita anualmente de um período de dormência fisiológica para restabelecimento de reservas nutricionais e hormonais para produção de frutos na estação de crescimento. A macieira cultivada *M. x domestica* é originária de regiões temperadas com frio hibernal que atingem temperaturas negativas, portanto essas plantas tornam-se dormentes para sobreviverem sob condições de extremo frio (JANICK et al., 1996; PETRI et al., 2002).

Além disso, a macieira é considerada uma planta monóica porque possui flores hermafroditas com gineceu e androceu viáveis. Contudo, o modo de

reprodução predominante é a alogamia, onde ocorre fecundação cruzada entre plantas diferentes. A polinização cruzada é feita principalmente por insetos. Por estas características, pomares comerciais devem conter uma proporção da cultivar polinizadora e presença de insetos vetores de pólen para garantirem a produção de frutos (PETRI, 2002).

A maioria das espécies *Malus* sp. é facilmente hibridizada, o que pode explicar a contribuição de espécies europeias e asiáticas para a evolução das cultivares atuais e vir a justificar, juntamente com a hipótese de isolamento geográfico recente, a ausência de divergência genética entre espécies. Isto é vantajoso sob o ponto de vista do melhoramento genético, porque possibilita a transferência de genes entre espécies, inclusive entre aquelas silvestres (MACHARDY, 1996).

A macieira possui número básico de cromossomos igual a 17 ($x=17$), sendo que a maioria das espécies cultivadas é diplóide ($2n=2x=34$), com algumas exceções de triplóides e tetraplóides que surgiram espontaneamente a partir de fertilização entre gametas não reduzidos e foram aproveitadas pelo melhoramento genético através da propagação vegetativa (HUARACHA et al., 2004; PETRI, 2002).

2.2 A sarna da macieira

2.2.1 Sintomas

A sarna da macieira resulta em sintomas na parte aérea de macieiras, incluindo folhas, pecíolos, flores, sépalas, frutos, pedicelos, brotos jovens e escamas das gemas. Os sintomas são mais visíveis e sérios em folhas e frutos.

As primeiras lesões, geralmente, são vistas na face inferior das folhas expandidas, porém, uma vez abertas, a face superior também se torna vulnerável à infecção. Nas folhas mais velhas, as lesões normalmente aparecem na superfície e são menores. As lesões são inicialmente oliváceas e irregulares e logo após, tornam-se verde-oliváceas a cinza com superfície aveludada, devido a produção de conídios. Posteriormente, as lesões parecem preto-metálicas e podem ser levemente elevadas. Os tecidos afetados podem se tornar distorcidos e enrugados. Folhas e frutos severamente infectados freqüentemente sofrem queda (MACHARDY, 1996; AGRIOS, 1997; JONES & SUTTON, 1984).

A maior perda econômica para os produtores de maçãs é a redução da qualidade dos frutos infectados, levando a depreciação do seu valor comercial. Os frutos são mais suscetíveis quando jovens. Nestes, a infecção resulta em lesões maiores e, normalmente, na distorção dos mesmos. Em frutos mais maduros lesões menores e secundárias se desenvolvem próximo as lesões primárias. As maçãs se tornam mais resistentes quando atingem a maturidade e as lesões se desenvolvem mais lentamente podendo até não serem visíveis no momento do armazenamento. A infecção pode causar significativa desfolhação por dois ou três anos sucessivos e resultar em plantas enfraquecidas que são mais suscetíveis a danos no período de armazenamento, injúria por insetos e outras doenças. As lesões reduzem a área fotossintética das folhas, podendo reduzir o crescimento e retardar o desenvolvimento das plantas infectadas. Os sintomas nas florescências normalmente ocorrem como lesões pequenas e verde-escuras na base das flores, nas sépalas e nos pedicelos antes e durante a floração. Quando os pedicelos são infectados, os frutos em desenvolvimento podem cair, resultando na diminuição da produção (MACHARDY, 1996; AGRIOS, 1997; JONES & SUTTON, 1984).

2.2.2. Agente causal

O agente causal da sarna da macieira, *Venturia inaequalis*, é um fungo ascomiceto filamentoso pertence à família Venturiaceae e possui fase anamorfa correspondente a *Spilocaea pomi* Fr. (LUZ, 2001).

O gênero *Venturia* consiste principalmente de espécies fitopatogênicas que atacam folhas e frutos de importantes frutíferas. Os membros deste gênero possuem ascósporos septados produzidos em ascocarpos (pseudotécios) com ascos bitunicados. As 52 espécies do gênero *Venturia* (SIVANSEN, 1977) estão associadas com as fases anamorfas *Spilocaea*, *Fusicladium* e *Cladosporium*. A separação do gênero é baseada em critérios morfológicos e a identificação é auxiliada pela estreita especificidade com o hospedeiro exibida em cada espécie (SCHNABEL et al., 1999).

Venturia inaequalis produz pseudotécios (120 a 225 μm de diâmetro) agrupados ou dispersos nas folhas caídas sobre o solo. Esta estrutura reprodutiva possui formato globoso ligeiramente papilado no ostíolo. Os ascos, 50 a 100 por pseudotécio, são longos, cilíndricos, bitunicados, medindo 60 a 70 por 7 a 12 μm e contêm oito ascósporos. Os ascósporos (13 a 18 por 6 a 8 μm) são septados na terça parte superior, hialinos quando novos e castanhos claros quando maduros. A parte superior apresenta um formato cônico e a inferior arredondado (Figura 1A) (BONETI et al., 2002a; MELZER & BERTON, 1989; BONETI et al., 2001a; SIVANSEN, 1977).

Na sua fase anamorfa, *V. inaequalis* possui micélio hialino quando jovem, o qual vai escurecendo com o passar do tempo, formando um estroma subcuticular ou intraepidermal. Os conidióforos formados a partir do estroma são curtos (5 a 6 μm), eretos, entumecidos na base, de cor castanha e comprimento variável, em

média 90 μm . Apenas um conídio (12 a 30 por 6 a 10 μm) é formado na ponta de cada conidióforo, e possui cor castanha, liso, geralmente bi-celulado e de formato oval (Figura 1B) (MELZER & BERTON, 1989; BONETI et al., 2001a; SIVANSEN, 1977).

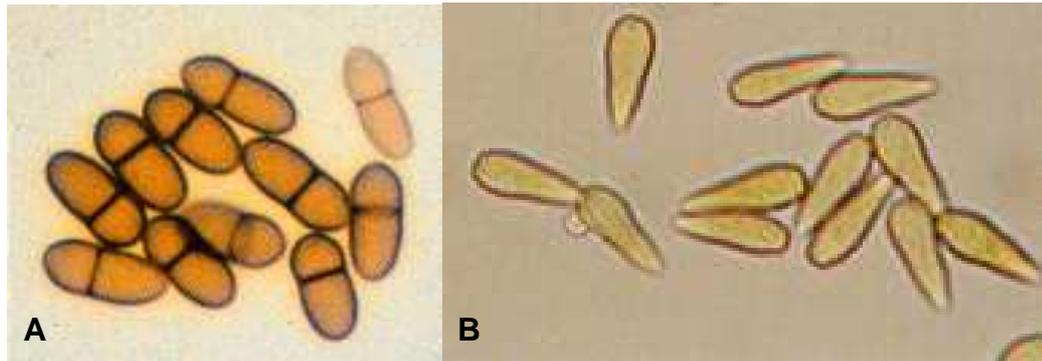


FIGURA 1. Estruturas reprodutivas de *Venturia inaequalis*. **(A)** Ascósporos (BONETI et al., 2001a). **(B)** Conídios (Foto: Paula Guerra Schenato, 2005).

O ciclo de vida do fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. (Figura 2) é constituído de duas fases distintas: fase saprofítica ou sexuada que ocorre durante o período de repouso da macieira, nas folhas caídas sobre o solo, e a fase parasítica ou assexuada, que se manifesta durante o período vegetativo da macieira (JONES & SUTTON, 1984).

No outono, após a queda natural das folhas e a morte das suas células, o micélio do fungo penetra no tecido do hospedeiro e inicia a formação do pseudotécio. Para tanto, o anterídio e o ascogônio precisam ser oriundos de indivíduos distintos, uma vez que o fungo é tipicamente heterotático (KEITT & PALMITER, 1938). O pseudotécio forma-se durante o outono e o inverno, sendo que a temperatura ideal é de 4 $^{\circ}\text{C}$, não havendo formação em temperatura igual

ou superior a 15 °C (BONETI et al., 2002a). A ausência de umidade também é um fator limitante na formação dos pseudotécios, não ocorrendo em folhas muito secas. Dentro de cada pseudotécio encontram-se os ascos, nos quais são formados oito ascósporos bicelulares oliváceos. Os ascósporos são responsáveis pela infecção primária. Os conídios podem sobreviver no interior das gemas, em campos com alta incidência de sarna na estação anterior, e produzir infecções primárias (MACHARDY, 1996; ABURTO et al., 2004). Contudo, isto ainda não tem sido constatado no Brasil.

A produção e a maturação dos ascósporos ocorrem durante o final do inverno e início da primavera, em temperaturas de 16 a 18 °C, não ocorrendo em temperaturas superiores a 24 °C. Os pseudotécios e ascósporos amadurecem de modo intermitente (BONETI & KATSURAYAMA, 1999). Normalmente, alguns pseudotécios possuem ascósporos maduros quando inicia o florescimento. Em algumas estações, os esporos maturam pela quebra das gemas. O umedecimento das folhas que estão sobre o solo provoca o alongamento do asco maduro forçando sua passagem através do ostíolo e liberando os ascósporos. As correntes de ar são responsáveis pela disseminação dos ascósporos sobre as folhas das plantas. A maturação e a liberação dos ascósporos normalmente levam de cinco a nove semanas (JONES & SUTTON, 1984).

A liberação dos ascósporos ocorre, principalmente, durante o dia e em períodos chuvosos. A luz, notadamente o infravermelho (710 a 730 nm), afeta diretamente a liberação. Cerca de 96 a 97% dos ascósporos são liberados durante o dia e somente 3 a 4% durante a noite. O máximo de descarga é observado entre 3 e 6 horas após o início da chuva (BONETI & KATSURAYAMA, 1999).

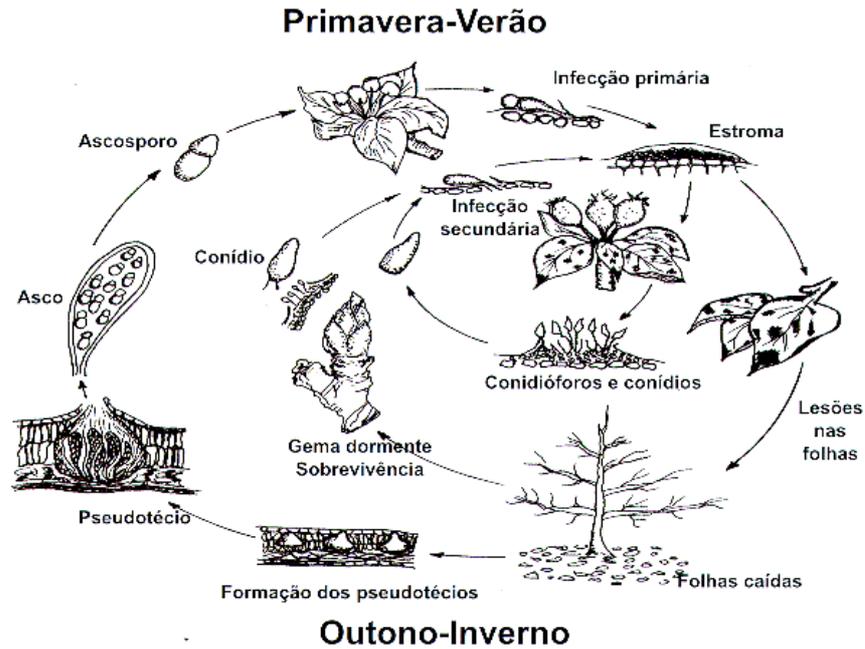


FIGURA 2. Ciclo de vida de *Venturia inaequalis*, agente causal da sarna da macieira (BONETI et al., 2001a).

A germinação inicia quando os ascósporos ou conídios encontram folhas jovens ou frutos com um filme d'água presente. O número de horas requerido para infecção varia com a temperatura predominante. De acordo com a tabela de Mills (JONES & SUTTON, 1984), em temperatura média de 16,1 °C o período mínimo é de 9 h para que ocorra infecção leve, enquanto que a 6,1 °C são necessárias 21 h com água livre sobre a folha. Para causar infecção, os conídios requerem cerca de dois terços do tempo de molhamento foliar em relação aos ascósporos. Os produtores podem determinar se a infecção está ocorrendo notando o início da chuva, quando as folhas secam e qual foi a temperatura média durante o período de umidade, de acordo com a tabela de Mills. Este método é útil em decisões quando a aplicação de fungicidas é necessária (ABURTO et al., 2004).

A germinação dos ascósporos ocorre pela formação do tubo germinativo, em cuja extremidade se forma um apressório, do qual sai uma hifa de penetração delgada que perfura a cutícula e a parede externa das células da epiderme das folhas e frutos. Somente o micélio é que se estabelece no hospedeiro, subcuticularmente e de forma ramificada. Cerca de 9 a 17 dias após surge uma grande quantidade de conídios que pressionam as células provocando o rompimento e o aparecimento das lesões típicas da doença (JONES & SUTTON, 1984).

Os conídios são os responsáveis pela infecção secundária. A água, novamente, é o principal fator na disseminação do patógeno, pois provoca o inchamento dos conidióforos e a imediata liberação dos conídios. Estes são carregados pelos respingos de água e pela corrente de ar para outras partes da planta. Havendo água livre, os conídios começam a germinar de modo similar aos ascósporos. Enquanto que a germinação e a penetração dos conídios são altamente dependentes da umidade relativa e do período de molhamento foliar, o posterior desenvolvimento da patogênese é fundamentalmente dependente da temperatura. A expansão máxima das lesões ocorre a 19 °C, com pouca expansão a 0 °C ou acima de 26 °C. A produção de conídios é observada quando a umidade relativa do ar é maior que 60% (BONETI et al., 2002a; BONETI & KATSURAYAMA, 1999).

Vários ciclos da doença podem ocorrer durante a fase vegetativa, os quais dependem, do número de períodos de infecção e da presença de tecido suscetível do hospedeiro. O período de molhamento necessário para infecção dos frutos aumenta à medida que os mesmos vão se desenvolvendo, a partir da floração até a fase de maturação. De acordo com a tabela de Mills, a 20 °C são

necessárias cerca de 30 h de molhamento, enquanto que em temperaturas menores que 9,3 °C são necessárias 54 h. Apesar disso, os frutos em fase de maturação são passíveis de infecção, resultando na chamada sarna de verão (BONETI et al., 2002a).

A infecção secundária nos frutos pode ocorrer quando estes são colhidos, porém só aparecer depois de vários meses de armazenagem. A doença pode também se desenvolver nas folhas depois da colheita. Por causa disto, o nível de inóculo na primavera pode ser alto, mesmo que um bom programa de pulverização tenha sido feito no ano anterior (JONES & SUTTON, 1984).

No outono as folhas caem e o fungo inicia o processo de formação dos pseudotécios dando continuidade ao ciclo da doença. Em macieiras silvestres ou em pomares não tratados, o fungo pode se manter durante o inverno na forma de micélio ou de conídios presentes nas lesões que ocorrem nos ramos de crescimento. Entretanto, este modo de sobrevivência não assume grande importância ou ocorre muito raramente em pomares comerciais. Por outro lado, serve como via de disseminação da doença para novos plantios (BONETI & KATSURAYAMA, 1999). Com exceção do monitoramento do inóculo primário e da presença do patógeno no ciclo, não há outros estudos no Brasil sobre outras formas de sobrevivência de *V. inaequalis* no inverno.

2.2.3 Raças fisiológicas de *Venturia inaequalis*

A especialização fisiológica de *V. inaequalis* vem sendo estudada há muitos anos. Um sistema de diferenciação e denominação das raças foi desenvolvido para facilitar a obtenção e a apresentação destas informações (SHAY & WILLIAMS, 1956). As raças fisiológicas são um tipo de especialização

intra-específica, em que os isolados com virulência diferencial atacam somente alguns acessos da espécie hospedeira. A definição de uma raça se dá de acordo com as reações fenotípicas causadas pelos isolados quando inoculados em uma série de macieiras, denominadas diferenciadoras (FLOR, 1971; CAMARGO, 1995). Estas diferenciadoras normalmente são selecionadas pelo método de tentativa e erro sem o conhecimento do número ou identidade dos genes de resistência de cada planta. Um grupo de diferenciadoras em que cada membro possui apenas um único gene de resistência é mais eficaz e informativa em estudos de classificação e da variação de fitopatógenos (FLOR, 1971). A interação entre *V. inaequalis* e *M. domestica* segue o conceito gene-a-gene. Ou seja, para cada gene que condiciona resistência no hospedeiro há um gene correspondente no patógeno que condiciona virulência (FLOR, 1956; FLOR, 1971).

As primeiras raças fisiológicas de *V. inaequalis*, descritas em 1956, foram definidas a partir de suas relações com os clones Dolgo e Geneva e seleções do retrocruzamento de R12740-7A. A raça 1 foi definida como a raça mais freqüente nos Estados Unidos e em vários outros países. Esta provoca lesões necróticas sem esporulação e reação de resistência nos três grupos de germoplasma. A raça 2 é virulenta às três hospedeiras. Porém, 'Geneva' somente é suscetível em condições ambientais bem definidas. Isto é, a inoculação das plantas em casa de vegetação, cobertas por armação de madeira e cinco camadas de musselina, por 40-44 h e temperatura de 15 a 18 °C, com umidade mantida pela aspersão de água. Nestas condições 'Geneva' apresenta somente lesões necróticas, porém, apresenta esporulação se após 14 dias retornar a câmara úmida por 24 horas. A virulência incomum da raça 2 é controlada por três diferentes genes no patógeno,

cada um específico para um dos três acessos. A raça 3 provoca reação de resistência em 'Geneva'. A virulência desta raça nesta cultivar, é controlada por um único gene, diferente daquele que condiciona virulência em 'Geneva' com a raça 2 (SHAY & WILLIAMS, 1956). A raça 4 foi detectada em *M. pumila* R12740-7A, em Purdue, EUA. Este clone possui ao menos três pares de genes envolvidos com o processo de infecção com sarna, um dos quais confere resistência a raça 4 de *V. inaequalis* (WILLIAMS & KUC, 1969; SHAY et al., 1962).

O surgimento da raça 5 foi evidenciado quando seleções dos EUA, resistentes a *V. inaequalis*, desenvolveram lesões com esporulação na Inglaterra. Esta raça é diferenciada pelo gene de resistência presente em *M. micromalus* e *M. atrosanguinea* 804 (WILLIAMS & BROWN, 1968).

Em Ahrensburg, Alemanha, desde 1984, sintomas de sarna da macieira tem sido observados em pomares da cultivar Prima, classificada como resistente após avaliações em casa de vegetação. Em 1988, nesse local também foram encontradas lesões de sarna em algumas seleções que possuem o gene *Vf*. Em 1993, isolados destas lesões foram descritos como raça 6. Esta foi caracterizada por superar a resistência da maioria das cultivares portadoras do gene *Vf*, mas não a da progenitora deste gene, a ornamental *M. floribunda* clone 821. Até então, a resistência codificada pelo gene *Vf* vinha sendo considerada durável e estava sendo usada na maioria das cultivares lançadas nos programas de melhoramento do mundo todo (PARISI et al., 1993; PARISI & LESPINASSE, 1996; PARISI et al., 1994).

Outro tipo de isolado virulento ao gene *Vf* foi encontrado na Inglaterra, na ornamental *M. floribunda* (ROBERTS & CRUTE, 1994) e chamada raça 7. Esta raça é caracterizada por ser virulenta ao clone 821 de *M. floribunda*, mas

avirulenta à 'Golden Delicious' (PARISI et al., 2000). A resistência desta cultivar é devida a um único gene, chamado *Vg* (BENAOUF & PARISI, 1997). Isto explica porque a raça 7 não é virulenta a todas as cultivares *Vf* resistentes recentemente lançadas, pois algumas delas podem ter herdado o gene *Vg* de 'Golden Delicious', que é frequentemente usada em programas de melhoramento (PARISI et al., 2000).

A última raça de que se tem relatos é a raça 8. Indivíduos desta raça foram isolados de plântulas provenientes dos cruzamentos Royal Gala X *M. sieversii* GMAL4190-W188B e Royal Gala X *M. sieversii* GMAL3631-W193B. Não tem sido estabelecido dados sobre a origem desta nova raça e como ela se propagou na Nova Zelândia. Entretanto, é sabido que a raça 8 é virulenta a acessos da espécie silvestre *M. sieversii*, as quais são portadoras do gene de resistência *Vh8* (BUS et al., 2005a).

A presença de diversas raças de *V. inaequalis* tem sido constatada em alguns países da Europa. Na Espanha foram encontradas seis raças (1, 2, 3, 5, 6) causando sarna da macieira nas províncias de Gerona, Guipúzcoa e Navarra (MARTINEZ-BILBAO & MURILLO, 2005). As raças 1, 2, 3, 4, 6 e 7 foram relatadas em diferentes partes da Suécia (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005). Na Dinamarca, há relatos sobre a ocorrência de sete raças (1 a 7) (BENGTSSON et al., 2000). Entretanto, no Brasil e em outros países da América do Sul, as raças existentes de *V. inaequalis* são desconhecidas.

2.2.4 Requerimentos nutricionais de *Venturia inaequalis*

As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio de cultura influenciam o crescimento de *V. inaequalis*. Trinta e nove fontes de carbono foram avaliadas

adicionando-se, individualmente, 5 g.L⁻¹ de cada fonte em meio base (3,12 g.L⁻¹ KNO₃; 1,5 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,5 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1 g.L⁻¹ extrato de malte; 20 g.L⁻¹ ágar). Vinte e uma fontes de nitrogênio também foram adicionadas individualmente (42 mg.L⁻¹) em meio base contendo 5 g.L⁻¹ glucose; 1,5 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,5 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1 g.L⁻¹ extrato de malte; e, 20 g.L⁻¹ ágar. Após a adição do patógeno, os tubos foram incubados a 16 °C por cinco semanas. Os resultados mostraram que *V. inaequalis* é capaz de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio. Das 39 fontes de carbono testadas as que mais favoreceram o crescimento foram celobiose, dextrina, frutose, glucose, maltose, manitol, manose, melibiose, rafinose e sacarose. As fontes de nitrogênio incluem arginina, ácido glutâmico, histidina, prolina, uréia, nitrato de amônio, sulfato de amônio e nitrato de potássio (LEBEN & KEITT, 1948).

Cinco fontes de nitrogênio (Ca(NO₃)₂; KNO₃; (NH₄)SO₄; asparagina; peptona) foram adicionadas individualmente em meio basal (4% glucose, 0,004 M K₂HPO₄; 0,002 M MgSO₄.7H₂O; 2 ppm Zn e Mn; tiamina, piridoxina, ácido fólico, ácido nicotínico e ácido ascórbico) na presença e ausência de decocção de folhas de macieira. Nos meios sem decocção, a asparagina foi a fonte de nitrogênio que mais estimulou o crescimento. A variação da fonte inorgânica teve pouco efeito sobre o crescimento de *V. inaequalis*. Na presença da decocção houve maior variação nas respostas das culturas com as diferentes fontes de nitrogênio inorgânico e o maior estímulo de crescimento foi observado nos meios com asparagina e peptona (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955a). Usando-se como base o meio de cultura contendo 4% glucose, 0,008 M K₂HPO₄; 0,003 M MgSO₄.7H₂O; 0,002 M KCl; 0,0125 M NH₄NO₃; 2 ppm MnSO₄.4H₂O; e, 2 ppm

ZnSO₄.7H₂O, o nitrato de amônio mostrou ser melhor fonte de nitrogênio do que a asparagina (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955b).

A utilização de diferentes fontes de carbono por *V. inaequalis* também foi determinada em meio base contendo 0,008 M K₂HPO₄; 0,003 M MgSO₄.7H₂O; 0,002 M KCl; 0,0125 M NH₄NO₃; 2 ppm MnSO₄.4H₂O; 2 ppm ZnSO₄.7H₂O; tiamina; ácido ascórbico; ácido nicotínico; ácido fólico; e, piridoxina. Cada uma das fontes foi adicionada separadamente ao meio na concentração de 4%. Os resultados obtidos com a adição de celobiose, glucosidose e rafinose foram melhores do que os obtidos com a adição de glucose (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955b).

A presença de vitaminas no meio de cultura também influencia no crescimento de *V. inaequalis*. Usando-se como base o meio de cultura contendo 5 g.L⁻¹ glucose; 3,12 g.L⁻¹ KNO₃; 1,5 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,5 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1 g.L⁻¹ extrato de malte; e, 20 g.L⁻¹ ágar, a combinação de seis microelementos, caseína hidrolisada livre de vitaminas e 17 vitaminas, pode-se aumentar em até três vezes o crescimento do fungo. A incubação foi feita a 24 °C por três semanas. Em testes individuais, observou-se que a tiamina foi a única entre as 17 vitaminas que possui efeito benéfico sobre o crescimento de *V. inaequalis*. Utilizando-se como base o meio contendo 5 g.L⁻¹ glucose; 3,12 g.L⁻¹ KNO₃; 1,5 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,5 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 20 g.L⁻¹ ágar; sete microelementos (90 µg.L⁻¹ Zn; 20 µg.L⁻¹ Cu; 10 µg.L⁻¹ Mn; 5 µg.L⁻¹ B; 10 µg.L⁻¹ Mo; 100 µg.L⁻¹ Fe); e, caseína hidrolisada livre de vitaminas, a adição de 30 a 300 µg.L⁻¹ de tiamina estimula o crescimento de *V. inaequalis* (LEBEN & KEITT, 1948).

O crescimento de *V. inaequalis* também foi avaliado em meio base (4% glucose, 0,008 M K₂HPO₄; 0,003 M MgSO₄.7H₂O; 0,002 M KCl; 0,0125 M

NH_4NO_3 ; 2 ppm $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2 ppm $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) contendo sete vitaminas: $0,4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ biotina; $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ácido fólico; $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ tiamina; $1200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ piridoxina; $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ácido nicotínico; $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ riboflavina; e, $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ácido ascórbico. A omissão do ácido ascórbico provocou redução de 75% do crescimento (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955b).

O crescimento de *V. inaequalis* tem sido maior em meio basal (4% glucose, $0,004 \text{ M K}_2\text{HPO}_4$; $0,002 \text{ M MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,0375 \text{ M NH}_4\text{NO}_3$; 2 ppm Zn e Mn; tiamina, piridoxina, ácido fólico, ácido nicotínico e ácido ascórbico) contendo decocção de folhas de macieira e tiamina do que em meio com decocção e sem tiamina (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955a).

Os aminoácidos presentes na decocção de folhas de macieira têm sido determinados por cromatografia e seus efeitos têm sido testados em culturas com e sem tiamina. Nas seis macieiras avaliadas foram encontrados ácido aspártico, serina, alanina e valina. Ácido glutâmico, fenilalanina, glicina, isoleucina, asparagina e glutamina foram encontrados apenas em alguns acessos. Os aminoácidos foram testados separadamente ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em meio base (4% glucose, $0,004 \text{ M K}_2\text{HPO}_4$; $0,002 \text{ M MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,0375 \text{ M NH}_4\text{NO}_3$; 2 ppm Zn e Mn; tiamina, piridoxina, ácido fólico, ácido nicotínico e ácido ascórbico) com e sem tiamina. Os aminoácidos isoleucina, glutamina, serina e fenilalanina possuem efeito diferencial no crescimento de *V. inaequalis* (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955a).

O crescimento de culturas oriundas de um único ascósporo foi testado em meio basal (4% glucose, $0,004 \text{ M K}_2\text{HPO}_4$; $0,002 \text{ M MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,0375 \text{ M NH}_4\text{NO}_3$; 2 ppm Zn e Mn; tiamina, piridoxina, ácido fólico, ácido nicotínico e ácido ascórbico) contendo decocção de folhas de oito acessos de macieiras. As

decoções foram preparadas pela fervura de 25 g.L⁻¹ de folhas secas durante 30 minutos. O maior crescimento observado nestes meios, em relação ao meio sem decoção, indica que as folhas de macieira possuem substâncias que estimulam o crescimento de *V. inaequalis*. O uso deste mesmo meio basal com 1 ppm de ácido β-indolylacético e 80 ppm de manganês mostrou que na ausência da decoção de folhas de macieira nenhum destes aditivos aumentou o crescimento de culturas de *V. inaequalis*, porém na presença, ambos estimularam (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955a).

2.2.5 Outros fatores que afetam o crescimento de *Venturia inaequalis*

Estudos exploratórios mostraram que a temperatura e o pH favoráveis para o crescimento de *V. inaequalis* em meio de cultura ocorre na faixa de 16 e 24 °C e pH entre 5,1 e 6,4 (LEBEN & KEITT, 1948). Em meio de cultura contendo NH₄NO₃, K₂HPO₄, MgSO₄, KCl, Mn, Zn, glucose e as vitaminas tiamina, ácido ascórbico, ácido nicotínico, ácido fólico e piridoxina, o pH ótimo para o crescimento de *V. inaequalis* é 5,8. Valores inferiores provocam diminuição do crescimento, o qual não ocorre em pH 3,4. Acima de pH 5,8 o crescimento é menor, porém ainda razoável em pH 7,0 (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955b).

Em meio de cultura contendo 1,5 g K₂HPO₄; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 1,8 g KNO₃; 5,0 g glucose; 5 µg.L⁻¹ B; 10 µg.L⁻¹ Mn; 20 µg.L⁻¹ Cu; 90 µg.L⁻¹ Zn; 100 µg.L⁻¹ Fe; 100 µg.L⁻¹ Co; 250 µg.L⁻¹ tiamina; 1,25 µg.L⁻¹ biotina; 1000 µg.L⁻¹ inositol; 500 µg.L⁻¹ ácido pantotênico; 500 µg.L⁻¹ ácido nicotínico; e, 125 µg.L⁻¹ piridoxina, foi demonstrado que a concentração de esporos e a idade das culturas usadas como inóculo inicial não afetam a produção de conídios. Neste meio também foi demonstrado que a produção ótima de conídios das raças 1 a 5

ocorre após 16 e 19 dias de incubação, a 16 °C (ROSS, 1974). A exposição a luz contínua também estimula a produção de conídios de *V. inaequalis* (PARKER et al., 1995).

2.3 O controle da sarna da macieira

2.3.1 Práticas culturais

A prevenção da formação de pseudotécios nas folhas provavelmente eliminaria a sarna da macieira. Entretanto, a completa eliminação dos pseudotécios não é possível sob condições de campo com os métodos atuais. A severidade da doença pode ser reduzida com a aplicação de uma solução de 5% de uréia na folhagem para acelerar a decomposição das folhas no outono. As aplicações podem ser feitas antes das folhas caírem, evitando o estímulo de crescimento e a predisposição das plantas a injúrias de inverno. Poda aberta, permitindo a passagem do vento para reduzir o tempo de molhamento das folhas e frutos, também é recomendada. Além disso, essa prática permite maior penetração dos fungicidas pulverizados (ABURTO et al., 2004; JONES & SUTTON, 1984).

2.3.2 Controle químico

O manejo da sarna, através da aplicação de fungicidas, está focado na prevenção da infecção primária pelos ascósporos que são liberados na primavera. As estratégias usadas atualmente estão baseadas na dinâmica do transporte aéreo dos ascósporos. O processo envolvido na maturação dos ascósporos e na sua ejeção dos pseudotécios, a partir das folhas em decomposição sobre o solo, tem sido bastante estudado e modelos simulando este processo têm sido

desenvolvidos (GADOURY & MACHARDY, 1986; ROSSI et al., 2001; GADOURY & MACHARDY, 1982; HOLB et al., 2005). Com base nestes modelos, os fungicidas são aplicados quando uma quantidade significativa de ascósporos é encontrada no ar concomitantemente com condições meteorológicas favoráveis ao estabelecimento da infecção (ROSSI et al., 2003).

Os fungicidas usados no controle da sarna da macieira são geralmente de dois tipos: protetores e sistêmicos. A maioria dos produtores usam uma combinação dos dois para atingir maior eficácia. Os fungicidas protetores são aplicados nas folhas e frutos antes da infecção, prevenindo que os esporos germinem ou penetrem do tecido foliar. As aplicações são feitas em intervalos de sete a dez dias ou de acordo com os períodos de chuva. Os fungicidas sistêmicos podem penetrar nas folhas, flores e frutos imaturos para inibir o desenvolvimento das lesões. A extensão da atividade pós-infecção é limitada para poucas horas ou dias do início da infecção (AGRIOS, 1997; JONES & SUTTON, 1984).

O uso contínuo do mesmo fungicida ou com igual princípio ativo, ano após ano, ocasiona alta e contínua pressão de seleção sobre o patógeno induzindo o aparecimento de isolados resistentes (JONES & SUTTON, 1984). Problemas de resistência têm sido relatados para vários fungicidas (KOLLER et al., 2004; KOLLER et al., 1997; KOLLER et al., 1999; OLAYA & KOLLER, 1999; SALLATO & LATORRE, 2006).

2.3.3 Melhoramento genético

O melhoramento para a resistência à sarna da macieira tem sido o principal objetivo na maioria dos programas de melhoramento da macieira pelo mundo

(BROWN et al., 2004; LEFRANCQ et al., 2004; ZURAWICZ et al., 2004; PEIL et al., 2004; DAPENA & BLÁZQUEZ, 2004; VOLZ et al., 2004). Cultivares dotadas de resistência têm sido liberadas em diversos países (KORBAN et al., 2003b; NYBOM, 2004; KHANIZADEH et al., 2003; KHANIZADEH et al., 2006), inclusive no Brasil (BONETI et al., 1996; DENARDI & CAMILO, 1998). Entretanto, estas cultivares não tem sido plantadas comercialmente, em parte devido a insuficiente qualidade de fruto (SANDSKAR & GUSTAFSSON, 2002; JÖNSSON, 2004).

O gene *Vf*, derivado do clone 821 da espécie silvestre *M. floribunda*, tem sido bastante usado nos programas de melhoramento para resistência à sarna da macieira, estando em mais de 80% das cultivares resistentes lançadas até o momento (CROSBY et al., 1992; LAURENS, 2005). A resistência associada ao gene *Vf* foi considerada durável, pois as cultivares mantiveram-se resistentes por mais de 50 anos. Entretanto, com o surgimento das raças 6 e 7 de *V. inaequalis*, a resistência codificada por este gene foi superada. A raça 6 é virulenta à maioria das cultivares *Vf*⁺, mas avirulenta à *M. floribunda* clone 821 (PARISI et al., 1993; ROBERTS & CRUTE, 1994), que possui também o gene *Vfh* (BENAOUF & PARISI, 2000). A raça 7 se caracteriza por ser virulenta à *M. floribunda* 821, mas avirulenta a 'Golden Delicious', portadora do gene *Vg* (BENAOUF & PARISI, 2000; PARISI et al., 2000).

Para controlar a propagação destas raças foi montado o projeto europeu Durable Apple Resistance in Europe (DARE). O projeto teve início em 1998 e terminou em 2002. Nove países europeus se associaram combinando conhecimentos em genética, patologia, melhoramento e fruticultura. Os principais objetivos foram caracterizar a resistência de uma grande quantidade de cultivares de macieira; caracterizar a virulência e a diversidade de *V. inaequalis* e

Podosphaera leucotricha (Ellis & Evhart) Salmon., para avaliar o risco do aparecimento de novos isolados virulentos; e, estudar as bases genéticas da resistência à sarna da macieira e ao oídio. Outro objetivo foi desenvolver marcadores moleculares utilizáveis pelos melhoristas para a seleção molecular assistida (HARTMAN et al., 2000; LAURENS, 2005).

Em geral, todos os programas seguem a mesma estratégia, ou seja, uma série de retrocruzamentos entre híbridos resistentes e cultivares comerciais suscetíveis. Em cada passo da seleção, híbridos com resistência e alta qualidade de fruto são selecionados e cruzados com outras cultivares comerciais (LAURENS, 2005). O melhoramento de macieiras é um processo demorado e dispendioso. Normalmente são requeridos cerca de vinte anos desde a seleção da primeira plântula até a obtenção de uma nova cultivar comercializável (SANDSKAR & GUSTAFSSON, 2002).

2.3.3.1 Fontes de resistência

O surgimento de raças de *V. inaequalis* capazes de superar a resistência existente nos materiais lançados aponta para a necessidade de exploração de novas fontes de resistência nos programas de melhoramento, incluindo resistência quantitativa. Vários genes de resistência têm sido identificados em germoplasmas de macieira.

Até 1969, cinco genes de resistência foram identificados em espécies silvestres de macieiras: *Vf* em *M. floribunda* clone 821, *Vr* em *M. pumila*, *Vm* em *M. micromalus*, *Vb* em *M. baccata* e *Vbj* em *M. baccata jackii* (WILLIAMS & KUC, 1969). Um sexto gene de resistência, *Va*, foi identificado na cultivar Antonovka P.I. 172623 (LESPINASSE, 1989). Outros oito genes de resistência foram

recentemente identificados: *Vfh* em *M. floribunda* clone 821 (BENAOUF & PARISI, 2000); *Vg* em 'Golden Delicious' e 'Prima' (CALENGE et al., 2004; BENAOUF & PARISI, 1997; DUREL et al., 2000); *Vx* em *M. pumila* R12740-7A (HEMMAT et al., 2002); *Vh2* e *Vh4* em dois acessos derivados de *M. pumila* R12740-7A (BUS et al., 1999), que podem ser *Vr* e *Vx*, respectivamente (BUS et al., 2005b); *Vr2* em R12740-7A (PATOCCHI et al., 2004); *Vh8* em um acesso de *M. sieversii* (BUS et al., 2004); e, *Vd* em 'Durello di Forlì' (TARTARINI et al., 2004).

Acessos de macieiras antigas, oriundos do Estado do Rio Grande do Sul, constituem uma reserva genética para esta cultura. O termo "macieiras antigas" refere-se a macieiras plantadas há mais de 50 anos, em propriedades rurais e pomares caseiros, que continuam produzindo e sobrevivendo mesmo sem tratamentos fitossanitários. Estas plantas, identificadas com o auxílio de produtores e agentes da Extensão Rural (Emater, RS), possuem origem desconhecida podendo serem locais ou introduzidas. Algumas destas plantas antigas possuem potencial para o uso no melhoramento genético visando a resistência durável à sarna da macieira (OLIVEIRA et al., 2005; VALDEBENITO-SANHUEZA & OLIVEIRA, 2006). Programas de melhoramento de vários países têm montado coleções de macieiras antigas. Essas plantas são avaliadas quanto as suas características agrônômicas e resistência à doenças, especialmente, à sarna da macieira (LEFRANCQ et al., 2004; TARTARINI et al., 2004). Na Hungria, várias cultivares de macieira com 30 a 100 anos, foram identificadas como promissoras fontes genéticas para o melhoramento de novas cultivares (TÓTH et al., 2004). Cinco cultivares da região de Carpathians, Ucrânia, foram testadas quanto a resistência à sarna da macieira, entre outras características de importância comercial. Todas elas, 'Zimnica', 'Kamyanka', 'Baracke', 'Dimyanka' e

'Dobrokvaska', mostraram-se resistentes, com poucas e pequenas lesões de sarna, demonstrando que são uma importante fonte genética para ser usada em programas de melhoramento (ZAYATS, 2000).

2.3.3.2 Resistência ontogênica

Folhas jovens (não expandidas, expandidas ou recentemente expandidas) de macieiras são mais suscetíveis a *V. inaequalis* do que folhas maduras (totalmente expandidas). Esta resistência relativa, chamada de resistência ontogênica, pode se manifestar de duas maneiras. Primeiro, a densidade de lesões diminui com o aumento da idade de folha. Segundo, o aumento do período de incubação aumenta com o aumento da idade da folha. Lesões visíveis em folhas maduras resultam da infecção quando as folhas são ainda jovens. Quando as folhas se tornam totalmente expandidas, a resistência ontogênica começa a se expressar, levando a inibição de infecção e/ou crescimento micelial (MACHARDY, 1996). Assim, espera-se que novas lesões de sarna não possam se desenvolver em folhas maduras no outono. Entretanto, tem se observado considerável número de lesões de sarna no outono, que podem não somente ser resultado de infecções inibidas, mas também de novas infecções (KOHL & KOLLAR, 1994).

O crescimento micelial em folhas senescentes, mostra que os conídios de *V. inaequalis* podem infectar a superfície das folhas de macieira em qualquer idade. Em folhas jovens, o micélio cresce mais rápido e os sintomas se tornam visíveis antes do que em folhas maduras. Em folhas maduras com três a quatro meses de idade, o micélio cresce lentamente e em quantidade insuficiente para apresentar sintomas visuais. Porém, algumas destas lesões sem sintomas visíveis podem produzir conídios. Ou seja, a resistência ontogênica não impede

completamente os conídios de infectarem ou penetrarem nas folhas. (LI & XU, 2002).

A superação da resistência em folhas maduras de macieira por *V. inaequalis* pode ser devido a mudanças fisiológicas que ocorrem nas folhas no início da senescência. Como consequência, as folhas maduras podem se tornar novamente suscetíveis ao final da estação, resultando em novas lesões visíveis (KOHL & KOLLAR, 1994). Esta epidemia de outono pode ter implicações significativas para o manejo da doença, pois pode fornecer inóculo primário adicional para a próxima primavera (MACHARDY, 1996). Isto sugere que o nível de resistência à sarna da macieira em folhas senescentes deva também ser considerado como um dos critérios de seleção em programas de melhoramento.

2.4 Métodos de identificação de raças fisiológicas de *Venturia inaequalis*

A identificação de raças fisiológicas de *V. inaequalis* tem sido feita em experimentos em câmara de crescimento, casa de vegetação e campo. Na Espanha, foram usadas sete macieiras como diferenciadoras: 'Gala', *M. pumila* TSR34T132, *M. pumila niedzwetziana* Geneva, *M. pumila* TSR33T239, *M. micromalus* 9-AR2T196, *M. floribunda* clone 821 e 'Prima'. As plantas foram inoculadas com suspensão de $2,5 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ preparada a partir de folhas com lesões de sarna coletadas em pomares comerciais e domésticos. Dezesete dias após a inoculação, o tipo de sintomas foi avaliado usando-se escala previamente descrita (CHEVALIER et al., 1991) e a esporulação foi avaliada em discos foliares de 1 cm de diâmetro (MARTINEZ-BILBAO & MURILLO, 2005). Na Suécia, foram utilizados 13 acessos de macieira para a identificação de raças:

'Gala', 'Golden Delicious', *M. pumila* TSR34T132, *M. pumila niedzwetziana* Geneva, *M. pumila* TSR33T239, *M. micromalus* 9-AR2T196, *M. floribunda* clone 821, 'Prima', 'Florina', *M. pumila* R127.40.7A, *M. baccata jackii* Generos e 'Antonovka' PI 172623. O inóculo de treze isolados foi preparado a partir de folhas com lesões de sarna, frescas e congeladas, e isolados monoconidiais e ajustados para $2-3 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹. Após a inoculação as macieiras foram mantidas em câmara de crescimento com 18-20 °C, 100% de umidade e ausência de luz, por dois dias e depois transferidas para casa de vegetação com 80% de umidade ou mantidas na câmara de crescimento. Três semanas após a inoculação, as plantas foram avaliadas quanto ao tipo de reação observado nas folhas e número de folhas com sinais (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005).

Além disso, a identificação de raças na Suécia também foi feita no campo. As diferenciadoras foram plantadas em vasos, os quais foram deixados em pomares não podados. As avaliações foram feitas um e três meses após a colocação das plantas no campo (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005). Na Dinamarca, a identificação de raças de *V. inaequalis* também foi feita no campo utilizando-se 16 acessos como diferenciadoras: 'Jonagold', 'Golden Delicious', 'Akane', 'Dolgo', uma diferenciadora da raça 2, uma da raça 3, uma da raça 4 e três da raça 5, 'Florina', 'Prima', 'X2594', 'Nova Easygro', *M. floribunda* clone 821 e 'Freedom'. As macieiras foram enxertadas e plantadas no campo. Quatro anos após o plantio as macieiras foram avaliadas quanto ao tipo de sintoma nas folhas e nos frutos (BENGTSSON et al., 2000).

2.5 Métodos de isolamento de *Venturia inaequalis*

Venturia inaequalis pode ser isolado e cultivado em meio de cultura e na maioria dos trabalhos, tem sido relatado apenas que o isolamento foi feito a partir de um único conídio (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005; BUS et al., 2005b; BENAOUF & PARISI, 1998; PARISI et al., 1993; PUTTOO & CHAUDHARY, 1988; TENZER & GESSLER, 1999; SHAY & WILLIAMS, 1956). Poucos trabalhos trazem detalhes sobre o protocolo usado no isolamento. Um deles relata que lesões primárias foram lavadas em 5 μL de água esterilizada e a concentração diluída para $15\text{-}20 \times 10^3$ conídios. mL^{-1} . Entre 1 e 5 μL desta suspensão foram distribuídos em meio ágar (1,2 % ágar, 1,5 % extrato de malte, 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ terramicina) e incubados por 24 horas a 20 °C. Sob microscópio invertido, um único conídio foi transferido para placas contendo meio ágar e incubados a 20 °C (SIEROTZKI et al., 1994). O isolamento deste patógeno também tem sido feito a partir de ascósporos (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955a).

2.6 Métodos de produção de conídios de *Venturia inaequalis*

Conídios de *V. inaequalis* podem ser produzidos em diferentes meios de cultura. Decocções de partes da macieira têm sido adicionados aos meios para estimular a produção de conídios. Um exemplo é o uso do meio ágar Czapek-Dox (2 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ NaNO_3 ; 1 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 ; 0,5 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ KCl) suplementado com decocção de 20 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ de folhas frescas, brotos ou casca de fruto de macieira (DHINGRA & SINCLAIR, 1995).

Entre os meios a base de batata, ágar e dextrose, o cultivo em meio BDA diluído (40 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ batata, 5 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ dextrose, 17 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ ágar) e BDA diluído com 0,3% de extrato de levedura, por duas semanas a 15 °C, também fornecem boa produção

de conídios (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Produção abundante também pode ser obtida com o cultivo em tubos contendo meio extrato de malte (4%) e um pedaço de musselina (tipo de tecido, leve e transparente), incubados a 18 °C por 21 dias (PUTTOO & CHAUDHARY, 1988).

A produção do conídios utilizado nas inoculações de *V. inaequalis* tem sido feita também em meio ágar extrato de malte (PARISI et al., 1994; PARISI et al., 2004). Em alguns trabalhos a produção de inóculo foi feita em duas etapas. O patógeno foi primeiramente cultivado em meio ágar extrato de malte, a 18 °C no escuro e depois de um mês transferido para meio extrato de malte líquido com fotoperíodo de 16 h, por 17 dias (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005). A temperatura também pode variar, quando cultivado em solução de nutrientes (extrato de malte de Trommers), o patógeno foi primeiramente incubado a 20 °C por 20 dias e após, a 16 °C por mais 4 a 6 dias (NUSBAUM & KEITT, 1938).

O inóculo deste patógeno também tem sido obtido de folhas de macieira. No uso deste método tem sido usadas folhas de macieiras com lesões de sarna coletadas no campo (MARTINEZ-BILBAO & MURILLO, 2005; BELFANTI et al., 2004; LI & XU, 2002; ROBERTS & CRUTE, 1994) ou infectadas em casa de vegetação (CHEVALIER et al., 1991). O inóculo obtido pela lavagem destas folhas pode ser usado imediatamente ou congelado para uso posterior. Alguns pesquisadores relatam também o uso associado destas técnicas para a produção de inóculo de *V. inaequalis* (BENAOUF & PARISI, 2000; PARISI & LESPINASSE, 1996).

2.7 Métodos de estudo da virulência de *Venturia inaequalis* em espécies de *Malus*

Nas técnicas utilizadas estão as observações de infecções das macieiras no campo e em plantas com inoculações feitas em câmaras de crescimento e casas de vegetação. Na Suécia, vinte e duas cultivares foram testadas no campo quanto a resistência à sarna da macieira. O desenvolvimento de lesões foi avaliado nas folhas e frutos durante dois anos (SANDSKAR & GUSTAFSSON, 2002).

Na Universidade de Purdue, EUA, a avaliação da resistência à sarna da macieira em seleções de *Malus* foi feita em casa de vegetação. O inóculo usado foi produzido a partir de culturas monospórica e as macieiras foram inoculadas e mantidas em câmara úmida, construída dentro da casa de vegetação, durante dois dias. A temperatura da casa oscilou entre 15 e 18 °C. As avaliações foram feitas com base nas reações observadas nas folhas (SHAY & HOUGH, 1952). No Reino Unido, após a inoculação com suspensão de 2×10^5 conídios.mL⁻¹, as macieiras enxertadas foram mantidas por 48 h a 18 °C e fotoperíodo de 16 h. Após este período as plantas foram transferidas para casa de vegetação com temperatura de 18-25 °C, onde permaneceram por mais 8-12 dias até serem avaliadas quanto a interação fenotípica observada nas folhas (ROBERTS & CRUTE, 1994). No INRA, França, as avaliações têm sido feitas em câmaras de crescimento. As macieiras enxertadas foram inoculadas e mantidas no escuro, com temperatura de 18 °C e constante molhamento foliar. Após 48 h, as plantas foram submetidas a 16-19 °C, 85-98% UR e fotoperíodo de 16 h. A avaliação dos sintomas foi feita 14-17 dias após a inoculação (BENAOUF & PARISI, 2000; PARISI et al., 1993; PARISI & LESPINASSE, 1996; PARISI et al., 2000).

Estas técnicas exigem bastante tempo e são altamente influenciadas por condições ambientais tais como temperatura, umidade e presença de outros fitopatógenos. Diferentes técnicas têm sido testadas para simplificar estes testes. Comparações entre infecções de sarna em folhas destacadas de macieiras crescidas *in vitro* e em casa de vegetação demonstram que o primeiro pode ser usado para avaliar a resistência de cultivares de macieira. Neste estudo 10 a 15 folhas por placa folhas de macieiras propagadas *in vitro* foram coletadas e colocadas em placas de Petri contendo agar-água ou papel filtro umedecido, inoculadas por aspersão com suspensão de 10^6 conídios.mL⁻¹ e incubadas a 18-20 °C com fotoperíodo de 16 h. Paralelamente, macieiras enxertadas também foram inoculadas. Depois da inoculação as plantas foram incubadas em câmara de crescimento a 19-21 °C e 100% UR e após 48 h foram transferidas para casa de vegetação com 15-25 °C. As avaliações foram feitas macro e microscopicamente em intervalos de 12 h durante as primeiras 72 h e aos cinco, sete, dez e quinze dias após a inoculação (YEPES & ALDWINCKLE, 1993b). Macieiras enxertadas crescidas em casa de vegetação e *in vitro* foram aspergidas com suspensão de 10^6 conídios.mL⁻¹. Depois da inoculação as plantas enxertadas foram incubadas em câmara de crescimento a 19-21 °C e 100% UR e após 48 h foram transferidas para casa de vegetação com 15-25 °C. As macieiras crescidas *in vitro* foram incubadas em câmara de crescimento a 18-21 °C e fotoperíodo de 16 horas. Os sintomas foram avaliados macro e microscopicamente em intervalos de 3 h durante as primeiras 48 h e aos três, cinco, sete e dez dias após a inoculação. Os resultados desta pesquisa mostraram que a pré-penetração e a penetração de *V. inaequalis* ocorreu de maneira diferente em plantas crescidas *in vitro* e em casa de vegetação. Entretanto, após a penetração, a expressão da

resistência ocorreu igualmente em ambas as plantas (YEPES & ALDWINCKLE, 1993a).

As interações entre *V. inaequalis* e *Malus* sp. também foram reproduzidas em discos foliares e folhas destacadas desinfestadas de macieiras enxertadas propagadas em casa de vegetação. Folhas de macieiras enxertadas e propagadas em casa de vegetação foram coletadas, desinfestadas e cortadas em discos de 1 cm de diâmetro. Foram colocados 10 discos por placa de Petri contendo 1% de ágar água. Os discos foram aspergidos com suspensão de $2,5 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ e incubados no escuro, a 17 °C, por 48 h. Após este período os discos foram secados, transferidos para placas novas e incubados a 17-19 °C com fotoperíodo de 16 h. Vinte e um dias após a inoculação, os discos foram avaliados quanto a severidade (PARISI et al., 1993) e produção de conídios (BENAOUF & PARISI, 1998). Na Universidade de Purdue, EUA, as interações entre *Malus* sp. e *V. inaequalis*, observadas em plantas enxertadas e propagadas em casa de vegetação, foram reproduzidas em folhas destacadas de plantas de igual origem. As folhas foram coletadas e colocadas em placas de Petri contendo papel filtro e pecíolos submergidos em água. O inóculo com $1-4 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹ foi aplicado na forma de gotas de 2-30 µL sobre as folhas. As placas foram mantidas em casa de vegetação e as folhas foram avaliadas quanto ao desenvolvimento dos sintomas após dias (NICHOLSON et al., 1972). As cultivares Golden Delicious (suscetível) e Florina (resistente) foram avaliadas quanto ao desenvolvimento de sarna em folhas destacadas de plantas enxertadas e plantas enxertadas inoculadas em casa de vegetação. As folhas foram coletadas, desinfetadas e colocadas em placas de Petri contendo agar-água. Após três dias as folhas foram inoculadas pela aspensão de uma suspensão de

2,5-3,0 x 10⁵ conídios.mL⁻¹ e mantidas em casa de vegetação com temperatura máxima de 25 °C. Os sintomas observados em folhas destacadas foram similares aos observados em plantas enxertadas (IVANICKA et al., 1996).

Tem sido relatado que folhas coletadas de plantas crescidas em casa de vegetação e em campo permanecem intactas por poucos dias quando colocadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido devido a produção de compostos fenólicos e rápida necrose dos tecidos (SMEREKA et al., 1987). Folhas de plantas crescidas *in vitro*, também apresentaram baixa frequência de decomposição pois estas normalmente não produzem grandes quantidades de compostos fenólicos (YEPES & ALDWINCKLE, 1993b). Em folhas destacadas inoculadas por gotas, estas permanecem visíveis por longo período o que pode causar necroses e mascarar outras reações. Esta reação necrótica poderá ser prevenida pela secagem das gotas de suspensão antes da expressão dos sintomas. A necrose também pode ocorrer se o sítio original de inoculação for secado e a área for novamente coberta por água (NICHOLSON et al., 1972).

CAPÍTULO II

3. PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE *Venturia inaequalis* EM MEIO DE CULTURA

3.1 INTRODUÇÃO

O ascomiceto *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. é o agente causal da sarna da macieira, uma das doenças mais importantes da cultura na maioria dos países produtores (MACHARDY, 1996). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 1950, no Estado de São Paulo. Com a expansão comercial da cultura no Sul do país a doença tornou-se amplamente distribuída.

O crescimento de *V. inaequalis* em meio de cultura é relativamente lento quando comparado com outros patógenos da macieira tais como *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*. Uma colônia iniciada por um único conídio requer de quatro a seis semanas para atingir 40 a 60 mm de diâmetro em meio sólido (LEBEN & KEITT, 1948). A formação de conídios tem sido relatada como escassa nos meios de cultura a base de ágar (BRAY & AUSTIN, 1962; NUSBAUM & KEITT, 1938; SZKOLNIK, 1986).

Condições de temperatura e pH favoráveis ao crescimento de *V. inaequalis* em meio de cultura ocorrem na faixa de 16 e 24 °C e pH entre 5,1 e 6,4 (LEBEN & KEITT, 1948). Na maioria dos trabalhos se observa que a temperatura utilizada para a incubação de *V. inaequalis* fica entre 16 e 24 °C (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005; WIN et al., 2003; PARISI et al., 1993; PARKER et al., 1995; PARISI et al., 2000; PARISI et al., 2004). Estudos feitos em meio de cultura contendo NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , KCl, Mn, Zn, glucose e as vitaminas tiamina, ácido ascórbico, ácido nicotínico, ácido fólico e piridoxina, mostraram que o pH ótimo para o crescimento de *V. inaequalis* foi 5,8. Valores inferiores a este provocaram diminuição do crescimento, e a inibição total ocorreu em pH 3,4. Acima de pH 5,8 o crescimento foi menor, porém ainda razoável em pH 7,0 (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955b).

Em geral, os trabalhos sobre requerimentos nutricionais de *V. inaequalis* são voltados ao crescimento do patógeno e não a produção de conídios. *Venturia inaequalis* é capaz de se desenvolver em meio com poucos sais minerais e glucose, mas responde favoravelmente a certos aditivos. Meios contendo glucose, celobiose, dextrina, frutose, maltose, manitol, manose, melibiose, rafinose ou sacarose como única fonte de carbono são favoráveis ao crescimento deste patógeno, enquanto ácidos orgânicos são inibitórios (LEBEN & KEITT, 1948). Nitrato de potássio e sulfato de amônia são satisfatórias fontes de nitrogênio, entretanto, o crescimento em meio líquido é aumentado quando as fontes inorgânicas são substituídas por caseína hidrolizada. Os aminoácidos DL-alanina, L-arginina, ácido L-glutâmico, glicina, L-prolina e L-tirosina, usados como fontes de nitrogênio também são eficazes no crescimento (PELLETIER & KEITT, 1954). Vitaminas como a tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, piridoxina e ácido

ascórbico também estimulam o crescimento (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955b).

A produção de conídios de *V. inaequalis* pode ser estimulada em meio de cultura. Foi observado que a exposição a luz contínua aumenta a produção de conídios (PARKER et al., 1995). A concentração de esporos e a idade da cultura usada para a multiplicação do patógeno não afetam sua produção de conídios em meio de cultura (ROSS, 1974).

Muitas das alternativas relatadas para a produção de conídios de fitopatógenos requerem componentes do hospedeiro tais como folhas e casca de frutos (DHINGRA & SINCLAIR, 1995), que nem sempre estão disponíveis. Meios de cultura com decocção de folhas de macieira na composição têm estimulado o crescimento de *V. inaequalis*. Os principais estimulantes extraídos destas folhas foram os aminoácidos isoleucina, glutamina, serina e fenilalanina. Outros estimulantes de crescimento solúveis em água podem estar disponíveis nas folhas, mas se forem termosensíveis serão destruídos pelo aquecimento. Adicionalmente foi mostrado que extratos de folhas de macieiras resistentes contém substâncias tóxicas que podem diminuir o crescimento de alguns isolados deste patógeno (FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955a).

A produção dos conídios utilizados nas inoculações de *V. inaequalis* tem sido feita em meio ágar extrato de malte (PARISI et al., 1994; PARISI et al., 2004). Em alguns trabalhos a produção de inóculo foi feita em duas etapas. O patógeno foi primeiramente cultivado em meio ágar extrato de malte, a 18 °C no escuro e depois de um mês transferido para meio extrato de malte líquido com fotoperíodo de 16 h, por 17 dias (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005). A temperatura também pode variar, quando cultivado em solução de nutrientes

(extrato de malte de Trommers), o patógeno foi primeiramente incubado a 20 °C por 20 dias e após, a 16 °C por mais 4 a 6 dias (NUSBAUM & KEITT, 1938).

O inóculo deste patógeno também tem sido obtido de folhas de macieira com lesões de sarna coletadas no campo (MARTINEZ-BILBAO & MURILLO, 2005; BELFANTI et al., 2004; LI & XU, 2002; ROBERTS & CRUTE, 1994) e em casas de vegetação (CHEVALIER et al., 1991). Estas folhas foram usadas imediatamente ou congeladas para uso posterior. Entretanto, a preparação de inóculo a partir de folhas coletadas no campo restringe seu uso. Em uma mesma folha é possível encontrar mais do que uma raça, impossibilitando o uso deste inóculo em trabalhos de caracterização de isolados do patógeno.

Diferentes meios de cultura tem sido usados para a produção de conídios de *V. inaequalis*. A seleção de um meio de cultura, simples e rápido de ser elaborado e de baixo custo, que permita a produção de conídios deste patógeno, coloca-se como uma importante ferramenta para os trabalhos de inoculação artificial. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de conídios e colônias de *V. inaequalis* em quatro variações do meio BDA (batata-ágar-dextrose), um dos mais usados para o cultivo de fungos, e em meio ágar-extrato de malte, usado com frequência para o cultivo de *V. inaequalis*. Além disso, a produção de conídios também foi avaliada em folhas destacadas de macieira.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Meios de cultura semi-sintéticos

Cinco meios de cultura foram avaliados: batata-dextrose-ágar (BDA) (batata, 200; dextrose, 15; ágar, 15 g.L⁻¹; pH 5,8), BDA ácido (BDAac) (batata, 200; dextrose, 15; ágar, 15 g.L⁻¹; pH 4,2 corrigido com ácido láctico 25%), BDA diluído (BDAd) (batata, 40; dextrose, 5; ágar, 15 g.L⁻¹; pH 6,1), BDAd + extrato de levedura (BDAd+EL) (batata, 40; dextrose, 5; ágar, 17; extrato de levedura, 3 g.L⁻¹; pH 6,1) e ágar-extrato de malte (AEM) (extrato de malte, 20; ágar, 20 g.L⁻¹; pH 5,6).

3.2.2. Produção de conídios em meio de cultura

Culturas do isolado A21-2 de *V. inaequalis*, desenvolvidas em meio BDAd+EL, com 07 dias de incubação, 16 °C e luz constante, foram utilizadas para o preparo da suspensão conidial. Adicionou-se água destilada esterilizada (ADE) sobre as placas, removendo-se os esporos com alça de Drigalski. De acordo com técnica anteriormente descrita (KEITT & PALMITER, 1938), a suspensão foi centrifugada a 8609 g, por 20 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em ADE. A suspensão foi ajustada para 10⁵ conídios.mL⁻¹. Desta suspensão, uma alíquota de 50 µL foi espalhada em cada placa de Petri

(38,5 cm²) contendo 15 mL de meio de cultura. Todas as placas foram vedadas e mantidas em incubadora, sob luz constante e 16 °C. Para a coleta dos conídios foi adicionada ADE nas placas, a remoção foi feita com alça de Drigalski. A suspensão obtida foi filtrada em gaze e a concentração determinada em hemacitômetro. O número de conídios de cada placa foi determinado aos quatro, oito, 12 e 16 dias de incubação. O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por combinação de meio de cultura e período de incubação. Cada repetição constou de uma placa de Petri. Os resultados obtidos foram transformados (raiz de $x + 0,5$), submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%).

3.2.3 Desenvolvimento de colônias em meio de cultura

Um disco de 5 mm de diâmetro, retirado de culturas do isolado A21-2 crescidas em meio BDAd+EL, com 07 dias de incubação a 16 °C e luz constante, foi colocado no centro de placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura. As placas foram vedadas e mantidas em incubadora, sob luz constante e 16 °C. O tamanho das colônias foi medido, após 10 e 20 dias de incubação, registrando-se o diâmetro da colônia em duas direções perpendiculares em cada placa. O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por combinação de meio de cultura e período de incubação. Cada repetição constou de uma placa de Petri com uma colônia. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%).

3.2.4 Produção de conídios em folhas destacadas de macieira

Foram utilizadas plantas da cultivar Imperial Gala enxertadas em plantas de 'Gala', oriundas de semente, mantidas em vasos em casa de vegetação, com aproximadamente um ano de idade. Para a inoculação, folhas jovens não totalmente expandidas foram coletadas e imediatamente colocadas, duas a duas, em placas de Petri contendo 15 mL de meio ágar-água (10 g.L^{-1}). O extremo distal do pecíolo das folhas foi envolvido por algodão umedecido com ADE. Para a inoculação, foi utilizada uma suspensão conidial (KEITT & PALMITER, 1938) dos isolados A19-4 e A27-1, a partir de colônias crescidas em meio BDAd+EL, com 7 dias de incubação, $16 \text{ }^\circ\text{C}$ e luz constante. As suspensões foram ajustadas para $2,5 \times 10^5$ conídios. mL^{-1} . As folhas foram inoculadas colocando-se quatro gotas, de $5 \text{ } \mu\text{L}$ cada, de suspensão sobre as mesmas. As placas foram vedadas e incubadas a $19 \text{ }^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 18 h. A produção de conídios foi avaliada em discos ($0,38 \text{ cm}^2$) retirados do local inoculado, após 15 e 20 dias de incubação. Dos quatro pontos inoculados em cada folha foram removidos os que apresentavam sinais (micélio e conídios) do patógeno. Cada disco foi colocado em um tubo contendo solução de Tween (0,001%) e submetido ao ultra-som (Thornton, T50) por 90 s, para a liberação dos esporos. A concentração de cada suspensão foi estimada em hemacitômetro. O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições por combinação de isolado e período de incubação. Cada repetição constou de uma folha com quatro pontos de inoculação. Os resultados obtidos foram transformados (raiz de $x + 0,5$), submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Produção de conídios e desenvolvimento de colônias de *V. inaequalis* em meio de cultura

A produção de conídios de *V. inaequalis* foi obtida nos cinco meios de cultura avaliados quando incubados a 16 °C e luz constante (Figura 1). No período de incubação de quatro dias não foram observadas diferenças significativas na produção de conídios entre os diferentes meios (Tabela 1). Aos oito e aos 12 dias incubação a maior produção de conídios foi observada em meio AEM, entretanto, esta produção não diferiu significativamente da obtida em BDA+EL (Tabela 1). Com 16 dias de incubação, a maior produção foi observada nos meios BDA, BDAc e BDA+EL (Tabela 1).

Estudos feitos em meio de cultura contendo KH_2PO_4 , MgSO_4 , glucose, KNO_3 , traços de B, Mn, Cu, Zn, Fe e Co e as vitaminas tiamina, biotina, inositol, ácido pantotênico, ácido nicotínico e piridoxina, a produção máxima de conídios também foi obtida entre 16 e 19 dias de incubação a 16 °C (ROSS, 1974).

Nos meios BDA e BDA ácido a maior produção de conídios foi observada após 16 dias de incubação (Tabela 1). No meio BDA diluído não foram detectadas diferenças significativas entre a produção obtida após oito, 12 e 16 dias de incubação e no meio BDA+EL, após 12 e 16 dias (Tabela 1). No meio AEM,

após 12 dias de incubação, foi observada a maior produção de conídios, a qual diminui significativamente aos 16 dias (Tabela 1).

Alguns trabalhos envolvendo *V. inaequalis* relatam que a produção de inóculo foi feita em meio AEM, porém não citam o período de incubação que antecede a coleta dos conídios (PARISI et al., 1994; PARISI et al., 2004). A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se constatar que o período de incubação no meio AEM é um fator importante na produção de conídios de *V. inaequalis*, pois se observou redução da produção após 16 dias (Tabela 1). Esta diminuição também foi observada após três semanas de cultivo em meio ágar-suco V8 coberto com membrana de celofane (PARKER et al., 1995). Este declínio foi explicado pela germinação dos conídios, seguido por um novo ciclo de desenvolvimento micelial e nova esporulação na quarta semana de incubação.

As colônias de *V. inaequalis*, formadas em todos os meios de cultura, aumentaram significativamente de tamanho no período entre 10 e 20 dias de incubação (Tabela 2). Com 10 dias se observou maior tamanho de colônias em AEM, BDAd+EL e BDAd. Aos 20 dias as colônias formadas em BDAd+EL e AEM mantiveram o maior tamanho quando comparadas com o apresentado nos outros meios de cultura (Tabela 2).

O pH ótimo para o crescimento de *V. inaequalis* varia de 5,1 a 6,4 (LEBEN & KEITT, 1948; FOTHERGILL & ASHCROFT, 1955b). Contudo, neste trabalho o fator pH dos meios de cultura não pareceu ser relevante, pois meios com pH na faixa do ótimo foram os mais adequados tanto para produção de conídios (Tabela 1), como para o desenvolvimento de colônias (Tabela 2).

TABELA 1. Produção de conídios de *Venturia inaequalis* em cinco meios de cultura durante quatro períodos de incubação. Bento Gonçalves, RS. 2006.

Período de incubação	Número médio de conídios x 10 ⁴ por placa de Petri (38,5 cm ²)				
	BDA ⁽¹⁾	BDAac	BDAd	BDAd+EL	AEM
4 dias	0,2 C ⁽²⁾	0,1 C	0,2 B	5,5 C	0,2 C
8 dias	31,1 B ab	13,0 C b	42,2 A ab	39,7 B ab	57,2 B a
12 dias	74,9 B c	63,6 B c	91,6 A bc	168,1 A ab	171,1 A a
16 dias	248,9 A a	158,1 A a	54,1 A b	228,7 A a	67,4 B b

⁽¹⁾BDA = batata ágar dextrose; BDAac = BDA ácido; BDAd = BDA diluído; BDAd+EL = BDA diluído com extrato de levedura; AEM = ágar extrato de malte.

⁽²⁾Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). CV = 20,3%.

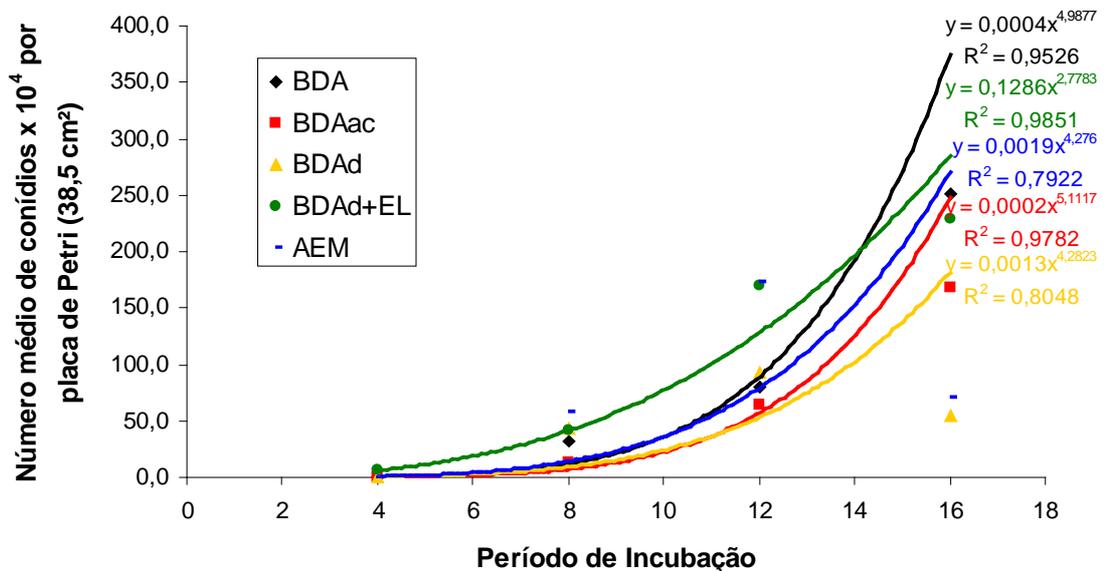


FIGURA 1. Regressão do tipo potência da produção de conídios de *Venturia inaequalis* em cinco meios de cultura durante quatro períodos de incubação. Bento Gonçalves, RS. 2006.

A composição do meio de cultura afetou tanto a produção de conídios como o desenvolvimento de colônias de *V. inaequalis*. Nos meios em que a composição se restringiu a caldo de batata, dextrose e ágar (BDA, BDA ácido e BDAd) a produção de conídios, aos 12 dias de incubação, e o desenvolvimento de colônias foram menores. Enquanto que os meios compostos por extrato de

levedura (BDAd+EL) e extrato de malte (AEM) favoreceram tanto a produção de conídios quanto o desenvolvimento de colônias.

O meio BDA possui grande quantidade de carboidratos (dextrose e amido), que favorecem o desenvolvimento e a formação de conídios de fungos, em menor período de tempo (BLUM et al., 2002). O extrato de levedura é utilizado em meio de cultura como fonte de vitaminas do complexo B e fonte adicional de nitrogênio e carbono, que favorecem o crescimento e a esporulação dos fungos (SILVA, 1999; WENZEL et al., 2005). O extrato de malte fornece carbono e nitrogênio suficientes para o crescimento de *V. inaequalis* quando outras fontes destes não estão presentes no meio (LEBEN & KEITT, 1948). O extrato de malte tem sido relatado como um estimulante na produção de conídios de *V. inaequalis* (KEITT & LANGFORD, 1941). Este estímulo possivelmente ocorra devido à presença de vitaminas como a tiamina (LEBEN & KEITT, 1948).

Embora não tenha sido quantificada a produção de micélio nos meios de cultura, foi possível observar que no meio BDAd+EL a quantidade de fragmentos de micélio nas suspensões foi menor em relação aos outros meios. O meio BDA foi um dos que, aparentemente, produziram maior quantidade de fragmentos de micélio.

O método de produção de conídios em meio de cultura é vantajoso pelo fato de que todos os componentes são facilmente acessíveis. Este método, embora simples, nos fornece quantidade suficiente de inóculo, necessário a inoculação de plantas. Entretanto, não é recomendável a multiplicação constante de patógenos em meio de cultura, visto que, esta prática pode levar a perda gradual da virulência (YEPES & ALDWINCKLE, 1993b; AGRIOS, 1997).

TABELA 2. Tamanho das colônias de *Venturia inaequalis* crescidas em cinco meios de cultura durante dois períodos de incubação. Bento Gonçalves, RS.

Período de incubação	Diâmetro da colônia (mm)				
	BDA ⁽¹⁾	BDAac	BDAd	BDAd+EL	AEM
10 dias	7,8 B b ⁽²⁾	7,6 B b	8,6 B ab	8,9 B ab	10,0 B a
20 dias	13,9 A b	12,9 A b	14,0 A b	16,5 A a	16,1 A a

⁽¹⁾BDA = batata ágar dextrose; BDAac = BDA ácido; BDAd = BDA diluído; BDAd+EL = BDA diluído com extrato de levedura; AEM = ágar extrato de malte.

⁽²⁾Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). CV = 7,0%.

3.3.2 Produção de conídios em folhas destacadas de macieira

Os resultados obtidos mostraram que os isolados A19-4 e A27-1 de *V. inaequalis* foram capazes de causar lesões típicas de sarna nas folhas destacadas de macieira com o método de inoculação utilizado.

Não foram observadas diferenças significativas entre o número de discos foliares colonizados e a produção de conídios, entre os dois isolados nos dois períodos de incubação avaliados (Tabela 3). As folhas inoculadas com o isolado A27-1 apresentaram aumento da incidência de discos colonizados aos 20 dias de incubação. Para ambos isolados, se constatou aumento significativo na produção de conídios aos 20 dias (Tabela 3).

Não foram encontrados relatos sobre a produção de conídios de *V. inaequalis* em folhas destacadas de macieira. Entretanto, o método de inoculação por gotas em folhas destacadas tem sido usado em estudos de interação entre *Malus* sp. e *V. inaequalis* (NICHOLSON et al., 1972), caracterização de proteínas de *V. inaequalis* (WIN et al., 2003) e infecção por *V. inaequalis* em germoplasma de macieira (LIEBHARD et al., 2003). Outros patossistemas também têm sido estudados com este método de inoculação, como *Lycopersicon esculentum* x

Alternaria solani (FOOLAD et al., 2000), *Triticum aestivum* x Giberela (BROWNE et al., 2005) e *Magnaporthe grisea* x *Oryza sativa* (JIA et al., 2003).

A partir deste método foi possível obter uma produção de $9,9 \times 10^4$ conídios por disco foliar ($0,38 \text{ cm}^2$), após 20 dias de incubação (Tabela 3), enquanto que em meio BDA foi possível atingir uma produção de $248,9 \times 10^4$ conídios por placa de Petri ($38,5 \text{ cm}^2$) em 16 dias (Tabela 1). É provável que a produção de conídios em folhas destacadas possa ser aumentada colocando-se mais gotas sobre cada folha ou aspergindo-se toda superfície. Este método possui a vantagem de se obter conídios com menor risco de perda da virulência e ser relativamente simples de conduzir em laboratório.

TABELA 3. Produção de conídios de dois isolados de *Venturia inaequalis* na área inoculada de folhas destacadas de macieira da cultivar Gala durante dois períodos de incubação. Bento Gonçalves, RS.

Período de Incubação	Discos colonizados (%) ⁽¹⁾		Número médio de conídios x 10^4 por disco ($0,38 \text{ cm}^2$)	
	A19-4	A27-1	A19-4	A27-1
15 dias	79,2	70,8 B ⁽²⁾	1,0 B	1,5 B
20 dias	87,5	100,0 A	9,9 A	5,9 A

⁽¹⁾Percentagem média de discos foliares com sinais em seis folhas destacadas.

⁽²⁾Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). CV = 31,1%.

CAPÍTULO III

4. IDENTIFICAÇÃO DA RAÇA 1 DE *Venturia inaequalis* NO SUL DO BRASIL

4.1 INTRODUÇÃO

A sarna da macieira, causada pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., é uma das doenças mais importantes da macieira em países de clima temperado. Este fungo filamentoso pertence à família Venturiaceae e possui fase anamorfa correspondente a *Spilocaea pomi* Fr.. É um ascomiceto heterotático com ciclo sexual anual, seguido por vários ciclos de reprodução assexual (MACHARDY, 1996).

A especialização fisiológica de *V. inaequalis* tem sido estudada há muitos anos. Um sistema de diferenciação e denominação de raças foi desenvolvido para facilitar a obtenção e a apresentação destas informações (SHAY & WILLIAMS, 1956). As raças são um tipo de especialização intra-específica, em que os isolados com virulência diferencial atacam somente algumas variedades da espécie hospedeira. A definição de uma raça se dá de acordo com as reações fenotípicas causadas pelos isolados quando inoculados em uma série de plantas, denominadas diferenciadoras (FLOR, 1971; CAMARGO, 1995). Estas diferenciadoras normalmente são selecionadas pelo método de tentativa e erro

sem o conhecimento do número ou identidade dos genes de resistência de cada planta. Um grupo de plantas diferenciadoras em que cada membro possui apenas um único gene de resistência é mais eficaz e informativa em estudos de classificação e da variação de fitopatógenos (FLOR, 1971). A interação entre *V. inaequalis* e *Malus x domestica* segue o conceito gene-a-gene. Ou seja, para cada gene que condiciona resistência no hospedeiro há um gene correspondente no patógeno que condiciona virulência (FLOR, 1956; FLOR, 1971).

As primeiras raças de *V. inaequalis*, descritas em 1956, foram definidas a partir de suas reações nos clones Dolgo e Geneva e seleções do retrocruzamento de R12740-7A. A raça 1 foi definida como a raça mais freqüente nos Estados Unidos e em vários outros países. Esta provoca lesões necróticas sem esporulação e reação de resistência nos três grupos de germoplasma. A raça 2 é virulenta às três hospedeiras. Porém, 'Geneva' somente é suscetível em condições ambientais bem definidas. Isto é, inoculação das plantas em casa de vegetação, cobertas por armação de madeira e cinco camadas de musselina, por 40 a 44 h, temperatura entre 15 e 18 °C com umidade mantida pela aspensão de água. Nestas condições 'Geneva' apresenta somente lesões necróticas, porém apresenta esporulação se após 14 dias retornar a câmara úmida por 24 h. A virulência incomum desta raça é controlada por três diferentes genes no patógeno, cada um específico para uma das três macieiras diferenciadoras. A raça 3 provoca reação de resistência em 'Geneva'. A virulência desta raça nesta planta, é controlada por um único gene, diferente daquele que condiciona virulência em 'Geneva' com a raça 2 (SHAY & WILLIAMS, 1956). 'Geneva' tem sido usada como diferenciadora da raça 3 na maioria dos trabalhos de

identificação de raças (MARTINEZ-BILBAO & MURILLO, 2005; SANDSKAR & LILJEROTH, 2005; PARISI et al., 1993).

A raça 4 foi detectada em *M. pumila* R12740-7A, em Purdue, EUA. Este clone possui ao menos três pares de genes envolvidos com o processo de infecção com sarna, um dos quais confere resistência a raça 4 de *V. inaequalis* (WILLIAMS & KUC, 1969; SHAY et al., 1962).

O surgimento da raça 5 foi evidenciado quando seleções dos EUA, resistentes a *V. inaequalis*, desenvolveram lesões com esporulação na Inglaterra. Esta raça é diferenciada por um gene de resistência presente em *M. micromalus* e *M. atrosanguinea* 804 (WILLIAMS & BROWN, 1968).

Em Ahrensburg, Alemanha, desde 1984, sintomas de sarna da macieira têm sido observados em pomares da cultivar Prima, classificada como resistente após avaliações em casa de vegetação. Em 1988, nesse local também foram encontradas lesões de sarna em algumas seleções que possuíam o gene *Vf*. Em 1993, isolados destas lesões foram descritos como raça 6. Esta foi caracterizada por superar a resistência da maioria das cultivares portadoras do gene *Vf*, mas não a da progenitora deste gene, o clone 821 da ornamental *M. floribunda*. O surgimento da raça 6 enfatizou a urgência em diversificar as fontes de resistência usadas nos programas de melhoramento. Até então, a resistência codificada pelo gene *Vf* vinha sendo considerada durável e estava sendo usada na maioria das cultivares lançadas com resistência à sarna nos programas de melhoramento do mundo todo (PARISI et al., 1993; PARISI & LESPINASSE, 1996; PARISI et al., 1994).

Outro isolado virulento a cultivares com o gene *Vf* foi encontrado na Inglaterra, na ornamental *M. floribunda* (ROBERTS & CRUTE, 1994), e chamada

raça Inglesa ou raça 7. Esta raça foi caracterizada por ser virulenta ao clone 821 de *M. floribunda*, mas avirulenta a 'Golden Delicious' (PARISI et al., 2000). A resistência desta cultivar é devida a um único gene, chamado *Vg*, (BENAOUF & PARISI, 1997). A raça 7 não é virulenta a todas as cultivares portadoras do gene *Vf*, pois algumas delas podem ter herdado o gene *Vg* da 'Golden Delicious', que é frequentemente usada em programas de melhoramento (PARISI et al., 2000).

A última raça de que se teve relatos foi a raça 8. Indivíduos desta raça foram isolados de plântulas provenientes dos cruzamentos Royal Gala X *M. sieversii* GMAL4190-W188B e Royal Gala X *M. sieversii* GMAL3631-W193B. Não têm sido estabelecido dados sobre a origem desta nova raça e como ela se propagou na Nova Zelândia. Entretanto, é sabido que a raça 8 é virulenta a acessos da espécie silvestre *M. sieversii*, as quais são portadoras do gene de resistência *Vh8* (BUS et al., 2005a).

A presença de diversas raças de *V. inaequalis* tem sido constatada em alguns países da Europa. Na Espanha foram encontradas seis raças (1, 2, 3, 5, 6, 7) de *V. inaequalis* causando sarna nas províncias de Gerona, Guipúzcoa e Navarra (MARTINEZ-BILBAO & MURILLO, 2005). As raças 1, 2, 3, 4, 6 e 7 foram relatadas em diferentes partes da Suécia (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005). Na Dinamarca, há relatos sobre a ocorrência de sete raças (1 a 7) (BENGTSSON et al., 2000). Entretanto, no Brasil e em outros países da América do Sul, as raças existentes de *V. inaequalis* são desconhecidas.

O objetivo deste trabalho foi identificar as raças de *V. inaequalis* existentes no Sul do Brasil.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Acessos de macieira

Nove acessos de macieira foram usados para identificar as raças fisiológicas de *V. inaequalis* (Tabela 1). Foram selecionadas, duas cultivares suscetíveis, uma diferenciadora para a raça 2, uma para a raça 3, uma para a raça 4 e uma para a raça 5, além de três acessos portadores do gene *Vf*. A seleção foi feita com base em trabalhos anteriores (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005; PARISI et al., 1993; PARISI et al., 2000). As estacas foram obtidas na Estação Experimental de Fruticultura da Embrapa Uva e Vinho, Vacaria, RS, e no INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Angers, França. As macieiras foram enxertadas em plantas da cultivar 'Gala', oriundas de sementes, e mantidas em casa de vegetação.

4.2.2 Tratamentos fitossanitários

Durante o período de desenvolvimento, as macieiras sofreram infecção natural com oídio (*Podosphaera leucotricha* (Ellis & Evhart) Salmon.). Esta doença foi inicialmente controlada com a aplicação semanal de fungicidas (difenoconazole e triadimenol) e após três semanas, com a aplicação de

bicarbonato de sódio ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$), duas vezes por semana. As aplicações foram suspensas uma semana antes das inoculações.

TABELA 1. Acessos de macieira usados como diferenciadoras de raças de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2005.

Acesso	Reação característica	Gene de resistência
<i>Malus x domestica</i> Gala	Suscetível	Nenhum
<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	Suscetível	Vg
<i>M. pumila</i> TSR34T132	Diferenciadora da raça 2	não nomeado
<i>M. pumila niedzwetziana</i> Geneva	Diferenciadora da raça 3	não nomeado
<i>M. pumila</i> TSR33T239	Diferenciadora da raça 4	não nomeado
<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	Diferenciadora da raça 5	Vm
<i>M. floribunda</i> clone 821	Progenitora gene Vf, suscetível raça 7	Vf, Vfh
<i>M. x domestica</i> Prima	Suscetível à raça 6	Vf, Vg
<i>M. x domestica</i> Florina	Suscetível à raça 6	Vf, Vg

4.2.3 Obtenção dos isolados de *Venturia inaequalis*

Folhas com lesões de sarna foram coletadas em pomares de três municípios do Rio Grande do Sul e três de Santa Catarina (Tabela 2). Apenas amostras de uma lesão de cada local foi suspensa em água destilada esterilizada (ADE). Esta suspensão foi diluída e transferida para placas de Petri contendo meio BDA (batata, 200; dextrose, 15; ágar, 15 g.L^{-1}) suplementado com iprodione (1 mg.L^{-1}) e tetraciclina (25 mg.L^{-1}). As placas foram incubadas a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com luz constante, por duas a três semanas. A seguir isolados monoconidiais foram obtidos e mantidos em meio BDA ácido (pH 4,2).

4.2.4 Produção de inóculo

Uma suspensão conidial de cada isolado foi incubada em placas de Petri contendo BDA diluído + extrato de levedura (BDAd+EL) (batata; 40; dextrose, 5; ágar, 17; extrato de levedura, 3 g.L^{-1}) e incubadas sob luz constante a $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 15 dias de incubação, as placas foram lavadas com ADE. A suspensão foi

centrifugada a 8609 g., por 20 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em ADE (KEITT & PALMITER, 1938). As suspensões foram ajustadas para 2 a 2,5 x 10⁵ conídios.mL⁻¹.

TABELA 2. Origem dos isolados de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2005.

Isolado	Município	Pomar	Cultivar	Data de Coleta
A8-3	Vacaria, RS	Schio	Fuji	Nov/2005
A55-2	Monte Alegre, RS	Schio	Fuji	Nov/2005
A58-3	Monte Alegre, RS	Schio	Fuji	Nov/2005
A69-2	Cambará, RS	Cambará	Braeburn	Dez/2005
A19-4	São Joaquim, SC	Irapuã	Fuji	Nov/2005
A26-1	São Joaquim, SC	Epagri	Fuji	Nov/2005
A27-1	Bom Jardim da Serra, SC		Fuji	Nov/2005
A31-2	Fraiburgo, SC	Fazenda RM	Gala	Nov/2005
A33-3	Fraiburgo, SC	Fazenda PR	Gala	Nov/2005

4.2.5 Método de inoculação de plantas

A inoculação foi feita com base em protocolo anteriormente descrito (PARISI et al., 1993), com algumas modificações. Para cada isolado, foram inoculadas duas plantas de cada uma das nove diferenciadoras. A inoculação foi feita em no mínimo três folhas apicais jovens e não totalmente expandidas, nas quais a suspensão de conídios foi aspergida até o ponto de gotejamento. Para cada acesso, uma planta foi igualmente aspergida com ADE e mantida como testemunha. Depois da inoculação, as macieiras foram incubadas por 48 h, no escuro, UR 90-100% e 16 a 20 °C. Após este período as plantas foram mantidas em casa de vegetação, ±23 °C.

4.2.6 Avaliações

As reações das macieiras foram registradas aos seis, nove, 12, 20 e 30 dias após a inoculação. Aos 20 dias, a incidência (número de folhas com sinais), a severidade, o tipo de reação e a esporulação de três folhas em cada planta foram determinadas. Para o clone 821 de *M. floribunda*, a última avaliação foi feita aos 30 dias. A severidade foi estimada usando-se a seguinte escala (PARISI et al., 1993; CROXALL et al., 1952): zero = sem sinais e/ou sintomas; 1 = zero-1%; 2 = 1-5%; 3 = 5-10%; 4 = 10-25%; 5 = 25-50%; 6 = 50-75%; e, 7 = 75-100% de área foliar com sinais. As folhas também foram avaliadas quanto ao tipo de reação. Essa classificação foi baseada em escala previamente descrita (CHEVALIER et al., 1991), com algumas modificações: A = ausência de sinais e/ou sintomas; D = deformação; P = pontuações (reação de hipersensibilidade); C = clorose, N = necrose, e; S = sinais (micélio e conídios). Neste trabalho, o termo “pontuações” refere-se à área do tecido foliar que entrou em colapso e formou uma depressão (CHEVALIER et al., 1991); e “clorose” refere-se à degradação da clorofila, induzindo ou não a cor amarela ou vermelha (CHEVALIER et al., 1991; PARISI et al., 1993; PARISI & LESPINASSE, 1996).

Conforme o tipo de reação, as folhas foram classificadas em classes de resistência (CHEVALIER et al., 1991): classe Zero) sem sinais e/ou sintomas; classe 1) reação de hipersensibilidade; classe 2) resistente, clorose e/ou necrose sem esporulação; classe 3a) resistência fraca, clorose e/ou necrose com pouca esporulação; classe 3b) suscetibilidade fraca, clorose e/ou necrose com esporulação evidente; e, classe 4) suscetível, esporulação abundante. Para determinar a esporulação as folhas foram colocadas em solução de Tween

(0,001%), submetidas ao ultra-som (Thornton, T50) por 90 s e os conídios coletados foram quantificados em hemacitômetro.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados testados foram identificados como pertencentes à raça 1 de *V. inaequalis*. As cultivares Gala e Golden Delicious apresentaram sinais e sintomas típicos de sarna da macieira com todos os isolados testados. Para a maioria das interações, o surgimento destas reações tornou-se macroscopicamente visível entre nove e 12 dias após a inoculação. Na maioria das interações, a produção de conídios foi maior em 'Gala' do que em 'Golden Delicious'. Para os outros sete acessos, as reações observadas foram de resistência. Foi observada ausência de sinais e/ou sintomas, além de sintomas como deformação foliar, pontuações, clorose e necrose (Tabela 3 e Figura 1).

Nas condições do Sul do Brasil 'Golden Delicious' é menos suscetível à sarna da macieira do que 'Gala' (CAMILO & DENARDI, 2002). A mesma situação foi relatada quando estas cultivares são inoculadas em casa de vegetação (PARISI & LESPINASSE, 1996). Entretanto, também há experimentos em que 'Golden Delicious' apresentou maior severidade do que 'Gala' em condições controladas de inoculação e incubação (BENAOUF & PARISI, 1997). Na Suécia, a severidade em 'Golden Delicious' foi relatada como maior do que em 'Gala' em pomares do Sudoeste e iguais, em pomares do Sudeste (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005). Em experimentos realizados na EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), 'Gala', 'Golden

Delicious' e 'Fuji' apresentaram lesões com abundante esporulação, entre 10 e 14 dias após a inoculação. As macieiras foram inoculadas e mantidas em câmara de inoculação por 48 h, UR 100% e 18 °C (BONETI et al., 2001b). Embora as condições de incubação durante as primeiras 48 h tenham sido semelhantes as utilizadas neste trabalho, as diferenças observadas podem ter sido devidas às condições de temperatura e umidade na casa de vegetação, para onde as macieiras foram transferidas após 48 h. Neste trabalho, a severidade em 'Gala' foi maior do que em 'Golden Delicious' quando inoculadas com os isolados A8-3, A55-2 e A58-3. Com os outros seis isolados, a severidade em 'Golden Delicious' foi maior do que em 'Gala'. A variação observada foi maior pelo efeito dos isolados do que pelos acessos de macieira (Tabela 3).

A determinação das raças prevalentes em determinado país pode ser usada para definir barreiras fitossanitárias para fruta importada de países onde ocorrem raças que podem quebrar a resistência das cultivares utilizadas no local. A definição deste tipo de medida no Brasil deve ser embasada no conhecimento prévio sobre a existência das raças de *V. inaequalis*.

Mais de 90% da maçã produzida no Brasil pertence às cultivares Gala e Fuji e suas mutações, que são suscetíveis à sarna da macieira (OLIVEIRA et al., 2005). Algumas das cultivares lançadas pelo programa de melhoramento da Estação Experimental de Caçador / EPAGRI possuem resistência à sarna da macieira. As cultivares Duquesa, (DENARDI & CAMILO, 1998), Fred Hough (DENARDI & CAMILO, 1994), EPAGRI 402 – Catarina (BONETI et al., 1996) e Primícia (DENARDI et al., 1988) possuem resistência conferida pelo gene *Vf*, oriundo do clone 821 de *M. floribunda*, presente na genealogia destas cultivares. Entretanto estas macieiras não têm sido plantadas extensivamente em pomares

comerciais, o que mantém a pressão de seleção do patógeno para o desenvolvimento de novas raças de *V. inaequalis* em níveis baixos.

Em três regiões do nordeste da Espanha, as raças 1, 2, 3, 5, 6 e 7 foram identificadas. A raça 1 foi identificada apenas em La Tallada, região de Gerona. Na região de Navarra, as raças 3 e 5 foram identificadas em Tudela e a raça 7, em Santesteban. As raças 2 e 6 foram identificadas nas três regiões, Gerona, Navarra e Guipúzcoa (MARTINEZ-BILBAO & MURILLO, 2005). Na Dinamarca as raças 1 a 7 foram identificadas em um pomar em Arslev através da avaliação de 16 diferenciadoras com inóculo natural (BENGTSSON et al., 2000). A identificação de raças de *V. inaequalis* presentes na Suécia foi feita em câmara de crescimento e em campo. Em câmara de crescimento cinco raças foram identificadas, em Stockholm e Ranna apenas as raças 1 e 2; em Alnarp, as raças 1, 2 e 3; em Balsgard e Kivik, as raças 1, 2, 3 e 4; e, em Hallstahammar, as raças 1, 2, 3 e 6. No campo, em Alnarp, foram identificadas as mesmas três raças identificadas com o experimento em câmara de crescimento. Em Kivik, além das quatro raças identificadas em câmara de crescimento, foi encontrada também a raça 7 (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005).

O sistema de identificação das raças hoje disponível pode ser considerado precário, pois são altamente influenciados por condições ambientais tais como temperatura, umidade e presença de outros fitopatógenos. O sucesso do sistema em casa de vegetação depende, entre outras coisas, da idade da planta, qualidade e quantidade de inóculo e condições pré e pós-inoculação. Macieiras contendo folhas com quatro a 100 dias de idade foram inoculadas ($1,5 \times 10^4$ conídios.mL⁻¹) com *V. inaequalis* e mantidas em câmara úmida por 24 h. Após uma, duas, três e seis semanas em casa de vegetação a 20 °C e UR 70%, as

avaliações feitas nestas folhas mostraram que os conídios de *V. inaequalis* podem infectar a superfície das folhas de macieira em qualquer idade. Em folhas jovens, o micélio cresceu mais rápido e os sintomas se tornaram visíveis antes do que em folhas maduras. Em folhas maduras com três a quatro meses de idade, o micélio cresceu lentamente e em quantidade insuficiente para apresentar sintomas visuais. Porém, algumas destas lesões sem sintomas visíveis produziram conídios. Ou seja, a resistência ontogênica não impede completamente os conídios de infectarem ou penetrarem nas folhas, mas pode impedir a visualização macroscópica das lesões (LI & XU, 2002).

Os trabalhos de identificação de raças de *V. inaequalis* variam em relação ao ambiente de pré e pós-inoculação, à quantidade de macieiras diferenciadoras e ao número de isolados. Em levantamento realizado na Espanha, os autores não relataram as condições de pré e pós-inoculação nem o número de isolados utilizados. A identificação foi feita com inóculo ($2,5 \times 10^5$ conídio.mL⁻¹) preparado a partir de folhas com lesões de sarna coletadas em pomares comerciais e domésticos. Foram usados sete acessos de plantas diferenciadoras: 'Gala', *M. pumila* TSR34T132, *M. pumila niedzwiziana* Geneva, *M. pumila* TSR33T239, *M. micromalus* 9-AR2T196, *M. floribunda* clone 821 e 'Prima' (MARTINEZ-BILBAO & MURILLO, 2005), as quais também foram utilizadas neste trabalho. Na Dinamarca a identificação de raças foi feita através da avaliação de 16 diferenciadoras com inóculo natural. As macieiras foram enxertadas e plantadas em um pomar em Arslev e, após quatro anos, avaliadas quanto ao tipo de sintomas nas folhas e frutos (BENGTSSON et al., 2000). Dos nove acessos utilizados neste trabalho, apenas 'Gala' não estava presente no pomar de Arslev, onde havia três controles suscetíveis, uma hospedeira diferenciadora para a raça 2, uma para a raça 3,

uma para a raça 4 e três para a raça 5, além de seis macieiras portadoras do gene *Vf*, entre elas o clone 821 de *M. floribunda*. A identificação de raças de *V. inaequalis* presentes na Suécia foi feita em câmara de crescimento e em campo. Em câmara de crescimento foram usados 13 isolados oriundos de folhas frescas e congeladas e isolados monoconidiais, ajustados para 2 a 3 x 10⁵ conídios.mL⁻¹. As condições de incubação foram 18 a 20 °C, UR 100% e ausência de luz, e após dois dias, casa de vegetação com UR 80% ou mantidas na câmara de crescimento. Três semanas após a inoculação, as plantas foram avaliadas quanto ao tipo de reação nas folhas e número de folhas com sinais. No campo, a identificação de raças foi feita com inóculo natural. As macieiras foram plantadas em vasos, os quais foram colocados em pomares não podados. As avaliações foram feitas após um e três meses. Para os dois experimentos, 13 acessos de macieira foram usados (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005), nove dos quais também foram utilizados neste trabalho.

O patógeno *V. inaequalis* possui alta taxa de polimorfismo (TENZER & GESSLER, 1999) e vários genes de avirulência (BOONE, 1971). Isto sugere a existência de um grande número de raças fisiológicas (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005), embora somente oito tenham sido descritas até o momento (BUS et al., 2005a).

Este é o primeiro relato de raças de *V. inaequalis* presentes no Brasil e na América do Sul. A raça 1 foi encontrada nos municípios de Vacaria, Monte Alegre e Cambará, no Estado do Rio Grande do Sul, e São Joaquim, Bom Jardim da Serra e Fraiburgo, no Estado de Santa Catarina. Apesar disso, não se pode descartar a possibilidade da existência de outras raças ou, até mesmo, de raças diferentes das oito descritas até o momento. Para uma investigação mais

completa sobre a existência de raças de *V. inaequalis* seria desejável usar um grande número de isolados, de diferentes regiões, o que além de ser trabalhoso e demorado, certamente será dispendioso.

TABELA 3. Reações de acessos de macieira a isolados da raça 1 de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2006.

Isolado	Acessos	Incidência (%) ⁽¹⁾	Severidade ⁽²⁾	Aparecimento dos sinais e/ou sintomas (dias) ⁽³⁾	Número médio de conídios x 10 ⁵ /cm ² ⁽⁴⁾	Reação ⁽⁵⁾	Classes ⁽⁶⁾	Suscetível ou Resistente
A8-3	<i>Malus x domestica</i> Gala	100	5,0	12	1,11	C S	4	S
	<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	83	2,0	12	0,22	C N S	2, 4	S
	<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	6	0,00	D C N	0, 2	R
	<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	0	0,0	12	0,00	A D N	0, 2	R
	<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	6	0,00	C N	2	R
	<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	6	0,00	C N	2	R
	<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	12	0,00	A D	0	R
	<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	12	0,00	A C N	0, 2	R
<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	20	0,00	A C	0, 2	R	
A55-2	<i>M. x domestica</i> Gala	100	4,8	9	2,36	C S	4	S
	<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	83	2,2	9	0,43	C S	4, 2	S
	<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	-	0,00	A	0	R
	<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	0	0,0	9	0,00	A D C	0, 2	R
	<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	6	0,00	A P	0, 1	R
	<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	6	0,00	P N	1, 2	R
	<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	-	0,00	A	0	R
	<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	-	0,00	A	0	R
<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	6	0,00	A D C	0, 2	R	
A58-3	<i>M. x domestica</i> Gala	100	3,7	12	2,03	C S	4	S
	<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	100	2,8	12	0,68	C S	4	S
	<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	9	0,00	D C N	2	R
	<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	0	0,0	9	0,00	C	2	R
	<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	9	0,00	A C	0, 2	R
	<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	12	0,00	A C N	0, 2	R
	<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	20	0,00	A D	0	R
	<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	9	0,00	A C	0, 2	R
<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	-	0,00	A	0	R	
A69-2	<i>M. x domestica</i> Gala	100	4,0	12	1,20	C S	4	S
	<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	100	6,0	12	4,63	C S	4	S
	<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	9	0,00	C N	2	R
	<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	0	0,0	9	0,00	A C	0, 2	R
	<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	6	0,00	A C N	0, 2	R
	<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	6	0,00	P C N	1, 2	R
	<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	-	0,00	A	0	R
	<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	6	0,00	C	2	R
<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	20	0,00	A P C	0, 2	R	

'continuação' TABELA 3. Reações de acessos de macieira a isolados da raça 1 de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2006.

Isolado	Acessos	Incidência (%) ⁽¹⁾	Severidade ⁽²⁾	Aparecimento dos sinais e/ou sintomas (dias) ⁽³⁾	Número médio de conídios x 10 ⁵ /cm ² ⁽⁴⁾	Reação ⁽⁵⁾	Classes ⁽⁶⁾	Suscetível ou Resistente
A19-4	<i>M. x domestica</i> Gala	83	3,2	12	0,31	C S	2, 4	S
	<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	66	4,5	12	2,53	C S	2, 4	S
	<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	6	0,00	C N	2	R
	<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	0	0,0	9	0,00	A C	0, 2	R
	<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	12	0,00	A P	0, 1	R
	<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	12	0,00	A P	0, 1	R
	<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	12	0,00	C	2	R
	<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	12	0,00	A C	0, 2	R
<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	12	0,00	A C N	0, 2	R	
A26-1	<i>M. x domestica</i> Gala	83	2,0	12	0,05	C S	2, 4	S
	<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	100	2,2	12	0,33	C S	4	S
	<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	9	0,00	C N	2	R
	<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	0	0,0	9	0,00	A C	0, 2	R
	<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	12	0,00	A P	0, 1	R
	<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	9	0,00	A C	0, 2	R
	<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	-	0,00	A	0	R
	<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	-	0,00	A	0	R
<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	-	0,00	A	0	R	
A27-1	<i>M. x domestica</i> Gala	83	2,6	12	0,14	C S	2, 4	S
	<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	50	4,0	6	0,93	C S	2, 4	S
	<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	6	0,00	C N	2	R
	<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	0	0,0	6	0,00	A C D	0, 2	R
	<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	9	0,00	A D P	0, 1	R
	<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	6	0,00	A P	0, 1	R
	<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	-	0,00	A	0	R
	<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	6	0,00	A C N	0, 2	R
<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	6	0,00	D C N	0, 2	R	
A31-2	<i>M. x domestica</i> Gala	100	3,8	12	1,15	C N S	4	S
	<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	100	4,7	9	0,97	D C S	4	S
	<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	6	0,00	C N	2	R
	<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	0	0,0	12	0,00	D P C	1, 2	R
	<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	9	0,00	A P C	0, 1, 2	R
	<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	6	0,00	A C N	0, 2	R
	<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	-	0,00	A	0	R
	<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	6	0,00	P N	1, 2	R
<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	-	0,00	A	0	R	

'continuação' TABELA 3. Reações de acessos de macieira a isolados da raça 1 de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2006.

Isolado	Acessos	Incidência (%) ⁽¹⁾	Severidade ⁽²⁾	Aparecimento dos sinais e/ou sintomas (dias) ⁽³⁾	Número médio de conídios x 10 ⁵ /cm ² ⁽⁴⁾	Reação ⁽⁵⁾	Classes ⁽⁶⁾	Suscetível ou Resistente
	<i>M. x domestica</i> Gala	100	2,5	6	0,25	C S	4	S
	<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	100	3,7	6	2,15	C S	4	S
	<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	6	0,00	A C N	0, 2	R
	<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	0	0,0	6	0,00	C	2	R
A33-3	<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	6	0,00	A P	0, 1	R
	<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	6	0,00	P C N	1, 2	R
	<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	6	0,00	C	2	R
	<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	9	0,00	A P C	0, 1, 2	R
	<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	6	0,00	A P C	0, 1, 2	R

⁽¹⁾ Percentagem de folhas (6) com sinais.

⁽²⁾ Média de severidade nas folhas com sinais de acordo com a seguinte escala (PARISI et al., 1993; CROXALL et al., 1952): zero = sem sinais e/ou sintomas; 1 = zero-1%; 2 = 1-5%; 3 = 5-10%; 4 = 10-25%; 5 = 25-50%; 6 = 50-75%; e, 7 = 75-100% de área foliar com sinais.

⁽³⁾ Dias após a inoculação em que iniciou o aparecimento de sinais e/ou sintomas. Períodos observados: 6, 9, 12, 20 e 30 dias.

⁽⁴⁾ Número médio de conídios x 10⁵ por cm² de tecido foliar.

⁽⁵⁾ A = ausência de sinais e/ou sintomas; D = deformação; P = pontuações; C = clorose; N = necrose; e, S = sinais.

⁽⁶⁾ Zero) sem sinais e/ou sintomas; 1) reação de hipersensibilidade; 2) resistente = clorose e/ou necrose sem esporulação; 3a) resistência fraca = clorose e/ou necrose com pouca esporulação; 3b) suscetibilidade fraca = clorose e/ou necrose com esporulação evidente; e, 4) suscetível = esporulação abundante (CHEVALIER et al., 1991).

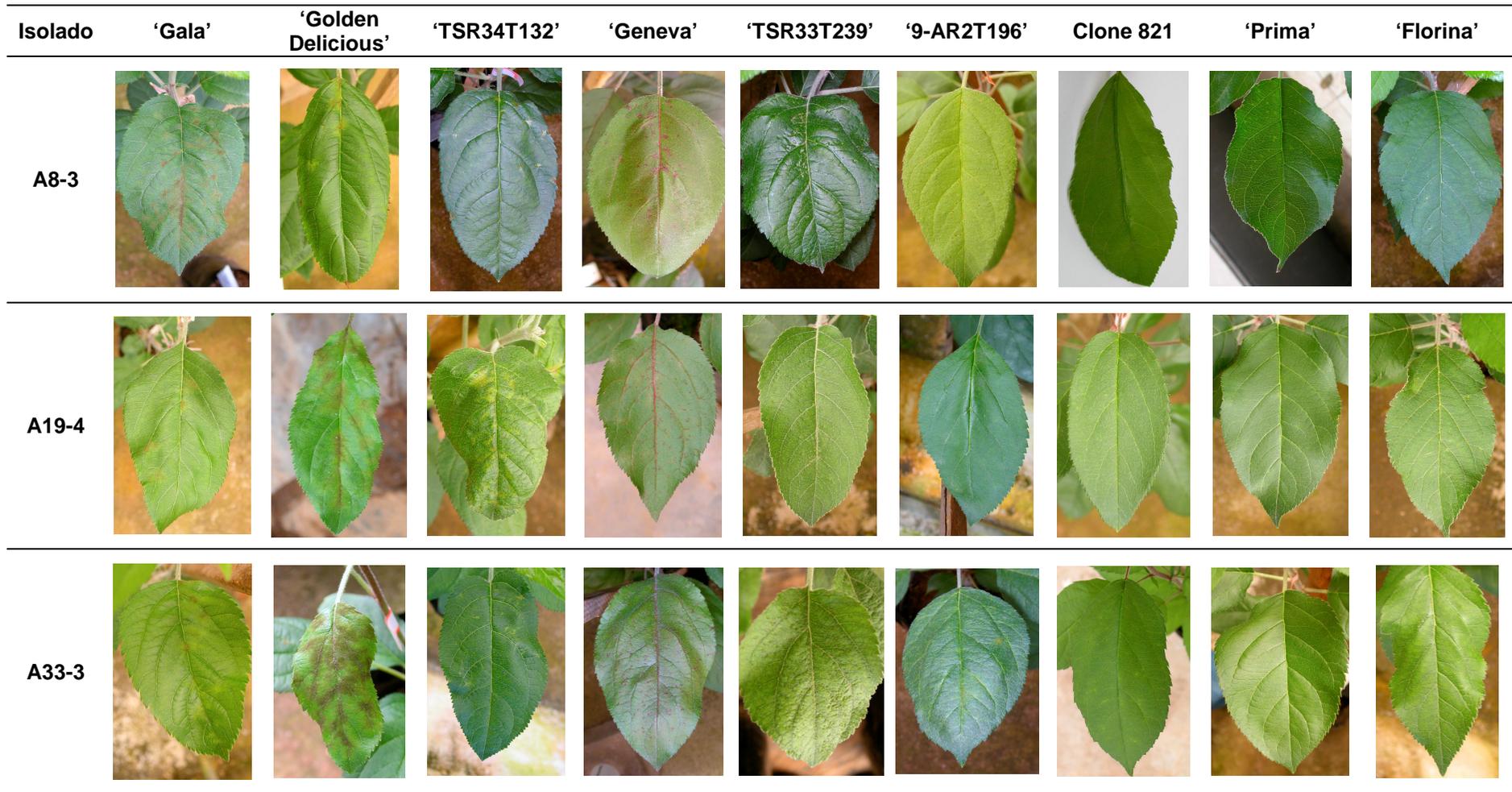


FIGURA 1. Reações observadas entre nove acessos de macieiras diferenciadoras de raças de *Venturia inaequalis* com três isolados. Bento Gonçalves, RS. 2006.

CAPÍTULO IV

5. VIRULÊNCIA DE *Venturia inaequalis* EM FOLHAS DE MACIEIRA DESTACADAS OU NÃO

5.1 INTRODUÇÃO

A sarna da macieira, causada pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., é uma doença amplamente distribuída ocorrendo em todas as regiões do mundo onde as macieiras são cultivadas. Este ascomiceto filamentoso pertence à família Venturiaceae e possui fase anamorfa correspondente a *Spilocaea pomi* Fr.. É um fungo heterotático com ciclo sexual anual, seguido por vários ciclos de reprodução assexual (MACHARDY, 1996).

O estudo da virulência de *V. inaequalis* em macieiras tem sido feito no campo, com inóculo natural, e em ambiente controlado (SANDSKAR & GUSTAFSSON, 2004; SANDSKAR & GUSTAFSSON, 2002; PARISI & LESPINASSE, 1996; CHEVALIER & PARISI, 1991). Estas técnicas exigem bastante tempo e são altamente influenciadas por condições ambientais não controladas tais como temperatura, umidade e presença de outros fitopatógenos. O sucesso da seleção em ambiente controlado depende, entre outras coisas, da idade de planta, qualidade e quantidade de inóculo e

condições pré e pós-inoculação. Além disso, estes métodos exigem grande quantidade de plantas, limitando o número de isolados que podem ser avaliados durante uma estação experimental.

Diferentes técnicas têm sido avaliadas para simplificar estes testes. Comparações entre infecções de sarna em folhas destacadas de macieiras crescidas *in vitro* e em casa de vegetação demonstram que o método de inoculação em folhas destacadas pode ser usado para avaliar a resistência de cultivares de macieira (IVANICKA et al., 1996; YEPES & ALDWINCKLE, 1993b; YEPES & ALDWINCKLE, 1993a; CHEVALIER & PARISI, 1991). A pré-penetração e a penetração de *V. inaequalis* ocorrem de maneira diferente em plantas crescidas *in vitro* e em casa de vegetação. Entretanto, após a penetração, a expressão da resistência ocorre igualmente em ambas as plantas (YEPES & ALDWINCKLE, 1993a).

As interações entre *V. inaequalis* e *Malus* sp. também podem ser reproduzidas em discos de folhas crescidas em casa de vegetação (BENAOUF & PARISI, 1998) e em folhas destacadas de macieiras crescidas em casa de vegetação (NICHOLSON et al., 1972). Estes métodos possibilitam reduzir consideravelmente a área foliar requerida para estudos de interação. O método de inoculação em folhas destacadas tem sido usado em estudos de caracterização de proteínas de *V. inaequalis* (WIN et al., 2003) e infecção por *V. inaequalis* em macieiras (LIEBHARD et al., 2003).

A virulência de fitopatógenos foi estudada em folhas destacadas para vários patossistemas. Uma comparação entre avaliações de campo, casa de vegetação e folhas destacadas de *Lycopersicum esculentum*, para a resistência a *Alternaria solani*, mostrou que os resultados obtidos em campo e

em casa de vegetação são correspondentes. Entretanto, os resultados obtidos com o método de folhas destacadas se mostraram inconsistentes em relação aos obtidos no campo e em casa de vegetação (FOOLAD et al., 2000). Para as interações entre *Triticum aestivum* e Giberela o método de inoculação por gotas em folhas destacadas de trigo tem se mostrado promissor para distinguir fontes específicas de resistência quando estas informações são combinadas com informações sobre a genealogia da variedade de trigo (BROWNE et al., 2005). Para o patossistema *Magnaporthe grisea* x *Oryza sativa* este método tem sido bem caracterizado e confirmado com testes padrão, podendo ser usado nos programas de melhoramento para identificar novas fontes de resistência à brusone do arroz (JIA et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi comparar as reações de folhas de macieira destacadas ou não quando inoculadas com *V. inaequalis*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Acessos de macieira

Foram utilizados nove acessos de macieira (Tabela 1). As estacas foram obtidas na Estação Experimental de Fruticultura da Embrapa Uva e Vinho, Vacaria, RS, e no INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Angers, França. As estacas foram enxertadas em macieiras da cultivar 'Gala', oriundas de sementes, e mantidas em casa de vegetação.

5.2.2 Tratamentos fitossanitários

Durante o período de desenvolvimento, as macieiras sofreram infecção natural com oídio (*Podosphaera leucotricha* (Ellis & Evhart) Salmon.). Esta doença foi inicialmente controlada com a aplicação semanal de fungicidas (difenoconazole e triadimenol) e após três semanas, com a aplicação de bicarbonato de sódio ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$), duas vezes por semana. As aplicações foram suspensas uma semana antes das inoculações.

TABELA 1. Acessos de macieiras inoculados com *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2005.

Acesso	Características
<i>Malus x domestica</i> Gala	Suscetível
<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	Suscetível
<i>M. pumila</i> TSR34T132	Diferenciadora da raça 2
<i>M. pumila niedzwetziana</i> Geneva	Diferenciadora da raça 3
<i>M. pumila</i> TSR33T239	Diferenciadora da raça 4
<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	Diferenciadora da raça 5
<i>M. floribunda</i> clone 821	Progenitora do gene <i>Vf</i> , suscetível a raça 7
<i>M. x domestica</i> Prima	Suscetível a raça 6
<i>M. x domestica</i> Florina	Suscetível a raça 6

5.2.3 Obtenção dos isolados de *Venturia inaequalis*

Folhas com lesões de sarna foram coletadas em pomares de dois municípios do Rio Grande do Sul e um de Santa Catarina (Tabela 2). Apenas amostras de uma lesão de cada local foi suspensa em água destilada esterilizada (ADE). Esta suspensão foi diluída e transferida para placas de Petri contendo meio BDA (batata, 200; dextrose, 15; ágar, 15 g.L⁻¹) suplementado com iprodione (1 mg.L⁻¹) e tetraciclina (25 mg.L⁻¹). As placas foram incubadas a 20 °C, com luz constante, por 2 a 3 semanas. A seguir isolados monoconidiais foram obtidos, através do método de diluição seriada e mantidos em meio BDA ácido (pH 4,2).

5.2.4 Produção de inóculo

Uma suspensão conidial de cada isolado foi incubada em placas de Petri contendo BDA diluído + extrato de levedura (BDAd+EL) (batata; 40; dextrose, 5; ágar, 17; extrato de levedura, 3 g.L⁻¹) e incubadas sob luz constante a 16 °C. Após 15 dias de incubação, as placas foram lavadas com ADE. A suspensão foi centrifugada a 8609 g., por 20 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e

ao precipitado foi adicionado ADE (KEITT & PALMITER, 1938). As suspensões foram ajustadas para 2 a $2,5 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹.

TABELA 2. Origem dos isolados de *Venturia inaequalis* inoculados em nove acessos de macieiras. Bento Gonçalves, RS. 2005.

Isolado	Origem	Cultivar	Data de Coleta
A8-3	Vacaria, RS	Fuji	Nov/2005
A58-3	Monte Alegre, RS	Fuji	Nov/2005
A33-3	Fraiburgo, SC	Gala	Nov/2005

5.2.5 Método de inoculação por gotas em folhas destacadas

Para cada isolado, quatro folhas jovens não totalmente expandidas de cada acesso foram destacadas. Imediatamente após a coleta as folhas tiveram o extremo distal do pecíolo envolvido por algodão umedecido em ADE e foram colocadas em placas de Petri (duas por placa) contendo 15 mL de meio ágar água (10 g.L^{-1} ágar). A inoculação foi feita colocando-se quatro gotas, de 5 μL cada, sobre cada folha. Uma folha de cada acesso foi inoculada com ADE e mantida como testemunha. As placas foram vedadas e incubadas a 19 °C, com fotoperíodo controlado de 18 h.

5.2.6 Método de inoculação por aspersão em folhas destacadas

Para cada isolado, quatro folhas jovens não totalmente expandidas de cada acesso foram destacadas. Imediatamente após a coleta as folhas tiveram o extremo distal do pecíolo envolvido por algodão umedecido em ADE e foram colocadas em placas de Petri (duas por placa) contendo 15 mL de meio ágar

água (10 g,L^{-1} ágar). As folhas foram aspergidas com a suspensão conidial até o ponto de gotejamento. Para cada acesso, uma folha foi igualmente aspergida com ADE e mantida como testemunha. As placas foram vedadas e incubadas a $17 \text{ }^{\circ}\text{C}$, no escuro, por 48 h. Após este período as folhas foram secadas em papel toalha esterilizado e incubadas a $19 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 18 h.

5.2.7 Método de inoculação em folhas não destacadas

Para cada acesso foram utilizadas duas plantas. A inoculação foi feita no ápice das plantas com no mínimo três folhas jovens não totalmente expandidas. A suspensão conidial foi aspergida nas plantas com um pulverizador manual até o ponto de gotejamento. Para cada variedade, uma planta foi igualmente pulverizada com ADE e mantida como testemunha. Depois da inoculação, as macieiras foram incubadas por 48 h, UR 90-100%, $16\text{-}20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, no escuro. Após este período as plantas foram mantidas em casa de vegetação, $\pm 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.8 Avaliações

As reações das folhas destacadas e não destacadas foram registradas aos seis, nove, 12, 20 e 30 dias após a inoculação. Na última avaliação, aos 20 dias, foi determinado o tipo de reação. Essa classificação foi baseada em escala previamente descrita (CHEVALIER et al., 1991), com algumas modificações: A = ausência de sinais e/ou sintomas; D = deformação; P = pontuações (reação de hipersensibilidade); C = clorose, N = necrose, e; S =

sinais (micélio e conídios). Neste trabalho, o termo “pontuações” refere-se à área do tecido foliar que entrou em colapso e formou uma depressão (CHEVALIER et al., 1991); e “clorose” refere-se à degradação da clorofila, induzindo ou não a cor amarela ou vermelha (CHEVALIER et al., 1991; PARISI et al., 1993; PARISI & LESPINASSE, 1996). Para o clone 821 de *M. floribunda* a última avaliação foi feita ao 30 dias. Nas folhas destacadas inoculadas por gotas, foram removidos discos (0,38 cm²) do local da inoculação para a contagem de conídios produzidos. Os discos foram colocados em tubos contendo solução de Tween (0,001%), submetidos ao ultra-som (Thornton, T50) por 90 s e a concentração de conídios estimada em hemacitômetro.

Nas folhas destacadas inoculadas pelo método de aspersão e nas não destacadas, a incidência foi determinada pelo número de folhas com sinais. Para avaliar a produção de conídios as folhas foram, individualmente, colocadas em solução de Tween (0,001%) e submetidas ao ultra-som (Thornton, T50) por 90 s, para a liberação dos esporos. Foi mensurada a área das folhas que apresentaram conídios (LI-3100 Area Meter, LI-COR Inc.) e a concentração deles foi determinada em hemacitômetro.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As interações entre espécies de *Malus* e isolados de *V. inaequalis*, observadas nas folhas não destacadas, inoculadas por aspersão em casa de vegetação, foram reproduzidas em folhas destacadas (Figura 1 e Tabela 3). Apesar disso, este método ainda pode ser melhorado. Os resultados obtidos pelo método de inoculação por gotas diferiram dos obtidos nas folhas não destacadas. É provável que após ajustes neste método o seu uso possa ser de grande utilidade vista a facilidade de avaliar os sintomas em uma região de área definida. Na Figura 1 são apresentadas figuras das reações observadas nas interações das folhas de macieira inoculadas pelos três métodos com o isolado A8-3.

Tem sido relatado que folhas destacadas de plantas crescidas em casa de vegetação e em campo permanecem intactas por poucos dias quando colocadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido devido a produção de compostos fenólicos e rápida necrose dos tecidos (SMEREKA et al., 1987). Este problema não foi constatado no método usado no trabalho ora relatado apesar de ocorrer ocasionalmente a perda de algumas folhas e, possivelmente, a maior vida útil observada seja devido à proteção do extremo do pedúnculo utilizado nos experimentos e ao ambiente fornecido na placa de Petri. Folhas destacadas de

plantas crescidas *in vitro*, também apresentam baixa frequência de decomposição, pois estas normalmente não produzem grandes quantidades de compostos fenólicos (YEPES & ALDWINCKLE, 1993b). Nas folhas destacadas inoculadas por gotas, estas permaneceram visíveis por longo período o que pode ser a causa das necroses observadas em muitas interações e podem ter mascarado outras reações. Esta reação necrótica poderá ser prevenida pela secagem das gotas de suspensão antes da expressão dos sintomas. Outros relatos confirmam que a necrose também pode ocorrer se o sítio original de inoculação for secado e a área for novamente coberta por água (NICHOLSON et al., 1972). Este fato foi confirmado quando utilizado o método de inoculação por aspersão em folhas destacadas, as quais mesmo sendo secadas, em alguns casos apresentaram necrose (Tabela 3).

5.3.1 Reações de folhas destacadas inoculadas por gotas

Os três isolados de *V. inaequalis* foram capazes de induzir sintomas típicos de sarna nas folhas destacadas das cultivares 'Gala' e 'Golden Delicious', inoculadas por gotas (Tabela 3). As folhas destacadas começaram a apresentar sinais macroscopicamente visíveis após nove dias de incubação (Tabela 4). Com a inoculação por gotas, a produção de conídios do isolado A8-3 foi maior nas folhas destacadas de 'Gala' do que de 'Golden Delicious', enquanto que com os isolados A33-3 e A58-3 ocorreu o contrário (Tabela 3).

Os acessos *M. pumila* TSR34T132, *M. pumila niedzwiziana* Geneva, *M. pumila* TSR33T239 e *M. micromalus* 9-AR2T196, diferenciadoras das raças 2, 3, 4 e 5, respectivamente, mostraram-se resistentes aos três isolados com o método de inoculação por gotas (Tabela 3). As folhas destacadas apresentaram reação

de necrose e sinais. Embora tenha sido notada a presença de sinais em algumas destas interações, a recuperação de $0,3$ e $0,4 \times 10^3$ conídios / cm^2 de área foliar, foi considerado muito baixo para caracterizar reação de suscetibilidade (Tabela 3), sendo estas consideradas reações de resistência. As folhas destacadas do clone 821 de *M. floribunda*, inoculadas por gotas, apresentaram reação de resistência, expressada por necrose e sinais. A interação entre este clone e o isolado A58-3 resultou na presença de sinais sobre os pontos de inoculação. Sete discos foliares, de um total de 16, foram recuperados. A produção de conídios nestes discos foi de $7,4 \times 10^3$ conídios / cm^2 de tecido foliar (Tabela 3). Esta produção foi equivalente a 14,2% da produção observada na interação entre o controle suscetível 'Gala' com o mesmo isolado e foi considerada reação de resistência. A cultivar Prima mostrou-se suscetível aos três isolados de *V. inaequalis*. 'Florina' foi suscetível aos isolados A8-3 e A33-3, e resistente ao A58-3 (Tabela 3).

5.3.2 Reação das folhas destacadas inoculadas por aspersão

Os três isolados de *V. inaequalis* foram capazes de induzir sintomas típicos de sarna nas folhas destacadas das cultivares Gala e Golden Delicious quando inoculadas por aspersão (Tabela 3). As folhas destacadas começaram a apresentar sinais macroscopicamente visíveis 12 dias após a inoculação (Tabela 4). Com o método de inoculação por aspersão a produção de conídios do isolado A8-3 foi maior em folhas de 'Gala' do que de 'Golden Delicious', enquanto que com os isolados A33-3 e A58-3 a produção foi maior em 'Golden Delicious' (Tabela 3).

Com a inoculação por aspersão, as folhas destacadas dos acessos *M. pumila* TSR34T132, *M. pumila niedzwiziana* Geneva, *M. pumila* TSR33T239 e *M. micromalus* 9-AR2T196, apresentaram ausência de sinais e/ou sintomas, clorose e necrose. Não foi observada produção de conídios nestas interações de resistência. Nas folhas do clone 821 de *M. floribunda*, notou-se ausência de sinais e/ou sintomas (Tabela 3). As cultivares Prima e Florina mostraram-se resistentes quando inoculadas por aspersão com os três isolados e não foram observados sinais e/ou sintomas de sarna (Tabela 3).

5.3.3 Comparação das reações entre folhas de macieira destacadas e não destacadas

Nos controles suscetíveis ‘Gala’ e ‘Golden Delicious’ foi possível reproduzir, nas folhas destacadas, os sinais de sarna observados em folhas não destacadas (Tabela 3). Nas folhas não destacadas os sinais tornaram-se macroscopicamente visíveis seis a 12 dias após inoculação. O período observado para o aparecimento dos sinais nas folhas destacadas inoculadas por aspersão foi de 12 dias e, por gotas, nove dias após a inoculação (Tabela 4). Em folhas destacadas de macieiras crescidas *in vitro*, o aparecimento das lesões de sarna iniciou 20 a 30 dias após a inoculação, enquanto nas plantas enxertadas as lesões tornaram-se visíveis sete a 15 dias após a inoculação. A inoculação destas folhas foi feita por aspersão (10^6 conídios.mL⁻¹). As condições de incubação foram 19 °C e fotoperíodo de 16 h (YEPES & ALDWINCKLE, 1993b).

A produção de conídios em folhas destacadas inoculadas por gotas e por aspersão com os isolados A8-3 e A58-3, foi correspondente a produção observada nas não destacadas. Ou seja, ‘Gala’ produziu maior quantidade de

conídios do que 'Golden Delicious'. Com o isolado A33-3, a produção de conídios foi maior em 'Golden Delicious' nas folhas não destacadas, o inverso foi observado na interação entre este isolado nas folhas destacadas inoculadas pelos dois métodos (Tabela 3). Há relatos que a cultivar Golden Delicious é menos suscetível do que 'Gala', quando estas são inoculadas em casa de vegetação (PARISI & LESPINASSE, 1996).

As reações observadas nas folhas destacadas dos acessos *M. pumila* TSR34T132, *M. pumila niedzwiziana* Geneva, *M. pumila* TSR33T239, *M. micromalus* 9-AR2T196 e clone 821 de *M. florifunda*, inoculadas por gotas e por aspersão com os três isolados de *V. inaequalis*, não foram idênticas às observadas nas não destacadas, porém, em termos de suscetibilidade ou resistência, os resultados foram semelhantes (Tabela 3). Trabalhos prévios mostraram que a inoculação por gotas em folhas destacadas de macieira, permite reproduzir as interações entre *Malus* sp. e *V. inaequalis* (NICHOLSON et al., 1972). Estes autores usaram gotas de 20 a 30 μL com concentrações de 10 a 40 $\times 10^5$ conídios. mL^{-1} e incubaram as placas em casa de vegetação, sem mencionar as condições ambientais. Enquanto neste trabalho usou-se valores menores, gotas de 5 μL e inóculo na concentração de 2 a 2,5 $\times 10^5$ conídios. mL^{-1} e condições de incubação controladas. Os quatro acessos de macieiras usados foram diferentes daqueles usados neste trabalho (Tabela 1), porém, com características semelhantes. Foram testados um acesso resistente às raças 1, 2, 3 e 4, e suscetível à raça 5: clone 333-9 de *M. antrosanguinea*; um resistente às raças 1, 3, 4 e 5 e suscetível à raça 2: 'Russian 384-1'; um resistente às raças 1 a 5: clone 612-1 de *M. floribunda*; e, um suscetível às raças 1 a 5: 'Red Delicious' (NICHOLSON et al., 1972). Porém, se neste trabalho tivessem sido testados

apenas os acessos com as mesmas características dos citados anteriormente, respectivamente, *M. micromalus* 9-AR2T196, *M. pumila* TSR34T132, clone 821 de *M. floribunda* e 'Gala', se poderia concluir que o método de inoculação por gotas em folhas destacadas, como descrito neste trabalho, reproduz as interações observadas em folhas não destacadas.

Entretanto, comparando-se os resultados obtidos para 'Prima' e 'Florina' em folhas destacadas, inoculadas por gotas, e não destacadas (Tabela 3), esta conclusão não é correta. No entanto, as reações observadas nas folhas destacadas destas cultivares, inoculadas por aspersão, foram semelhantes as observadas em folhas não destacadas e em termos de suscetibilidade ou resistência, foram iguais (Tabela 3).

O desenvolvimento de sinais nas folhas destacadas de macieiras resistentes pode ser devido à variáveis ambientais, como temperatura e umidade, e quantidade de inóculo, que influenciam no processo de infecção de folhas de macieira por *V. inaequalis* (HARTMAN et al., 1999; MACHARDY, 1996). Macieiras resistentes a *V. inaequalis* podem apresentar esporulação em condições de alta umidade (DUREL et al., 2003). A concentração de inóculo utilizada neste trabalho para as inoculações em folhas destacadas, 2 a $2,5 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹, e a manutenção das folhas com inóculo suspenso em água por longo período pode ter sido uma condição diferente da observada em pomares comerciais causando uma reação atípica de sinais e sintomas.

Ambos os métodos de inoculação em folhas destacadas podem ser ajustados. A inoculação por gotas poderia ser feita com menor concentração de conídios e redução do período de permanência das gotas sobre as folhas, como feito na inoculação por aspersão. Nos dois métodos, a umidade dentro das placas

de Petri poderia ser controlada pela substituição do meio ágar água por papel filtro levemente umedecido.

A inoculação por gotas em folhas destacadas foi usada em estudos de infecção de *V. inaequalis* em macieiras (LIEBHARD et al., 2003). As condições de incubação das folhas foram semelhantes às usadas neste trabalho: placas contendo meio ágar água (1%) e incubação a 19 °C com fotoperíodo de 16 h. Entretanto, algumas diferenças foram observadas na inoculação: inóculo com 10^6 conídios.mL⁻¹ e 10 a 15 folhas por placa de Petri, as quais continham ágar água ou papel filtro umedecido como substrato (LIEBHARD et al., 2003; YEPES & ALDWINCKLE, 1993b). Folhas destacadas de macieiras também foram usadas em estudos de caracterização de proteínas de *V. inaequalis* (WIN et al., 2003). As folhas jovens expandidas foram colocadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido e inoculadas com gotas de 20 a 50 µL de inóculo com 3×10^4 conídios.mL⁻¹. As condições de incubação foram idênticas as usadas neste trabalho.

Estudar a avirulência de *V. inaequalis* à espécies de *Malus* em folhas destacadas de macieira é vantajoso, pois permite fazer uma primeira seleção de macieiras resistentes em ambiente controlado em um período curto, e exige pouco espaço físico o que diminui o custo da pesquisa. Além disso, estudar estas reações em uma mesma planta torna-se vantajoso quando a quantidade de germoplasma é limitada e permite aumentar o tamanho das populações de plantas e isolados a serem avaliados, comparativamente ao método de inoculação em folhas não destacadas em casa de vegetação.

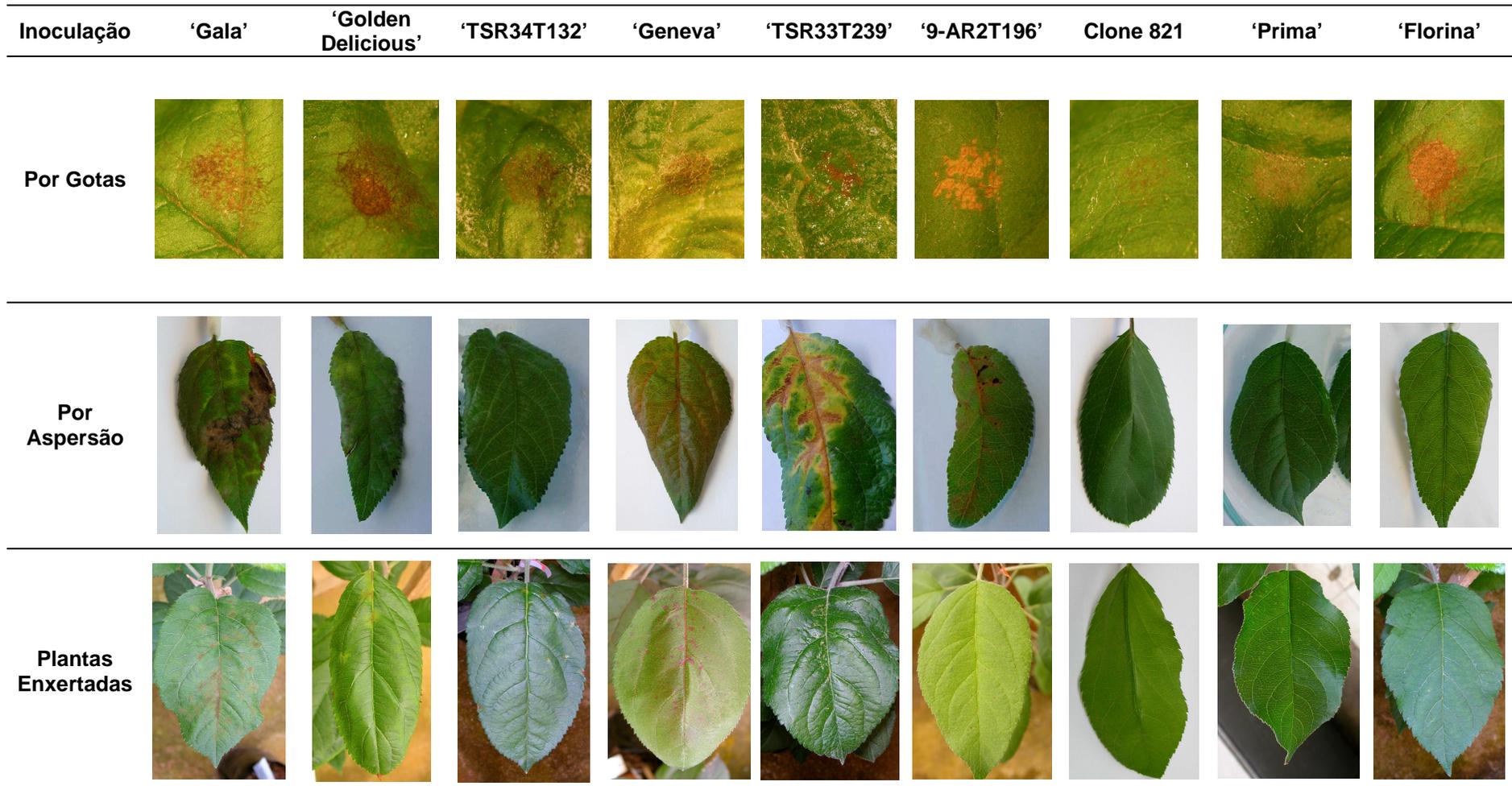


FIGURA 1. Reação de nove acessos de macieiras inoculados com o isolado A8-3 de *Venturia inaequalis* com três métodos de inoculação. Bento Gonçalves, RS. 2006.

TABELA 3. Reações da interação de nove acessos de macieira com três isolados de *Venturia inaequalis*, com três métodos de inoculação. Bento Gonçalves, RS. 2006.

Acessos	Métodos de Inoculação								
	Gotas em Folhas Destacadas			Aspersão em Folhas Destacadas			Aspersão em Folhas não Destacadas		
	Reação ¹	Discos Foliares ²	Conídios ³	Reação	Incidência ⁴	Conídios ⁵	Reação	Incidência	Conídios ⁵
Isolado A8-3									
<i>M. x domestica</i> Gala	S	16	14,3	C S	100	294,4	C S	100	111,1
<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	S	10	5,0	C S	75	80,4	C N S	83	22,0
<i>M. pumila</i> TSR34T132	N	7	0,0	A	0	0,0	D C N	0	0,0
<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	N	12	0,0	C	0	0,0	A D N	0	0,0
<i>M. pumila</i> TSR33T239	N S	16	0,1	N	0	0,0	C N	0	0,0
<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	N	12	0,0	N	0	0,0	C N	0	0,0
<i>M. floribunda</i> clone 821	N	8	0,0	A	0	0,0	A D	0	0,0
<i>M. x domestica</i> Prima	S	16	19,5	A	0	0,0	A C N	0	0,0
<i>M. x domestica</i> Florina	N S	16	5,9	A	0	0,0	A C	0	0,0
Isolado A58-3									
<i>M. x domestica</i> Gala	S	16	20,1	C S	100	89,0	C S	100	203,4
<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	S	13	24,3	C S	100	136,6	C S	100	67,8
<i>M. pumila</i> TSR34T132	N	10	0,0	N	0	0,0	D C N	0	0,0
<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	N	13	0,0	C	0	0,0	C	0	0,0
<i>M. pumila</i> TSR33T239	N	9	0,0	N	0	0,0	A C	0	0,0
<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	N S	14	0,1	N	0	0,0	A C N	0	0,0
<i>M. floribunda</i> clone 821	S	7	2,9	A	0	0,0	A D	0	0,0
<i>M. x domestica</i> Prima	S	16	16,5	A	0	0,0	A C	0	0,0
<i>M. x domestica</i> Florina	S	11	1,5	A	0	0,0	A	0	0,0
Isolado A33-3									
<i>M. x domestica</i> Gala	S	16	13,8	C S	75	20,3	C S	100	24,9
<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	S	16	19,2	C S	75	42,2	C S	100	214,8
<i>M. pumila</i> TSR34T132	N	11	0,0	N	0	0,0	A C N	0	0,0
<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	N S	12	0,2	C	0	0,0	C	0	0,0
<i>M. pumila</i> TSR33T239	N	10	0,0	A	0	0,0	A P	0	0,0
<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	N	12	0,0	N	0	0,0	P C N	0	0,0
<i>M. floribunda</i> clone 821	N	11	0,0	A	0	0,0	C	0	0,0
<i>M. x domestica</i> Prima	S	16	11,6	A	0	0,0	A P C	0	0,0
<i>M. x domestica</i> Florina	S	12	7,0	A	0	0,0	A P C	0	0,0

¹A = ausência de sinais e/ou sintomas; D = deformação; P = pontuações; C = clorose; N = necrose; e, S = sinais.

²Número total de discos recuperados em quatro folhas. Número máximo: 16 discos.

³Número médio de conídios x 10³ por disco (0,38 cm²).

⁴Porcentagem média de folhas com sinais.

⁵Número médio de conídios x 10³ por cm² de tecido foliar.

TABELA 4. Aparecimento dos sinais e/ou sintomas observados nas interações entre nove acessos de macieira com três isolados de *Venturia inaequalis*, com três métodos de inoculação. Bento Gonçalves, RS. 2006.

Acessos	Aparecimento dos sinais e/ou sintomas (dias)								
	Folhas destacadas inoculadas por gotas			Folhas destacadas inoculadas por aspersão			Folhas não destacadas inoculadas por aspersão		
	A8-3	A58-3	A33-3	A8-3	A58-3	A33-3	A8-3	A58-3	A33-3
<i>Malus x domestica</i> Gala	9 ¹	9	9	12	12	12	12	12	6
<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	9	9	9	12	12	12	12	12	6
<i>M. pumila</i> TSR34T132	9	9	6	-	9	9	6	9	6
<i>M. pumila niedzwetziana</i> Geneva	6	6	6	-	9	9	12	9	6
<i>M. pumila</i> TSR33T239	6	6	9	9	9	-	6	9	6
<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	6	6	6	9	9	9	6	12	6
<i>M. floribunda</i> clone 821	12	20	6	-	-	-	12	20	6
<i>M. x domestica</i> Prima	9	12	9	-	-	-	12	9	9
<i>M. x domestica</i> Florina	9	12	6	-	-	-	20	-	6

⁽¹⁾Períodos avaliados: 6, 9, 12, 20 e 30 dias.

CAPÍTULO V

6. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ACESSOS DE MACIEIRAS ANTIGAS A

Venturia inaequalis

6.1 INTRODUÇÃO

A sarna da macieira, causada pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., ocasiona perdas econômicas significativas em muitos países produtores de maçãs. No Brasil as principais variedades de macieira em uso comercial são 'Gala' e 'Fuji' e suas mutações, representando mais 90% da produção nacional (OLIVEIRA et al., 2005) e são altamente suscetíveis à sarna.

O controle desta doença requer cerca de 15 aplicações de fungicidas por ano, dependendo das condições climáticas, gerando alto custo de produção (MACHARDY, 1996). O controle dessa doença pode ser obtido pela introdução, em macieiras cultivadas, de genes de resistência encontrados em diferentes espécies de *Malus* (WILLIAMS & KUC, 1969).

O gene *Vf*, derivado do clone 821 da espécie silvestre *Malus floribunda*, tem sido bastante usado nos programas de melhoramento para resistência à sarna da macieira, estando em mais de 80% das cultivares lançadas como resistentes à sarna até o momento (LAURENS, 2005). A resistência associada ao

gene *Vf* foi considerada durável, pois as cultivares mantiveram-se resistentes por mais de 50 anos. Entretanto, com o surgimento das raças 6 e 7 de *V. inaequalis*, na Europa, a resistência codificada por este gene foi superada. A raça 6 é virulenta à maioria das cultivares *Vf*⁺, mas avirulenta ao clone 821 de *M. floribunda* (PARISI et al., 1993; ROBERTS & CRUTE, 1994), que possui também o gene *Vfh* (BENAOUF & PARISI, 2000). A raça 7 se caracteriza por ser virulenta ao clone 821 de *M. floribunda*, mas avirulenta a ‘Golden Delicious’, portadora do gene *Vg* (BENAOUF & PARISI, 2000; PARISI et al., 2000). Estes eventos, mostram que os genes maiores, mais fáceis de serem usados em programas de melhoramento, podem ser mais facilmente superados pelo desenvolvimento de novas raças (TARTARINI et al., 2004).

Cultivares de macieira dotadas de resistência à sarna da macieira têm sido liberadas em diversos países (KORBAN et al., 2003a; NYBOM, 2004; KHANIZADEH et al., 2003; KHANIZADEH et al., 2006), inclusive no Brasil (BONETI et al., 1996; DENARDI & CAMILO, 1998).

O surgimento de raças de *V. inaequalis* capazes de superar a resistência existente nos materiais lançados aponta para a necessidade de exploração de novas fontes de resistência nos programas de melhoramento brasileiros, incluindo resistência quantitativa.

Programas de melhoramento de vários países têm montado coleções de macieiras antigas ou locais. O termo “macieiras antigas” refere-se à macieiras plantadas há mais de 50 anos, em propriedades rurais e pomares caseiros, que continuam produzindo e sobrevivendo mesmo sem tratamentos fitossanitários. Essas plantas são avaliadas quanto às suas características agrônômicas e resistência à doenças, especialmente, à sarna (LAURENS et al., 2004;

LEFRANCQ et al., 2004; ROEN et al., 2004; DAPENA & BLÁZQUEZ, 2004). Na Hungria, várias cultivares de macieira, com 30 a 100 anos, foram identificadas como promissoras fontes genéticas para a obtenção de novas cultivares (TÓTH et al., 2004). Cinco cultivares da região de Carpathians, Ucrânia, foram testadas quanto a resistência à sarna da macieira, entre outras características de importância comercial. Todas elas, 'Zimnica', 'Kamyanka', 'Baracke', 'Dimyanka' e 'Dobrokvaska', mostraram-se resistentes, com poucas e pequenas lesões de sarna, demonstrando que são uma importante fonte genética para ser usada em programas de melhoramento (ZAYATS, 2000). Na macieira antiga, de origem italiana, 'Durello di Forlì' foi identificado o gene de resistência *Vd*. Este gene confere alto nível de resistência a isolados da raça 6 de *V. inaequalis*, podendo ser usado para reforçar a resistência do gene *Vf*, recentemente superada (TARTARINI et al., 2004). Na Europa, o consórcio DARE (Durable Apple Resistance in Europe), estabelecido por vários países, também tem buscado detectar fontes de resistência durável a doenças em materiais antigos de macieira (LESPINASSE et al., 2000).

Acessos de macieiras antigas, oriundos do Estado do Rio Grande do Sul, constituem uma reserva genética para esta cultura. Estas plantas, possuem origem desconhecida podendo ser locais ou introduzidas. Algumas destas plantas antigas apresentaram baixa incidência de sarna da macieira, sob condições de inóculo natural, e vêm sendo estudadas na Embrapa Uva e Vinho (OLIVEIRA et al., 2005; VALDEBENITO-SANHUEZA & OLIVEIRA, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de seis acessos de macieiras antigas, do Rio Grande do Sul, à sarna sob condições controladas e com inoculação artificial.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Acessos de macieira

Dezenove acessos de macieira foram avaliados quanto à resistência a *V. inaequalis* (Tabela 1). Destes, nove são macieiras antigas, coletadas em diferentes municípios do RS (Tabela 2). As estacas foram obtidas na Estação Experimental de Fruticultura da Embrapa Uva e Vinho, Vacaria, RS, e no INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Angers, França. As variedades foram enxertadas em macieiras da cultivar 'Gala', oriundas de sementes, e mantidas em casa de vegetação.

6.2.2 Tratamentos fitossanitários

Durante o período de desenvolvimento, as macieiras sofreram infecção natural com oídio (*Podosphaera leucotricha* (Ellis & Evhart) Salmon.). Esta doença foi inicialmente controlada com a aplicação semanal de fungicidas (difenoconazole e triadimenol) e após três semanas, com a aplicação de bicarbonato de sódio (1,5 g.L⁻¹), duas vezes por semana. As aplicações foram suspensas uma semana antes das inoculações.

TABELA 1. Acessos de macieiras avaliados quanto a resistência a *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2005.

Acessos	Características
<i>Malus x domestica</i> Gala	Suscetível
<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	Suscetível
<i>M. x domestica</i> Fuji Suprema	Suscetível
<i>M. x domestica</i> D1R99T15	
<i>M. x domestica</i> Dalinred	
<i>M. x domestica</i> Dülmener Rosenapfel	
04	
05	
06	
09	
17	
18	
<i>M. pumila</i> TSR34T132	Diferenciadora da raça 2
<i>M. pumila niedzwiziana</i> Geneva	Diferenciadora da raça 3
<i>M. pumila</i> TSR33T239	Diferenciadora da raça 4
<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	Diferenciadora da raça 5
<i>M. floribunda</i> clone 821	Progenitora gene <i>Vf</i> , suscetível raça 7
<i>M. x domestica</i> Prima	Suscetível raça 6
<i>M. x domestica</i> Florina	Suscetível raça 6

TABELA 2. Local de coleta dos seis acessos de macieiras antigas avaliados neste experimento. Bento Gonçalves, RS. 2006.

Macieira Antiga	Origem
04	Vacaria, RS
05	Vacaria, RS
06	Vacaria, RS
09	Não-Me-Toque, RS
17	Muliterno, RS
18	Muliterno, RS

6.2.3 Obtenção do isolado de *Venturia inaequalis*

Folhas da cultivar Fuji com lesões de sarna foram coletadas no Pomar Schio, Vacaria, RS, em novembro de 2005. Amostra de apenas uma lesão foi suspensa em água destilada esterilizada (ADE). Esta suspensão foi diluída e transferida para placas de Petri contendo meio BDA (batata, 200; dextrose, 15; ágar, 15 g.L⁻¹) suplementado com iprodione (1 mg.L⁻¹) e tetraciclina (25 mg.L⁻¹). As placas foram incubadas a 20 °C, com luz constante, por 2 a 3 semanas. A

seguir um isolado monoconidial foi obtido, através do método de diluição seriada, denominado A8-3 e mantido em meio BDA ácido (pH 4,2).

6.2.4 Produção de inóculo

Para produzir conídios, plantas da cultivar Gala foram aspergidas até o ponto de gotejamento com uma suspensão de conídios. Depois da inoculação, as macieiras foram incubadas por 48 h no escuro, UR 90% e 16 a 20 °C. Após este período as plantas foram mantidas em casa de vegetação. Depois de 20 dias as folhas com lesões de sarna foram colocadas em solução de Tween (0,001%) e submetidas ao ultrassom (Thornton, T50) por 90 s, para liberar os conídios. A suspensão foi ajustada para $2,5 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹.

6.2.5 Método de inoculação de plantas

A inoculação foi feita com base em protocolo anteriormente descrito (PARISI et al., 1993), com algumas modificações. Foram inoculadas duas plantas de cada um dos 19 acessos. A inoculação foi feita em no mínimo três folhas apicais jovens e não totalmente expandidas. A suspensão de conídios foi aspergida até o ponto de gotejamento. Para cada acesso, uma planta foi igualmente aspergida com ADE e mantida como testemunha. Depois da inoculação, as macieiras foram incubadas por 48 h, no escuro, UR 90-100%, 16 a 20 °C. Após este período as plantas foram mantidas em casa de vegetação, ± 23 °C.

6.2.6 Avaliações

As reações das macieiras foram registradas aos seis, nove, 12, 20 e 30 dias após a inoculação. Aos 20 dias após a inoculação a incidência (número de folhas com sinais), a severidade, o tipo de reação e a esporulação de três folhas em cada planta foram determinadas. Para o clone 821 de *M. floribunda*, a última avaliação foi feita aos 30 dias. A severidade foi estimada usando-se a seguinte escala (PARISI et al., 1993; CROXALL et al., 1952): zero = sem sinais e/ou sintomas; 1 = zero-1%; 2 = 1-5%; 3 = 5-10%; 4 = 10-25%; 5 = 25-50%; 6 = 50-75%; e, 7 = 75-100% de área foliar com sinais. As folhas também foram avaliadas quanto ao tipo de reação. Essa classificação foi baseada em escala previamente descrita (CHEVALIER et al., 1991), com algumas modificações: A = ausência de sinais e/ou sintomas; D = deformação; P = pontuações (reação de hipersensibilidade); C = clorose, N = necrose, e; S = sinais (micélio e conídios). Neste trabalho, o termo “pontuações” refere-se à área do tecido foliar que entrou em colapso e formou uma depressão (CHEVALIER et al., 1991); e “clorose” refere-se à degradação da clorofila, induzindo ou não a cor amarela ou vermelha (CHEVALIER et al., 1991; PARISI et al., 1993; PARISI & LESPINASSE, 1996).

Conforme o tipo de reação, as folhas foram colocadas em classes de resistência previamente descritas (CHEVALIER et al., 1991): classe Zero) sem sinais e/ou sintomas; classe 1) reação de hipersensibilidade; classe 2) resistente, clorose e/ou necrose sem esporulação; classe 3a) resistência fraca, clorose e/ou necrose com pouca esporulação; classe 3b) suscetibilidade fraca, clorose e/ou necrose com esporulação evidente; e, classe 4) suscetível, esporulação abundante. Para determinar a esporulação as folhas foram colocadas em solução

de Tween (0,001%), submetidas ao ultra-som (Thornton, T50) por 90 s e os conídios coletados foram quantificados em hemacitômetro.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o isolado A8-3 de *Venturia inaequalis* foi capaz de induzir lesões típicas de sarna nas três cultivares de macieira usadas como controles suscetíveis, 'Gala', 'Golden Delicious' e 'Fuji' (Figura 1 e Tabela 3). A incidência, a severidade e a esporulação foram maiores em 'Gala' seguida por 'Golden Delicious' e 'Fuji'. Nas três cultivares, os sintomas tornaram-se macroscopicamente visíveis 12 dias após a inoculação (Tabela 3). Na Figura 1 são apresentadas figuras das reações obtidas na interação entre 12 acessos e o isolado A8-3.

Nas condições do Sul do Brasil 'Golden Delicious' é menos suscetível à sarna da macieira do que 'Gala' (CAMILO & DENARDI, 2002). A mesma situação foi relatada quando estas cultivares são inoculadas em casa de vegetação (PARISI & LESPINASSE, 1996). Entretanto, também há experimentos em que 'Golden Delicious' apresentou maior severidade do que 'Gala' em condições controladas de inoculação e incubação (BENAOUF & PARISI, 1997). Na Suécia, a severidade em 'Golden Delicious' foi relatada como maior do que em 'Gala' em pomares do Sudoeste e iguais, em pomares do Sudeste (SANDSKAR & LILJEROTH, 2005). Em experimentos realizados na EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), 'Gala', 'Golden Delicious' e 'Fuji' apresentaram lesões com abundante esporulação, entre 10 e 14

dias após a inoculação. As macieiras foram inoculadas e mantidas em câmara de inoculação por 48 h, UR 100% e 18 °C (BONETI et al., 2001b). Embora as condições de incubação durante as primeiras 48 h tenham sido semelhantes as utilizadas neste trabalho, as diferenças observadas podem ter sido devidas às condições de temperatura e umidade na casa de vegetação, para onde as macieiras foram transferidas após 48 h.

Na seleção D1R99T15 e nas cultivares Dalinred e Dülmener Rosenapfel foram observados sintomas de resistência ao isolado A8-3 de *V. inaequalis*. Na seleção D1R99T15 os sintomas começaram a aparecer após nove dias de incubação e as reações observadas foram muito semelhantes as observadas na cultivar Prima, ou seja, ausência de sinais e/ou sintomas, clorose e necrose. Na cultivar Dalinred não foram observadas reações nas folhas inoculadas e na ‘Dülmener Rosenapfel’, após 20 dias de incubação, as folhas apresentaram deformação e clorose (Tabela 3).

‘Dülmener Rosenapfel’ é uma macieira antiga, de origem alemã, que tem sido avaliada. Em experimentos realizados em casa de vegetação, no INRA, França, esta cultivar não apresentou esporulação quando inoculada com as raças 1, 6 e 7 de *V. inaequalis*. Além disso, tem se mostrado resistente a uma gama de isolados não caracterizados, coletados na Alemanha, Bélgica, Itália, Suíça, França e Países Baixos (LAURENS et al., 2004).

Reações de suscetibilidade e resistência foram observadas nos acessos de macieiras antigas do Rio Grande do Sul. Os acessos 04 e 17 mostraram-se suscetíveis ao isolado A8-3. O período de aparecimento dos sinais, a incidência e a severidade observadas nestas plantas foram semelhantes às vistas na cultivar suscetível Fuji (Tabela 3). Nas macieiras antigas 09 e 18, após 12 dias de

incubação, foram encontradas reações de resistência. As reações observadas foram ausência de sinais e/ou sintomas, clorose e necrose. Não foram recuperados conídios nas plantas inoculadas com o isolado A8-3 de *V. inaequalis* (Tabela 3). Os acessos 05 e 06 apresentaram clorose e sinais depois de 12 dias de incubação. Os dados de incidência, severidade e esporulação observados nestas plantas antigas foram baixos comparando-se com os dados dos controles suscetíveis 'Gala', 'Golden Delicious' e 'Fuji'. Por isso, estas macieiras foram consideradas resistentes (Tabela 3). Entretanto, a resistência observada nos acessos 05 e 06 pode ser considerada intermediária.

Os seis acessos de macieiras antigas avaliados neste trabalho estão em avaliação no campo, no município de Vacaria, RS. Resultados preliminares da safra de 2003-2004 foram publicados (OLIVEIRA et al., 2005; VALDEBENITO-SANHUEZA & OLIVEIRA, 2006). Os acessos 04 e 09 foram os que apresentaram maior incidência de sarna, cerca de 20 e 21%, respectivamente. A incidência observada nos acessos 18, 05 e 06 foi, aproximadamente, de 12, 7 e 2%, respectivamente. No 17, não foi observada incidência de sarna da macieira.

Na Bélgica, foram feitos testes para avaliar a relação entre plântulas selecionadas como resistentes à sarna da macieira em casa de vegetação e sua suscetibilidade em condições naturais de campo. Os resultados mostraram que a maioria das plântulas selecionadas como resistentes a campo são derivadas de plantas selecionadas com baixa suscetibilidade em experimentos de casa de vegetação. Estes resultados destacam que os testes em casa de vegetação são mais severos do que a seleção sob condições naturais e assim representam uma base sólida para a seleção (LEFRANCQ et al., 2004). Os autores propõem que um bom ajuste para a seleção em casa de vegetação seria selecionar plantas

com escala de severidade entre 0 e 3 (PARISI et al., 1993; CROXALL et al., 1952). Os acessos D1R99T15, 'Dalinred' e 'Dülmener Rosenapfel' e os seis acessos de macieiras antigas avaliados neste experimento apresentaram severidade média entre zero e dois, com base na mesma escala diagramática (Tabela 3).

Contudo, o nível de resistência das macieiras avaliadas neste experimento de casa de vegetação, pode ser diferente em campo e em outras regiões. Um exemplo disto é a cultivar Red Delicious que foi considerada resistente em avaliação feita em casa de vegetação no Canadá, mas na Europa foi encontrada como altamente suscetível no campo (DEWDNEY et al., 2000). Cultivares classificadas como resistentes em testes feitos em casa de vegetação nos EUA, mostraram-se suscetíveis quando colocadas em campo na Inglaterra (WILLIAMS & BROWN, 1968).

A partir dos resultados preliminares obtidos neste trabalho, com avaliação da resistência à sarna em casa de vegetação, e com os dados de incidência de sarna a campo (VALDEBENITO-SANHUEZA & OLIVEIRA, 2006), os acessos de macieiras antigas 05 e 06 colocam-se como candidatas a fontes de resistência à sarna. Esta resistência pode ser quantitativa, devido as baixas incidências observadas. Entretanto, para a confirmação destes resultados, as plantas devem ser avaliadas quanto à resistência a uma maior quantidade de isolados de várias origens e raças. Além disso, a avaliação da progênie resultante do cruzamento destas macieiras antigas com outros acessos de macieira, ajudará a conhecer a base genética destas macieiras antigas.

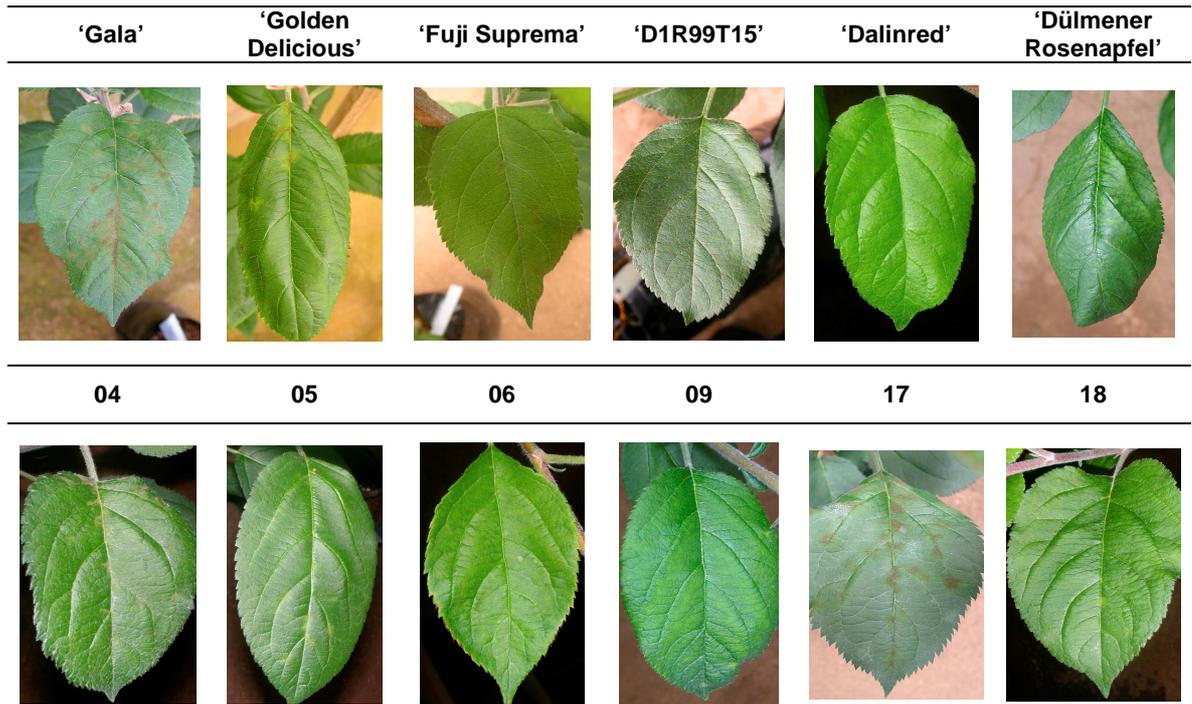


FIGURA 1. Reação das macieiras antigas e outros acessos ao isolado A8-3 de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2006.

TABELA 3. Interação entre 19 acessos de macieira e o isolado A8-3 de *Venturia inaequalis*. Bento Gonçalves, RS. 2006.

Acessos	Incidência ⁽¹⁾	Severidade ⁽²⁾	Período latente ⁽³⁾	Número médio de conídios x 10 ⁵ por cm ² ⁽⁴⁾	Reação ⁽⁵⁾	Classes ⁽⁶⁾	Suscetível ou Resistente
<i>Malus x domestica</i> Gala	100	5,0	12	1,11	C S	4	S
<i>M. x domestica</i> Golden Delicious	83	2,0	12	0,22	C N S	2, 4	S
<i>M. x domestica</i> Fuji Suprema	66	1,8	12	0,07	C N S	3b, 4	S
<i>M. x domestica</i> D1R99T15	0	0,0	9	0,00	A D N	0, 2	R
<i>M. x domestica</i> Dalinred	0	0,0	-	0,00	A	0	R
<i>M. x domestica</i> Dölmener Rosenapfel	0	0,0	20	0,00	D P	0, 2	R
04	66	1,8	12	0,05	C S	3a, 4	S
05	33	1,5	12	0,04	C S	3a, 4	R
06	33	1,0	12	0,01	C S	3a	R
09	0	0,0	12	0,00	A C N	0, 2	R
17	66	1,8	12	0,47	C S	3b, 4	S
18	0	0,0	12	0,00	A C N	0, 2	R
<i>M. pumila</i> TSR34T132	0	0,0	6	0,00	D C N	0, 2	R
<i>M. pumila niedzwetziana</i> Geneva	0	0,0	12	0,00	A C N	0, 2	R
<i>M. pumila</i> TSR33T239	0	0,0	6	0,00	C N	2	R
<i>M. micromalus</i> 9-AR2T196	0	0,0	6	0,00	C N	2	R
<i>M. floribunda</i> clone 821	0	0,0	12	0,00	A D	0	R
<i>M. x domestica</i> Prima	0	0,0	12	0,00	A C N	0, 2	R
<i>M. x domestica</i> Florina	0	0,0	20	0,00	A C	0, 2	R

⁽¹⁾ Percentagem de folhas (6) com sinais.

⁽²⁾ Média de severidade nas folhas com sinais de acordo com a seguinte escala (PARISI et al., 1993; CROXALL et al., 1952): zero = sem sinais e/ou sintomas; 1 = zero-1%; 2 = 1-5%; 3 = 5-10%; 4 = 10-25%; 5 = 25-50%; 6 = 50-75%; e, 7 = 75-100% de área foliar com sinais.

⁽³⁾ Dias após a inoculação em que iniciou o aparecimento de sinais e/ou sintomas. Períodos observados: 6, 9, 12, 20 e 30 dias.

⁽⁴⁾ Número médio de conídios x 10⁵ por cm² de tecido foliar.

⁽⁵⁾ A = ausência de sinais e/ou sintomas; D = deformação; P = pontuações; C = clorose; N = necrose; e, S = sinais.

⁽⁶⁾ Média das classes observadas em seis folhas. Zero) sem sinais e/ou sintomas; 1) reação de hipersensibilidade; 2) resistente = clorose e/ou necrose sem esporulação; 3a) resistência fraca = clorose e/ou necrose com pouca esporulação; 3b) suscetibilidade fraca = clorose e/ou necrose com esporulação evidente; e, 4) suscetível = esporulação abundante (CHEVALIER et al., 1991).

7. CONCLUSÕES

Nas condições em que os experimentos foram realizados e com base nos resultados obtidos, conclui-se o seguinte:

1. A produção de conídios de *Venturia inaequalis* é estimulada em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar-Extrato de Levedura (40; 5; 17; 3 g.L⁻¹), após 12 dias de incubação à 16 °C e luz constante.

2. A raça 1 de *V. inaequalis* está presente nos Estados do Estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

3. A avaliação da reação de acessos de macieira à sarna pode ser feita em folhas destacadas inoculadas por aspersão.

4. Há evidências da presença de resistência à raça 1 de *V. inaequalis* em acessos de macieiras antigas oriundos do Estado do Rio Grande do Sul.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURTO M.A.; CARVAJAL B.P.; MANTHEY G.H. Enfermedades de origem fungoso: *Venturia*. In: **Enfermedades del manzano**, Santiago: INIA CRI, 2004. p.45-53.

AGRIOS G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

BELFANTI, E.; SILFVERBERG-DILWORTH, E.; TARTARINI, S. et al. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, n.3, p.886-890, 2004.

BENAOUF, G.; PARISI, L. Characterization of *Venturia inaequalis* pathogenicity on leaf discs of apple trees. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.104, n.8, p.785-793, 1998.

_____. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains from *Malus floribunda* 821: comparison with race 6 on apple clones. **IOBC WPRS Bulletin**, Croydon, v.20, n.9, p.8-11, 1997.

_____. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, n.3, p.236-242, 2000.

BENGTSSON, M.; LINDHARD, H.; GRAUSLUND, J. Occurrence of races of *Venturia inaequalis* in an apple scab race screening orchard in Denmark. **IOBC WPRS Bulletin**, Fontevraud, v.23, n.12, p.225-229, 2000.

BLUM, L.E.B.; PRADA, A.; MEDEIROS, E.A.A. et al. Temperatura, luminosidade e meio de cultura afetando a produção de esclerócios de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.1, n.1, p.27-32, 2002.

BONETI J. I.; KATSURAYAMA Y. Doenças da macieira (*Malus domestica* Bork.). In: **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 1999. p.13-23

BONETI J. I.; KATSURAYAMA Y.; BLEICHER J. Doenças da macieira. In: **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002a. p.527-537

BONETI J.I.; KATSURAYAMA Y.; SANHUEZA R.M.V. **Manejo da sarna na produção integrada de maçã**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, 2001a. 20p.

_____. Situação atual e perspectiva de obtenção de cultivares e porta-enxertos de macieira resistentes às doenças, para a Região Subtropical. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 2001, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2001b. p.39-52

BONETI, J.I.; RIBEIRO, P.A.; DENARDI, F. et al. Epagri 402 - Catarina: nova cultivar de macieira resistente à sarna. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.9, n.2, p.51-54, 1996.

BONETI J.I.S.; CESA J.D.; PETRI J.L.; BLEICHER J. Evolução da cultura da macieira. In: **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002b. p.37-57

BOONE, D.M. Genetics of *Venturia inaequalis*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.9, p.297-318, 1971.

BRAY, M.F.; AUSTIN, W.G. Conidial suspensions of *Venturia inaequalis* for inoculation of apple rootstock. **Plant Pathology**, London, v.11, p.106-107, 1962.

BROWN, S.K.; MALONEY, K.E.; HEMMAT, M. et al. Apple breeding at Cornell: genetic studies of fruit quality, scab resistance and plant architecture. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.693-697, 2004.

BROWNE, R.A.; MURPHY, J.P.; COOKE, B.M. et al. Evaluation of components of fusarium head blight resistance in soft red winter germ plasm using a detached leaf assay. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, n.4, p.404-411, 2005.

BUS, V.G.M.; GARDINER, S.; BASSET, H. et al. Marker assisted selection for pest and disease resistance in the New Zealand apple breeding programme. **Acta Horticulturae**, Dresden, v.538, p.541-547, 1999.

BUS, V.G.M.; LAURENS, F.N.; VAN DE WEG, W.E. et al. The *Vh8* locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A. **New Phytologist**, Oxford, v.166, n.3, p.1035-1049, 2005a.

BUS, V.G.M.; RIKKERINK, E.H.A.; VAN DE WEG, W.E. et al. The *Vh2* and *Vh4* scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.15, n.1, p.103-116, 2005b.

BUS, V.G.M.; VAN DE WEG, W.E.; DUREL, C.E. et al. Delineation of a scab resistance gene cluster on linkage group 2 of apple. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.57-62, 2004.

CALENGE, F.; FAURE, A.; GOERRE, M. et al. Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.94, n.4, p.370-379, 2004.

CAMARGO L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.470-492

CAMILO A.P.; DENARDI F. Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil. In: **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p.113-168

CHEVALIER, M.; LESPINASSE, Y.; RENAUDIN, S. A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). **Plant Pathology**, London, v.40, n.2, p.249-256, 1991.

CHEVALIER, M.; PARISI, L. Etude d'un comportement atypique de *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. sur vitroplant microbouturé de pomier *Malus x domestica* Bork. **Bulletin de la Societe Botanique de France**, Chatenay - Malabry Cedex, v.138, n.2, p.117-122, 1991.

CROSBY, J.A.; JANICK, J.; PECKNOLD, P.C. et al. Breeding apples for scab resistance: 1945-1990. **Fruit Varieties Journal**, Urbana IL, v.46, n.3, p.145-166, 1992.

CROXALL, H.E.; GWYNNE, D.C.; JENKINS, J.E.E. The rapid assessment of apple scab on leaves. **Plant Pathology**, London, v.1, p.39-41, 1952.

DAPENA, E.; BLÁZQUEZ, M.D. Improvement of the resistance to scab, rosy apple aphid and fire blight in a breeding programme of cider apple cultivars. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.725-727, 2004.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Fred Hough: nova cultivar de macieira com imunidade à sarna. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.1, p.1-6, 1994.

_____. Duquesa: nova cultivar de macieira de baixa exigência em frio hibernar e alta resistência à sarna. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.11, n.4, p.19-21, 1998.

DENARDI, F.; HOUGH, L.F.; CAMILO, A.P. 'Primícia' apple. **Hortscience**, Mount Vernon, v.23, n.3, p.632, 1988.

DEWDNEY, M.; D'ESTIENNE, B.; CHAREST, J. et al. Relative cultivar susceptibility to *Venturia inaequalis* ascospores under greenhouse conditions. **IOBC WPRS Bulletin**, Fontevraud, v.23, n.12, p.199-205, 2000.

DHINGRA O.D.; SINCLAIR J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. 442p.

DUREL, C.E.; PARISI, L.; LAURENS, F. et al. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. **Genome**, Ottawa, v.46, n.2, p.224-234, 2003.

DUREL, C.E.; VAN DE WEG, E.; VENISSE, J.S. et al. Localisation of a major gene for apple scab resistance on the European genetic map of the Prima x Fiesta cross. **IOBC WPRS Bulletin**, Fontevraud, v.23, n.12, p.245-246, 2000.

FAO. **Major food and agricultural commodities and producers**. Disponível em: <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=515&year=2005>. Acesso em: 31 ago. 2006.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.9, p.275-296, 1971.

_____. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, New York, v.8, p.29-54, 1956.

FOOLAD, M.R.; NTAHIMPERA, N.; CHRIST, B.J. et al. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n.9, p.967-972, 2000.

FOTHERGILL, P.B.; ASHCROFT, R. The nutritional requirements of *Venturia inaequalis*. **Journal of General Microbiology**, London, v.12, n.2, p.387-395, 1955b.

_____. Further nutritional studies of *Venturia inaequalis*. **Journal of General Microbiology**, London, v.13, n.2, p.399-407, 1955a.

GADOURY, D.M.; MACHARDY, W.E. A model to estimate maturity of ascospores of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.72, n.7, p.901-904, 1982.

_____. Forecasting ascospore dose of *Venturia inaequalis* in commercial apple orchards. **Phytopathology**, Saint Paul, v.76, n.1, p.112-118, 1986.

HARTMAN, J.R.; PARISI, L.; BAUTRAIS, P. Effect of leaf wetness duration, temperature, and conidial inoculum dose on apple scab infections. **Plant Disease**, Saint Paul, v.83, n.6, p.531-534, 1999.

HARTMAN, J.R.; PAULIN, J.P.; PARISI, L. et al. INRA and apple disease research in the Loire Valley Region of France. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n.9, p.928-936, 2000.

HEMMAT, M.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. Tagging and mapping scab resistance genes from R12740-7A apple. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.127, n.3, p.365-370, 2002.

HOLB, I.J.; HEIJNE, B.; WITHAGEN, J.C.M. et al. Analysis of summer epidemic progress of apple scab at different apple production systems in the Netherlands and Hungary. **Phytopathology**, Saint Paul, v.95, n.9, p.1001-1020, 2005.

HUARACHA, E.M.; XU, M.L.; GASIC, K. et al. Phenotypic reaction and genetic analysis using AFLP-derived SCARs for resistance to apple scab. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.152, n.5, p.260-266, 2004.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 21 jul. 2006.

IUCHI V.L. Botânica e fisiologia. In: **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p.59-104

IVANICKA, J.; KELLERHALS, M.; THEILER, R. Evaluation of scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G Wint) on shoots and detached leaves from in vitro and greenhouse grown plants of the apple (*Malus domestica* mill) cultivars Golden Delicious and Florina. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v.61, n.5, p.242-248, 1996.

JANICK J.; CUMMINS J.N.; BROWN S.K.; HEMMAT M. Apples. In: **Fruit breeding: tree and tropical fruits**. New York: John Wiley & Sons, 1996. p.1-77

JIA, Y.; VALENT, B.; LEE, F.N. Determination of host responses to *Magnaporthe grisea* on detached leaves using a spot inoculation method. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, n.2, p.129-133, 2003.

JONES A.L.; SUTTON T.B. Pome fruits. In: **Diseases of tree fruits**. Michigan: Cooperative Extension Service of Michigan State University, 1984. p.1-4

JÖNSSON, A.H. Consumer evaluation of scab resistance apple cultivars. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.875-878, 2004.

KEITT, G.W.; LANGFORD, M.H. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. I. A groundwork for genetic studies. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.28, p.805-820, 1941.

KEITT, G.W.; PALMITER, D.H. Heterotallism and varialibity in *Venturia inaequalis*. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.25, n.1, p.338-345, 1938.

KHANIZADEH, S.; GROLEAU, Y.; LEVASSEUR, A. et al. 'SuperMac' apple. **Hortscience**, Alexandria, v.41, n.5, p.1159-1161, 2006.

KHANIZADEH, S.; LAURENS, F.; LESPINASSE, Y. et al. 'Galarina' apple. **Hortscience**, Alexandria, v.38, n.3, p.477-478, 2003.

KOHL, R.; KOLLAR, A. Impairment of ontogenic resistance of apple against *Venturia inaequalis*. **Norwegian Journal of Agricultural Sciences**, Norway, supplement 17, p.399-402, 1994.

KOLLER, W.; PARKER, D.M.; TURECHEK, W.W. et al. A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. **Plant Disease**, Saint Paul, v.88, n.5, p.537-544, 2004.

KOLLER, W.; WILCOX, W.F.; BARNARD, J. et al. Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. **Phytopathology**, Saint Paul, v.87, n.2, p.184-190, 1997.

KOLLER, W.; WILCOX, W.F.; JONES, A.L. Quantification, persistence, and status of dodine resistance in New York and Michigan orchard populations of *Venturia inaequalis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.83, n.1, p.66-70, 1999.

KORBAN, S.S.; GOFFREDA, J.C.; JANICK, J. 'Co-op 43' (Juliet (TM)) apple. **Hortscience**, Alexandria, v.38, n.1, p.144-145, 2003.

LAURENS, F. Research studies developed on the genetics of apple and their application on the current breeding programmes. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA SOBRE FRUTEIRAS DE CLIMA TEMPERADO, 2005, Bento Gonçalves. **Programa e Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. p.15-18

LAURENS, F.; CHEVALIER, M.; DOLEGA, E. et al. Local european cultivars as sources of durable scab resistance in apple. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.115-121, 2004.

LEBEN, C.; KEITT, G.W. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. V. The influence of carbon and nitrogen sources and vitamins on growth in vitro. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.35, n.10, p.337-343, 1948.

LEFRANCQ, B.; LATEUR, M.; RONDIA, A. Screening method for polygenic scab resistance within an apple breeding programme: relationship between early greenhouse screening test on young seedlings and their scab susceptibility in natural field conditions. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.793-797, 2004.

LESPINASSE, Y. Breeding pome frutis with stable resistance to diseases. Genes, resistance mechanisms, present work and prospects. **IOBC wprs Bulletin**, Darmstadt, v.2, p.100-115, 1989.

LESPINASSE, Y.; DUREL, C.E.; PARISI, L. et al. An European project: D.A.R.E. - Durable Apple Resistance in Europe (FAIR 5 CT97-3898) Durable resistance of apple to scab and Powdery-mildew: one step more towards an environmental friendly orchard. **IOBC WPRS Bulletin**, Fontevraud, v.23, n.12, p.257-260, 2000.

LI, B.; XU, X. Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.150, n.11-12, p.687-691, 2002.

LIEBHARD, R.; KOLLER, B.; PATOCCHI, A. et al. Mapping quantitative field resistance against apple scab in a 'Fiesta' x 'Discovery' progeny. **Phytopathology**, Saint Paul, v.93, n.4, p.493-501, 2003.

LUZ, W.C. Classificação dos seres vivos para o novo milênio. Parte II: classificação dos fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.9, p.1-62, 2001.

MACHARDY W.E. **Apple scab**: biology, epidemiology and management. Saint Paul, Minnesota: APS PRESS, 1996. 545p.

MARTINEZ-BILBAO, A.; MURILLO, J. Six races of *Venturia inaequalis* are found causing apple scab in Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, n.8, p.908, 2005.

MELZER R.; BERTON O. **Sistema de alerta para o controle da sarna da macieira**. Florianópolis: EMPASC, 1989. 75p.

NICHOLSON, R.L.; VAN SCOYOC, S.W.; KUC, J. et al. Response of detached apple leaves to *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.63, n.5, p.649-650, 1972.

NUSBAUM, C.J.; KEITT, G.W. A cytological study of *Venturia inaequalis* on apple leaves. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.56, n.8, p.595-618, 1938.

NYBOM, H. 'Frida' and 'Fredrik', the first scab-resistant apple cultivars developed in Sweden. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.871-874, 2004.

OLAYA, G.; KOLLER, W. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. **Plant Disease**, Saint Paul, v.83, n.3, p.274-278, 1999.

OLIVEIRA, P.R.D.; VALDEBENITO-SANHUEZA R.M.; BERNARDI J. Coleta, avaliação e preservação de plantas antigas de macieira - resultados iniciais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais Digitais...** Gramado, 2005.

PARISI, L.; DUREL, C.E.; LAURENS, F. First report on the presence of *Venturia inaequalis* race 7 in French apple orchards. **IOBC WPRS Bulletin**, Fontevraud, v.23, n.12, p.99-104, 2000.

PARISI, L.; FOUILLET, V.; SCHOUTEN, H.J. et al. Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.107-113, 2004.

PARISI, L.; LESPINASSE, Y. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus* sp). **Plant Disease**, Saint Paul, v.80, n.10, p.1179-1183, 1996.

PARISI, L.; LESPINASSE, Y.; GUILLAUMES, J. et al. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, n.5, p.533-537, 1993.

_____. A new race of *Venturia inaequalis* overcomes apple resistance due to the *Vf* gene. **Norwegian Journal of Agricultural Sciences**, Norway, p.95-104, 1994 Supplement 17.

PARKER, D.M.; HILBER, U.W.; BODMER, M. et al. Production and transformation of conidia of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, n.1, p.87-91, 1995.

PATOCCHI, A.; BIGLER, B.; KOLLER, B. et al. Vr(2): a new apple scab resistance gene. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.109, n.5, p.1087-1092, 2004.

PEIL, A.; HANKE, V.; FISCHER, C. Six new apple cultivars from Dresden-Pillnitz. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.883-886, 2004.

PELLETIER, R.L.; KEITT, G.W. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. VI. Amino acids as sources of nitrogen. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.41, p.362-371, 1954.

PETRI J.L. Formação de flores, polinização e fertilização. In: **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p.229-260

PUTTOO, B.L.; CHAUDHARY, K.C.B. A muslin wick culture technique for mass production of conidia of *Venturia inaequalis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.121, n.4, p.373-375, 1988.

ROBERTS, A.L.; CRUTE, I.R. Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda*. **Norwegian Journal of Agricultural Sciences**, Norway, supplement 17, p.403-406, 1994.

ROEN, D.; MOE, S.N.; NORMES, L. Evaluation of scab and mildew resistance in local apple cultivars in Norway. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.213-216, 2004.

ROSS, R.G. Conidium production of *Venturia inaequalis* in synthetic culture media. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.54, n.1, p.93-100, 1974.

ROSSI, V.; GIOSUE, S.; BUGIANI, R. A model simulating deposition of *Venturia inaequalis* ascospores on apple trees. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, Paris, v.33, n.3, p.407-414, 2003.

ROSSI, V.; PONTI, I.; MARINELLI, M. et al. Environmental factors influencing the dispersal of *Venturia inaequalis* ascospores in the orchard air. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.149, n.1, p.11-19, 2001.

SALLATO, B.V.; LATORRE, B.A. First report of practical resistance to Qol fungicides in *Venturia inaequalis* (apple scab) in Chile. **Plant Disease**, Saint Paul, v.90, n.3, p.375, 2006.

SANDSKAR, B.; GUSTAFSSON, M. Classification of apple scab resistance in two assortment orchards. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.51, n.2, p.197-203, 2004.

_____. Susceptibility of twenty-two apple cultivars to apple scab in Sweden. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.109, n.4, p.338-349, 2002.

SANDSKAR, B.; LILJEROTH, E. Incidence of races of the apple scab pathogen (*Venturia inaequalis*) in apple growing districts in Sweden. **Acta Agriculturae**

Scandinavica Section B-Soil and Plant Science, Stockholm, v.55, n.2, p.143-150, 2005.

SCHNABEL, G.; SCHNABEL, E.L.; JONES, A.L. Characterization of ribosomal DNA from *Venturia inaequalis* and its phylogenetic relationship to rDNA from other tree fruit *Venturia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v.89, n.1, p.100-108, 1999.

SHAY, J.R.; HOUGH, L.F. Evaluation of apple scab resistance in selections of *Malus*. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.39, n.4, p.288-297, 1952.

SHAY, J.R.; WILLIAMS, E.B. Identification of three physiological races of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.46, n.4, p.190-193, 1956.

SHAY, J.R.; WILLIAMS, E.B.; JANICK, J. Disease resistance in apple and pear. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v.80, p.97-104, 1962.

SIEROTZKI, H.; EGGENSCHWILER, M.; BOILLAT, O. et al. Detection of variation in virulence toward susceptible apple cultivars in natural populations of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.84, n.10, p.1005-1009, 1994.

SILVA C.H.P.M. Meios de cultura. In: **Bacteriologia: um texto ilustrado**, Teresópolis: Eventos, 1999. p.355-380

SIVANSEN A. **The taxonomy and pathology of *Venturia* species**. Vaduz, Liechtenstein: Bibliotheca Mycologica, 1977.

SMEREKA, K.J.; MACHARDY, W.E.; KAUSCH, A.P. Cellular differentiation in *Venturia inaequalis* ascospores during germination and penetration of apple leaves. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.65, n.12, p.2549-2561, 1987.

SZKOLNIK M. Preparation of inoculum for brown rot of stone fruit and apple scab. In: **Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens**, Saint Paul: APS Press, 1986. p.71-72

TARTARINI, S.; GENNARI, F.; PRATESI, D. et al. Characterisation and genetic mapping of a major scab resistance gene from the old italian apple cultivar 'Durello di Forlì'. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.129-133, 2004.

TENZER, I.; GESSLER, C. Genetic diversity of *Venturia inaequalis* across Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, n.6, p.545-552, 1999.

TÓTH, M.; KÁSA, K.; SZANI, Zs. et al. Traditional old apple cultivars as new genes sources for apple breeding. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.609-612, 2004.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; OLIVEIRA, P.R.D. Resgate de macieiras antigas no Rio Grande do Sul - uma opção para a manutenção da diversidade genética. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.158-159, 2006.

VOLZ, R.K.; WHITE, A.G.; BROOKFIELD, P.L. et al. Breeding and development of the new apple cultivar 'JazzTM'. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.891-894, 2004.

WENZEL, I.M.; ALMEIDA, J.E.M.; CARDOSO, E.R. Efeito de diferentes concentrações de dextrose e extrato de levedura no desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii* em fermentação líquida. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.127-131, 2005.

WILLIAMS, E.B.; BROWN, A.G. A new physiologic race of *Venturia inaequalis*, incitant of apple scab. **Plant Disease Reporter**, Beltsville MD, v.52, n.10, p.799-801, 1968.

WILLIAMS, E.B.; KUC, J. Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.7, p.223-246, 1969.

WIN, J.; GREENWOOD, D.R.; PLUMMER, K.M. Characterisation of a protein from *Venturia inaequalis* that induces necrosis in *Malus* carrying the *Vm* resistance gene. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.62, n.4, p.193-202, 2003.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Pathogenesis of *Venturia inaequalis* on shoot-tip cultures and on greenhouse-grown apple cultivars. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, n.11, p.1155-1162, 1993a.

_____. Selection of resistance to *Venturia inaequalis* using detached leaves from *in vitro* grown apple shoots. **Plant Science**, Clare, v.93, n.1-2, p.211-216, 1993b.

ZAYATS, V.A. Rural cultivars as an important source of resistance genes. **IOBC WPRS Bulletin**, Fontevraud, v.23, n.12, p.111-113, 2000.

ZURAWICZ, E.; LEWANDOWSKI, M.; BRONIAREK-NIEMIEC, A. et al. Preliminary results on the production value of new scab-resistant apple cultivars bred at the Research Institute of Pomology and Floriculture (RIPF), Skierniewice, Poland. **Acta Horticulturae**, Angers, v.663, p.879-882, 2004.