



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS**  
**CÂMPUS IPAMERI**  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal



**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E SEVERIDADE DE**  
*Cephaleuros virescens* **EM MANGUEIRA**

**CAMILA VILELA VASCONCELOS**

**MESTRADO**

**Ipameri-GO**  
**2015**

CAMILA VILELA VASCONCELOS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E SEVERIDADE  
DE *Cephaleuros virescens* em mangueira**

Orientador: Prof. Dr. Daniel Diego Costa Carvalho

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Goiás – UEG, Câmpus Ipameri, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal para obtenção do título de Mestre.

**Ipameri-GO  
2015**

Vasconcelos, Camila Vilela.

Caracterização morfofisiológica e severidade de  
*Cephaleuros virescens* em mangueira - 2015.  
43 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Diego Costa Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Goiás -  
Câmpus Ipameri, 2015.

Bibliografia.

1. Epidemiologia 2. Fitopatologia 3. Fisiologia *in vitro*  
4. Fruticultura 5. Sintomatologia.

I. Título.



Unidade Universitária de Ipameri  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal  
Rodovia GO 330, Km 241, Anel Viário, 75780-000 Ipameri-GO  
[www.ppgpv.ueg.br](http://www.ppgpv.ueg.br) e-mail: [ppgpv.ipameri@gmail.com](mailto:ppgpv.ipameri@gmail.com)  
Fone: (64)3491-5219



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** “CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E SEVERIDADE DE  
*Cephaeleuros virescens* EM MANGUEIRA”

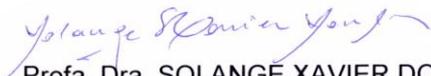
**AUTORA:** Camila Vilela Vasconcelos

**ORIENTADOR:** Daniel Diego Costa Carvalho

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM  
PRODUÇÃO VEGETAL, pela comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. DANIEL DIEGO COSTA CARVALHO  
Universidade Estadual de Goiás/Ipameri-GO

  
Prof. Dr. NEI PEIXOTO  
Universidade Estadual de Goiás/Ipameri-GO

  
Profa. Dra. SOLANGÉ XAVIER DOS SANTOS  
Universidade Estadual de Goiás/Anápolis-GO

Data da realização: 20 de fevereiro de 2015.

*Ao meu marido pelo incentivo, compreensão e amor.*

*Aos meus pais por tudo*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Almeri e José, por terem me proporcionado a oportunidade de estudar apesar das adversidades, sempre com muito amor. Ao meu marido Eduardo pelo enorme incentivo e por sempre acreditar em mim. Ao meu avô (*in memoriam*) e minha avó pelas lições de vida e carinho.

À Universidade Estadual de Goiás pelo suporte na realização dos trabalhos.

Aos professores do curso pelo acolhimento e ensinamentos. Ao meu orientador Daniel pelos ensinamentos e imensa dedicação em me orientar. Ao professor Nei pelos ensinamentos transmitidos e pelo carinho.

Aos funcionários da UEG, em especial a Joseliana (Josi) e a Maria que sempre me ajudaram.

À Fabíola pela amizade, carinho e imensa ajuda nos trabalhos realizados.

À minha grande amiga Laryssa pelos incentivos, conselhos e por tantos anos de amizade.

Aos amigos: Fabrício, Lígia, Hellen pelo apoio e momentos de alegria proporcionados.

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO.....</b>	iv
<b>ABSTRACT.....</b>	v
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	1
1.1 Importância da fruticultura no Brasil.....	1
1.2 Aspectos relevantes para o conhecimento de algas parasitas de plantas.....	1
1.3 Caracterização micromorfológica de algas parasitas de plantas.....	3
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	5
<b>Capítulo I: Caracterização micromorfológica e isolamento do agente causal da mancha de algas (<i>Cephaleuros</i> sp.) em mangueira.....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO.....</b>	7
<b>ABSTRACT.....</b>	7
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	8
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	9
<b>3 RESULTADOS.....</b>	11
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	19
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	23
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	23
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	23
<b>Capítulo II: Incidência e severidade de mancha de algas em mangueira cv. ‘Amrapali’.....</b>	<b>25</b>
<b>RESUMO.....</b>	26
<b>ABSTRACT.....</b>	26
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	27
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	27
<b>3 RESULTADOS.....</b>	28
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	29
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	30
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	30
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	31
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	33
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	34

## RESUMO

A manga é considerada uma das mais importantes frutas tropicais cultivadas no mundo, em que o Brasil é o sétimo produtor mundial. Entretanto, muitos são os problemas encontrados nesta cultura como a mancha de algas, causada por *Cephaleuros* sp., que após se instalar em plantas de mangueira causam lesões foliares e tendem a se expandir e, como consequência ocorre redução da área fotossintética das folhas. Há poucos estudos referentes a características morfológicas, isolamento e epidemiologia deste microrganismo. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização taxonômica do agente causal da mancha de algas em mangueira, o seu isolamento em meio de cultura, estudo da sua fisiologia *in vitro* e distribuição de lesões no campo. Para tanto, foi realizada a caracterização em microscópio de luz das estruturas do patógeno e o isolamento foi avaliado em diversos meios de cultura (com e sem adição de hormônios), com subsequente avaliação do crescimento e a observação da gênese de estruturas reprodutivas. Para estimar a incidência e severidade, um total de dez plantas (5 x 5 m) do pomar da Universidade Estadual de Goiás (UEG) foram avaliadas ao longo de cinco dias. Assim, com relação a sintomatologia, foram observadas lesões foliares de formato arredondado e coalescentes, de cor laranja, com textura aveludada, principalmente na face adaxial. As dimensões obtidas para esporangióforos e esporângios foram de 245,5 - 545,6 x 10,5 - 19,1  $\mu\text{m}$  e de 21,4 - 34,2 x 16,3 - 24,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Não foi possível o isolamento da alga, a partir de fragmentos de tecido, em meio sólido, mas apenas em meio líquido Trebouxia. Entretanto, após isolamento em meio líquido, foi possível o cultivo em meio sólido, onde estruturas vegetativas e reprodutivas puderam ser visualizadas, com ou sem adição de hormônio, dependendo do meio de cultura. Na avaliação em campo, a incidência da doença nas plantas foi de 80 - 100% (média de 92,25%) não havendo diferença estatística entre as plantas; enquanto que para a severidade, metade das plantas exibiram de 4,68 a 7,31% de área foliar coberta com sintomas da mancha de algas (afcsma) e a outra metade posicionou-se em uma faixa superior (de 9,37 a 15,06% de afcsma). Assim conclui-se que: (1) descrições baseadas na sintomatologia, aliada às características micromorfológicas indicaram, que a alga encontrada em mangueira trata-se de *Cephaleuros virescens*; (2) o tamanho do esporangióforo é um caractere mais seguro para diferenciar *C. virescens* de *C. parasiticus*; (3) há necessidade da germinação de estruturas reprodutivas para originar talo vegetativo *in vitro*; (4) a adição de hormônio ao meio de cultivo, individualizada, não está relacionada como promotor do processo de gametogênese *in vitro* em *Cephaleuros*; (5) de forma oposta a incidência, a severidade possibilita evidenciar plantas em maior grau de ataque do que as demais e; (6) plantas com maior sombreamento apresentam maior severidade.

**Palavras-chave:** Epidemiologia, Fitopatologia, Fisiologia *in vitro*, Fruticultura, Sintomatologia.

## ABSTRACT

The mango is one of the most important tropical fruit grown in the world, in which Brazil is the seventh world producer. However, there are many problems in this culture as the algal leaf spot, caused by *Cephaleuros* sp., that after install in mango cause leaf spots and tend to expand and, as consequence there is a reduction in the photosynthetic area of leaves. There are few studies about morphological characteristics, isolation and epidemiology of this microorganism. The objective of this work was the taxonomic characterization of the causal agent of the algal leaf spot in mango, its isolation in culture medium, study their *in vitro* physiology and distribution of lesions in the field. For this, was performed the characterization in light microscopy of pathogen structures and isolation was evaluated in various culture medium (with and without added hormones), with subsequent growth assessment and observation of the genesis of reproductive structures. To estimate the incidence and severity, a total of ten plants (5 x 5 m) from the orchard of the University State of Goiás (UEG) were evaluated along five days. Thus, with respect to symptoms, have been observed foliar lesions rounded and coalescing format, orange color, with velvety texture, especially in the upper side. The dimensions obtained for sporangiophores and sporangia were 245.5 - 545.6 x 10.5 - 19.1  $\mu\text{m}$  and 21.4 - 34.2 x 16.3 - 24.7  $\mu\text{m}$ , respectively. The isolation of the algae from tissue fragments on solid medium was not possible, but only in liquid medium Trebouxia. However, after isolation in liquid medium, was possible cultivation in solid medium, where vegetative and reproductive structures could be visualized, with or without added hormone, depending on the culture medium. In the field evaluation, the incidence of the disease in plants was 80 - 100% (mean 92.25%) with no statistical difference between plants; while for the severity, half of the plants exhibited 4.68 to 7.31% of leaf area covered with stain symptoms of algae (afcsma) and the other half positioned itself in a higher range (9.37 to 15.06% of afcsma). Unlike incidence, the severity showed plants in greater attack than the others. Thus it is concluded that: (1) Based on the descriptions of the symptomatology, combined with the micromorphological characteristics, indicated that the algae found in mango is *Cephaleuros virescens*; (2) The size of the sporangiophore is a safer character to differentiate *C. virescens* x *C. parasiticus*; (3) Germination of reproductive structures is required to give vegetative stem *in vitro*; (4) The addition of the hormone to the culture medium, individually, is not related as promoter of *in vitro* gametogenesis process in *Cephaleuros*; (5) As opposed to the incidence, the severity enables show plants with greater degree of attack than the others and; (6) Plants with higher shading present higher severity.

**Key-words:** Epidemiology, Phytopathology, *In vitro* physiology, Fruit production, Symptomatology.

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Importância e problemas da fruticultura no Brasil**

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma colheita que excede 40 milhões de toneladas anuais, com um alto consumo interno, muito especialmente pela melhoria de renda dos brasileiros (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2014). A produção de manga (*Mangifera indica* L.) está em grande expansão por causa da sua larga aceitação nos mercados interno e externo, sendo uma das frutas mais exportadas principalmente para o mercado da Europa, alcançando preços compensadores (BUSTAMANTE, 2009). A manga é considerada uma das mais importantes frutas tropicais cultivadas no mundo, em que o Brasil é o sétimo produtor mundial, tendo como maior região produtora o Nordeste (LIMA et al., 2009; ALENCAR et al., 2012). Em 2012 a produção brasileira de manga, foi de 1.175.735 toneladas e a área cultivada alcançou 73.690 hectares (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2012).

Entretanto, muitos são os problemas encontrados na cadeia produtiva desta cultura, como as doenças causadas por microrganismos, que em muitos casos são limitantes a sua exploração comercial tendo em vista as perdas qualitativas e quantitativas (SALES JÚNIOR et al., 2004). As doenças fúngicas são as mais estudadas, entre as quais, pode-se mencionar a mal formação da mangueira causada principalmente, no Brasil, por *Fusarium tuiense*, o qual afeta as inflorescências resultando na não produção de frutos (LIMA et al., 2012) e a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) que resulta em danos na casca do fruto, depreciando-o para exportação (LIMA et al., 2007). As algas do gênero *Cephaleuros* sp. também causam danos a cultura da mangueira, as quais formam manchas circulares de coloração alaranjada e textura semelhante a feltro, que com o tempo, tendem a se expandir, apresentando superfície lisa e de coloração pardo-acinzentada, ocupando um grande volume foliar (PONMURUGAN et al., 2009; HAN et al., 2011).

### **1.2 Aspectos relevantes para o conhecimento de algas parasitas de plantas**

As algas são frequentemente consideradas protistas com cloroplastos e podem ser unicelulares com formação de colônias, ou multicelulares de vida livre, ambas com clorofila b (AGRIOS, 2005). A ordem das algas verdes Trentepohliales (Chlorophyta) consiste de uma única família, a Trentepohliaceae, com seis gêneros. Embora existam dúvidas sobre qual classe a família Trentepohliaceae pertence, estudos moleculares apontam que ela é Ulvophyceae (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2003; SUTO e OHTANI, 2009). As algas da família Trentepohliaceae não são aquáticas, como a maioria, mas sim subaéreas, crescendo em solos úmidos, rochas, casca de árvores, folhas, caules e frutos (LÓPEZ-BAUTISTA et al.,

2002). Algumas espécies são endofíticas, outras parasitárias, enquanto outras crescem em estreita associação com fungos, formando líquens (CHAPMAN e WATERS, 2002). As células são uni ou multinucleadas, com vários cloroplastos parietais que podem ser discóides ou em forma de banda, às vezes aparecendo reticulados (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2002).

A alga *Cephaleuros* sp., formada por 15 espécies, consiste em filamentos ramificados, livres ou em coalescência, os quais formam discos irregulares que crescem por baixo da cutícula e da epiderme de folhas de plantas superiores e causam manchas foliares e em caules de mais de 200 espécies de plantas, principalmente nos trópicos (AGRIOS, 2005; LÓPEZ-BAUTISTA, 2006). *Cephaleuros*, normalmente é relatada como uma epífita obrigatória e pode ser também parasitária, onde os haustórios são, por vezes, presentes no interior dos tecidos da planta hospedeira (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2002).

O primeiro trabalho desenvolvido no Brasil foi o de Batista e Lima (1949), que listaram 448 hospedeiros do gênero *Cephaleuros*, porém não verificaram os danos causados por essas algas em seus hospedeiros. Akiyama (1971) fez um estudo taxonômico de algas da família Trentepohliaceae em São Paulo e citou uma chave de identificação que considerou a existência de quatro gêneros (*Cephaleuros*, *Trentepohlia*, *Stomatochroon* e *Phycopeltis*). Porém, encontrou apenas espécies de *Trentepohlia* e *Phycopeltis*, e descreveu uma chave de identificação para espécies de *Trentepohlia* existentes no Brasil.

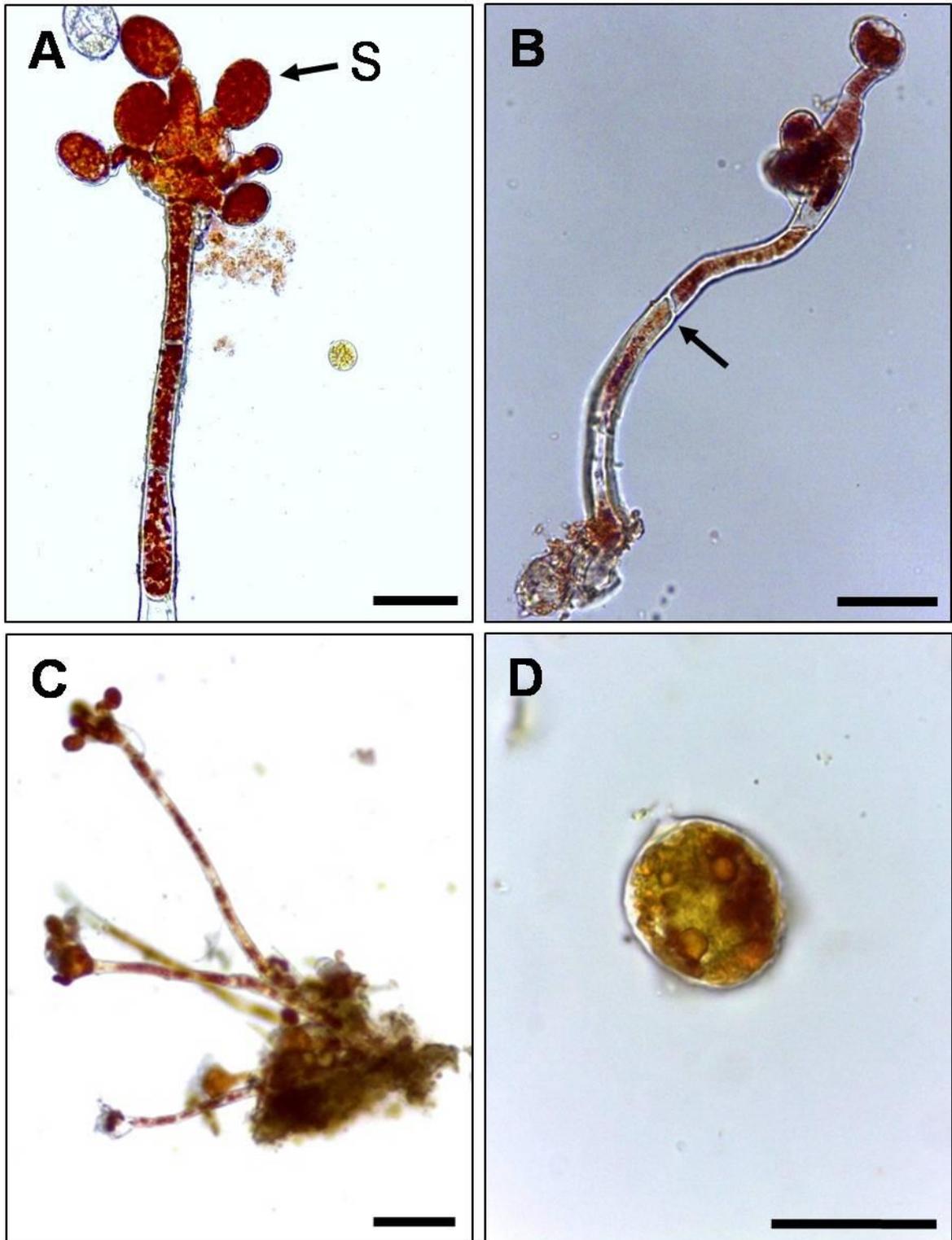
Brooks (2004) em estudo realizado no ano 2002 na ilha de Tutuila (Samoa Americana) analisou 146 espécies de hospedeiros e identificou algas da família Trentepohliaceae: cinco espécies de *Cephaleuros* (*C. expansa*; *C. karstenii*; *C. minimus*; *C. parasiticus* e *C. virescens*), duas de *Phycopeltis* (*P. epiphytone* e *P. irregulares*) e duas de *Stomatochroon* (*S. coalitum* e *S. consociatum*). Das cinco espécies de *Cephaleuros* identificadas, *C. virescens* foi a mais prevalente, seguida por *C. parasiticus*. Esse autor também estudou a patogenicidade de *Cephaleuros*, em que o percentual de área foliar coberta por *Cephaleuros* spp. variou entre as espécies hospedeiras: 66% das infecções foram leves, 25% moderadas, e 9% intensas, sendo que das infecções associadas com *C. virescens* 29% foram moderadas e 9% intensas. Segundo Farr e Rossman (2014), foram identificadas cinco espécies de *Cephaleuros* sp. (*C. lagerheimii*, *C. minimus*, *C. mycoidea*, *C. parasiticus* e *C. virescens*) ocorrentes em 68 (sessenta e oito) hospedeiros. Desse total foram registradas duas espécies hospedeiras de *C. lagerheimii*, quatro de *C. minimus*, seis de *C. mycoidea*, seis de *C. parasiticus* e 50 (cinquenta) de *C. virescens*. Quanto a *Mangifera indica* foram registradas três ocorrências de *C. virescens*. Para exemplificar, podem-se citar alguns trabalhos recentes em diversos países e plantas cultivadas, enfocando *Cephaleuros* spp. (Quadro 1).

**Quadro 1.** Alguns exemplos de trabalhos recentes com a alga *Cephaleuros* sp.

<b>Alga</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Referência</b>
<i>Cephaleuros virescens</i>	<i>Psidium guajava</i> , <i>Mangifera indica</i>	Quezada-Gutiérrez et al. (2009)
<i>Cephaleuros virescens</i>	<i>Citrus sinensis</i> , <i>C. reticulata</i> , <i>C. limetta</i>	Malagi et al. (2011)
<i>Cephaleuros virescens</i> , <i>C. parasiticus</i>	<i>Polyalthia longifolia</i> , <i>Syzygium aromaticum</i>	Suto et al. (2014)
<i>Cephaleuros virescens</i>	<i>Ficus benghalensis</i>	Han et al. (2011)
<i>Cephaleuros parasiticus</i>	<i>Camellia sinensis</i>	Ramya et al. (2013)
<i>Cephaleuros aucubae</i> , <i>C. biolophus</i> , <i>C. microcellularis</i>	<i>Aucuba Japonica</i> , <i>Myrica rubra</i> , <i>Symplocos lucida</i>	Suto e Ohtani (2011)

### 1.3 Caracterização micromorfológica de algas parasitas de plantas

Em se tratando de estudos morfológicos de microrganismos, principalmente focados na caracterização e taxonomia de diversos grupos, a exemplo dos microfungos, são medidos os esporos e demais estruturas propagativas em suas dimensões, tais como comprimento e largura (CARVALHO et al., 2008). Em se tratando de organismos de outros grupos, existem outras estruturas de propagação importantes para a taxonomia, como os esporângios das algas e dos organismos do reino Chromista (LÓPEZ-BAUTISTA et al., 2002) e, fundamentalmente, as dimensões são mensuradas de forma similar aos fungos do reino Fungi. Especificamente, em estudos sobre as características morfológicas das estruturas do agente causal, a alga *Cephaleuros*, é comumente caracterizada através do número de esporângios por esporangióforo (Figuras 1A e 1B), medindo também o comprimento e largura do esporângio (MALAGI et al., 2011). Dentre outros componentes avaliados, destacam-se os esporangióforos, se estão solitários (Figura 1A e 1B) ou em forma de tufo (Figura 1C), onde também mensura-se seu comprimento e largura (HAN et al., 2011). Segundo Quezada-Gutiérrez et al. (2009), nas folhas da mangueira, os esporângios encontrados apresentaram a forma oval (Figura 1D) com valores de 25-35  $\mu\text{m}$  x 17,5-27,5  $\mu\text{m}$ . É importante salientar que nem todos os caracteres morfológicos são completamente avaliados em cada estudo publicado, isto é, existe uma falta de padronização dos caracteres que necessitam ser mensurados.



**Figura 1.** Características micromorfológicas de *Cephaleuros virescens*. **A)** Esporangióforo solitário com seis esporângios (S: esporângio); **B)** Esporangióforo solitário (seta mostra septo visível); **C)** Esporangióforo ocorrendo em forma de tufo e; **D)** Esporângio em maior detalhe. Barras (A, B, C e D = 29; 32; 62 e 26,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Foto: Camila Vilela Vasconcelos (2014).

### 3 OBJETIVOS:

- 1 - Realizar a caracterização micromorfológica do agente causal da mancha de algas através da visualização e mensuração em microscópio óptico das estruturas do patógeno obtido de folhas infectadas;
- 2 - Desenvolver tecnologia de isolamento, em que também será realizada caracterização cultural, de crescimento das colônias e da fisiologia *in vitro* do patógeno em diversos meios de cultura;
- 3 - Realizar a caracterização micromorfológica de células do talo vegetativo e estudo da gênese das estruturas reprodutivas do microrganismo sob condições de cultivo *in vitro* com e sem adição de hormônios;
- 4 - Realizar avaliação da incidência e severidade da mancha de algas em mangueiras em campo.

## Capítulo I

**Caracterização micromorfológica e isolamento do agente causal da mancha  
de algas (*Cephaleuros* sp.) em mangueira**

## RESUMO

Após se instalar em plantas de mangueira, as lesões causadas por *Cephaleuros* sp. tendem a se expandir e, como consequência ocorre redução da área fotossintética das folhas. Estes organismos são difíceis de serem cultivados *in vitro* e, portanto, pouco estudados no mundo. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização taxonômica do agente causal da mancha de algas em mangueira, o seu isolamento em meio de cultura e estudo da sua fisiologia *in vitro*. Para tanto, foi realizada a caracterização em microscópio de luz das estruturas do patógeno e o isolamento foi avaliado em diversos meios de cultura (com e sem adição de hormônios), com subsequente avaliação do crescimento e a observação da gênese de estruturas reprodutivas. Com relação a sintomatologia, foram observadas lesões foliares de formato arredondado e coalescentes, de cor laranja, com textura aveludada, principalmente na face adaxial. As dimensões obtidas para esporangióforos e esporângios foram de 245,5 - 545,6 x 10,5 - 19,1  $\mu\text{m}$  e de 21,4 - 34,2 x 16,3 - 24,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Não foi possível o isolamento da alga, a partir de fragmentos de tecido, em meio sólido, mas apenas no meio líquido Trebouxia. Entretanto, após isolamento em meio líquido, foi possível o cultivo em meio sólido, onde estruturas vegetativas e reprodutivas puderam ser visualizadas, com ou sem adição de hormônio, dependendo do meio de cultura. Assim conclui-se que: (1) descrições baseadas na sintomatologia, aliada às características micromorfológicas indicaram, que a alga encontrada em mangueira trata-se de *Cephaleuros virescens*; (2) o tamanho do esporangióforo é um caractere mais seguro para diferenciar *C. virescens* de *C. parasiticus*; (3) há necessidade da germinação de estruturas reprodutivas para originar talo vegetativo *in vitro* e; (4) a adição de hormônio ao meio de cultivo, individualizada, não está relacionada como promotor do processo de gametogênese *in vitro* em *Cephaleuros*.

**Palavras-chave:** Fisiologia *in vitro*, Fruticultura, Meio de cultura, Taxonomia.

## ABSTRACT

After get settled in mango plants, the lesions caused by *Cephaleuros* sp. tend to expand and, as result there is a reduction in photosynthetic area of leaves. These organisms are difficult to be cultivated *in vitro* and, therefore, little studied in the world. The objective of this work was perform the taxonomic characterization of the causal agent of the algal leaf spot in mango, its isolation in culture medium and study their *in vitro* physiology. For this, was performed the characterization in light microscopy of pathogen structures and isolation was evaluated in various culture medium (with and without added hormones), with subsequent growth assessment and observation of the genesis of reproductive structures. Thus, regarding the symptoms, have been observed foliar lesions rounded and coalescing format, orange color, with velvety texture, especially in the upper side. The dimensions obtained for sporangiophores and sporangia were 245.5 - 545.6 x 10.5 - 19.1  $\mu\text{m}$  and 21.4 - 34.2 x 16.3 - 24.7  $\mu\text{m}$ , respectively. The isolation of the algae from tissue fragments on solid medium was not possible, but only in liquid medium Trebouxia. However, after isolation in liquid medium, was possible cultivation in solid medium, where vegetative and reproductive structures could be visualized, with or without added hormone, depending on the culture medium. Thus it is concluded that: (1) Based on the descriptions symptomatology, combined with the micromorphological characteristics, indicated that the algae found is *Cephaleuros virescens*; (2) The size of the sporangiophore is a safer character to differentiate *C. virescens* x *C. parasiticus*; (3) The germination of reproductive structures is required to give vegetative stem *in vitro* and; (4) The addition of hormone in the culture medium, individually, is not related as promoter of *in vitro* gametogenesis process in *Cephaleuros*.

**Key-words:** *In vitro* physiology, Fruit production, Culture medium, Taxonomy.

## 1 INTRODUÇÃO

As algas parasitas de plantas compreendem um grupo à parte em se tratando de agentes fitopatogênicos. Pouco estudadas no Brasil, estas algas parasitas tem entre suas principais espécies, *Cephaleuros virescens* e *C. parasiticus* (AGRIOS, 2005). O microrganismo *Cephaleuros* sp. é uma alga verde do reino Archaeplastida, filo Chlorophyta, classe Ulvophyceae, ordem Trentepohliales, família Trentepohliaceae, que parasita diversas plantas hospedeiras causando a doença conhecida como mancha de algas, a qual ocorre em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, entre as latitudes 32° Norte e 32° Sul (SUTO e OHTANI, 2009; MALAGI et al., 2011), desde que a temperatura e a umidade sejam adequadas para o seu crescimento e reprodução (NELSON, 2008).

Algumas das plantas economicamente mais importantes atacadas por algas verdes são o abacate, chá, café, cacau, pimenta, citros, caju e manga (AGRIOS, 2005; KIMATI et al., 2005). Nas culturas atacadas, o patógeno é mais frequente em condições de temperatura e umidade elevadas, ocorrendo principalmente nas folhas mais sombreadas da planta (PONMURUGAN et al., 2010). As manchas circulares de coloração alaranjada e textura semelhante a feltro, com o tempo, tendem a se expandir, apresentando superfície lisa e de coloração pardo-acinzentada, ocupando um grande volume foliar (PONMURUGAN et al., 2009; HAN et al., 2011). Como consequência do grande volume foliar ocupado, os danos causados são advindos da redução da área fotossintética das folhas (PONMURUGAN et al., 2007; MALAGI et al., 2011).

Em estudos sobre as características morfológicas de *Cephaleuros*, é comumente estimado o número de esporângios por esporângióforo, o comprimento e largura do esporângio, se os esporângióforos estão solitários ou em forma de tufo e, o comprimento e largura dos esporângióforos (HAN et al., 2011; MALAGI et al., 2011). Como nem todos os caracteres morfológicos são completamente avaliados em cada estudo publicado, este trabalho pretende padronizar quais são os caracteres distintivos.

Outro aspecto relevante é a falha frequente na obtenção de um bom rendimento nos cultivos de algas parasitas de plantas em meio de cultura, o que pode ser devido a um conhecimento limitado das necessidades nutricionais desse organismo, visto que meios contendo carbono e nitrato são os mais apropriados para o crescimento das algas (PONMURUGAN et al., 2010). Malagi et al. (2011), por exemplo, não obtiveram sucesso na multiplicação da alga em meio de cultura Batata-Sacarose-Ágar (BSA). No entanto, Ponnurugan et al. (2010) ao testarem diversos tipos de meios obtiveram bons resultados com os meios sintéticos Trebouxia e Bristol, e com um meio de cultura natural feito a partir do extrato da folha da planta hospedeira. Segundo Suto e Ohtani (2011), as colônias de cinco

espécies do gênero *Cephaleuros* avaliadas apresentaram uma aparência suave e em forma de flocos, com filamentos aéreos de coloração amarelo claro em meio Básico de Bold modificado (MBB) e filamentos aéreos verde amarelados em meio CA (ICHIMURA e WATANABE, 1974), enquanto que o crescimento filamentoso foi fino e solto em MBB e grosso e compacto em meio CA. Outra dificuldade encontrada por alguns autores foi a obtenção de esporângios, os quais dificilmente são encontrados em formas de cultivo *in vitro* (SUTO e OHTANI, 2011).

Assim, este trabalho teve como objetivos: (1) realizar a caracterização micromorfológica do agente causal da mancha de algas em mangueira, (2) realizar o isolamento e caracterização cultural de crescimento das colônias e da fisiologia *in vitro* do patógeno em diversos meios de cultura e (3) realizar a caracterização micromorfológica de células do talo vegetativo e estudo da gênese das estruturas reprodutivas do microrganismo sob condições de cultivo *in vitro* com e sem adição de hormônios.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização micromorfológica do agente causal da mancha de algas em mangueira**

Para caracterização micromorfológica, foi realizada coleta de folhas de mangueira infectadas pela mancha de alga em árvores cv. Alfa Embrapa de um pomar localizado dentro do campus da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Ipameri, Goiás, Brasil (latitude 17°41'S, longitude 48°11'N, altitude 800 m). A mancha de algas ocorreu de forma natural no pomar. Em seguida, as folhas foram submetidas a condição de câmara úmida, utilizando caixas acrílicas transparentes do tipo gerbox (11 x 11 cm), contendo uma folha de papel mata-borrão, previamente umedecida com água destilada esterilizada (ADE) a 2,5 vezes seu peso. A condição úmida foi mantida por 5 dias até as lesões ficarem maiores em tamanho e salientes. Em seguida, foram feitas lâminas microscópicas usando ADE como meio de montagem pela remoção das estruturas do organismo com auxílio de agulha de platina e raspagem das lesões. As imagens das estruturas micromorfológicas foram geradas em microscópio de luz Leica DM500, com câmera digital ICC50 acoplada. As medições das estruturas foram realizadas com auxílio do programa LAS EZ 2.0, obtendo-se a média de 40 medições para cada estrutura.

## 2.2 Isolamento do agente causal da mancha de algas em meio agarizado a partir de tecido lesionado

Após coleta de folhas apresentando sintomas de mancha de algas, estas foram examinadas em estéreo microscópio para caracterização da sintomatologia. Em seguida, pequenos fragmentos (5 x 5 mm), englobando a área de transição entre o tecido sadio e tecido lesionado, foram retirados e, em seguida, desinfetados em uma série como a seguir: álcool 70% (30 s), hipoclorito de sódio 1% (30 s) e ADE (3 x 60 s). Os fragmentos de tecido vegetal desinfetados e não desinfetados foram semeados em placas de Petri (1 fragmento placa<sup>-1</sup>) contendo os meios de cultura: (a) Batata Dextrose Ágar (BDA; contendo g L<sup>-1</sup>: batata 200 g, dextrose 20 g, ágar 20 g), (b) Batata Sacarose Ágar (BSA; contendo g L<sup>-1</sup>: batata 200 g, sacarose 20 g, ágar 20 g), (c) meio Básico de Bold [MBB; contendo g L<sup>-1</sup>: (1) 25 g NaNO<sub>3</sub>, (2) 2,5 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, (3) 7,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (4) 7,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (5) 17,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (6) 2,5 g NaCl, (7) 50,0 g EDTA, (8) 31,0 g KOH, (9) 4,98 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (10) 11,42 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, (11) 1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (12) solução de micronutrientes contendo g L<sup>-1</sup>: 8,82 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,44 g MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,71 g MoO<sub>3</sub>, 1,57 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,49 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; preparado com 10 mL das soluções 1-6, 940 mL de água destilada, 1 mL das soluções 7-12 e 22g de ágar], (d) meio extrato da folha do hospedeiro agarizado (EFH; contendo: 1 L de filtrado a partir de 100 g de folhas sadias trituradas de mangueira, 20 g sacarose e 20 g ágar), (e) Bristol (contendo g L<sup>-1</sup>: 0,097 g FeCl<sub>2</sub>, 0,004 g MnCl<sub>2</sub>, 0,005 g ZnCl<sub>2</sub>, 0,002 g CaCl<sub>2</sub> e 0,004 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> e 20 g ágar) e, (f) Trebouxia (contendo g L<sup>-1</sup>: 10 g peptona proteose, 20 g glicose, 60 mL solução Bristol (contendo g L<sup>-1</sup>: 0,097 g FeCl<sub>2</sub>, 0,004 g MnCl<sub>2</sub>, 0,005 g ZnCl<sub>2</sub>, 0,002 g CaCl<sub>2</sub> e 0,004 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>). Todos os meios de cultura acima citados foram autoclavados a 121°C por 15 min. Após 7 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 h, foi realizada a avaliação do crescimento conforme escala de notas adaptada de Ponmurugan et al. (2010), apresentada na Tabela 2.

## 2.3 Isolamento do agente causal da mancha de algas em meio líquido a partir de tecido lesionado e subsequente repicagem para meio agarizado

Pequenos fragmentos (5x 5 mm), englobando a área de transição entre o tecido sadio e tecido lesionado, foram retirados e, em seguida, desinfetados conforme item anterior. Em seguida, os fragmentos de tecido vegetal desinfetados e não desinfetados foram transferidos para os meios líquidos: (a) MBB, (b) EFH, (c) Bristol e, (d) Trebouxia. Após serem inoculados para meio líquido (5 fragmentos Erlenmeyer<sup>-1</sup>), estes foram para agitadora a 120 rpm, a 25°C e fotoperíodo de 12 h, durante 3 dias. Em seguida, foi realizada a avaliação do crescimento conforme escala de notas adaptada de Ponmurugan et al. (2010). Após cultivo em meio líquido, fragmentos de micélio da alga foram transferidos do meio Trebouxia líquido

para os meios agarizados: (a) MBB, (b) EFH, (c) Bristol e, (d) Trebouxia. Tal procedimento permitiu obtenção de 2 isolados de *C. virescens*: H-27-01 (obtido em MBB agarizado) e H-27-02 (obtido em Trebouxia agarizado).

#### **2.4 Fisiologia e morfologia *in vitro***

Para avaliar o crescimento *in vitro* de *C. virescens*, discos de ágar, contendo micélio do isolado H-27-01 foram repicados para os meios agarizados: (a) MBB, (b) EFH, (c) Bristol e, (d) Trebouxia, totalizando 10 placas de Petri para cada meio de cultura. Após 4 dias de cultivo a 25°C e fotoperíodo de 12 h, tomaram-se as medidas de diâmetro das colônias, obtendo-se os valores médios de duas medidas diametralmente opostas. Aos 15 dias, filamentos da alga crescida nas placas foram removidos para confecção de lâminas microscópicas usando ADE como meio de montagem, onde foi possível mensurar as células do talo vegetativo principal (40 células) e observação da formação de gametângios e esporângios. Além disso, outras placas foram utilizadas para adição de hormônios como a seguir: (1) 150 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol acético (AIA) e (2) 150 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e, após 15 dias, filamentos da alga crescida nas placas foram removidos para confecção de lâminas microscópicas usando ADE como meio de montagem para observação de gametângios e esporângios (PONMURUGAN et al., 2010).

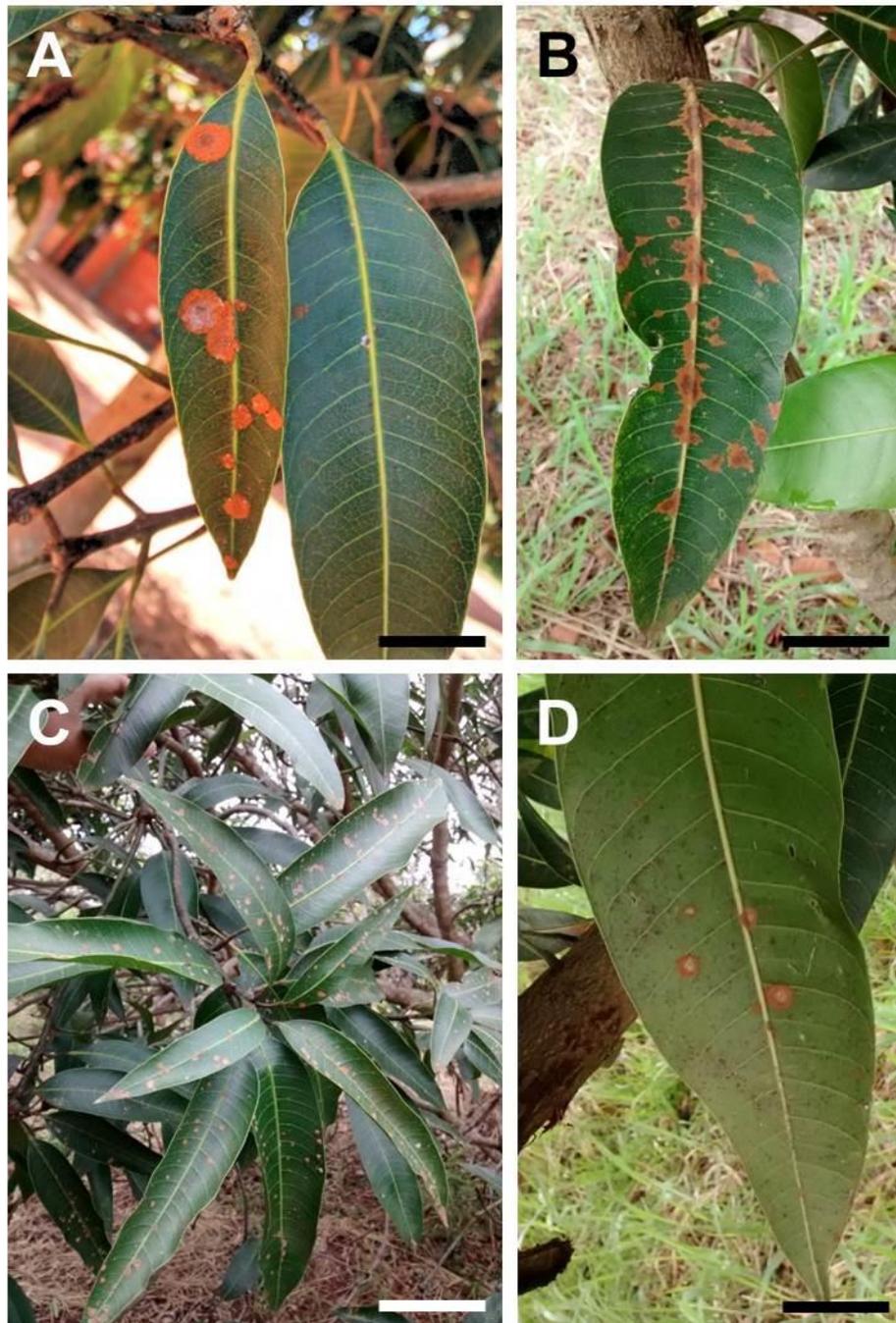
#### **2.5 Análises estatísticas**

Os resultados relativos às medidas das estruturas da alga foram submetidos à análise de variância. Os resultados relativos ao crescimento das colônias em meio agarizado (aos 4 dias) foram submetidos a análise de regressão. Os resultados relativos às medições das células do talo vegetativo (aos 15 dias) foram submetidos ao teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ), com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Caracterização micromorfológica do agente causal da mancha de algas**

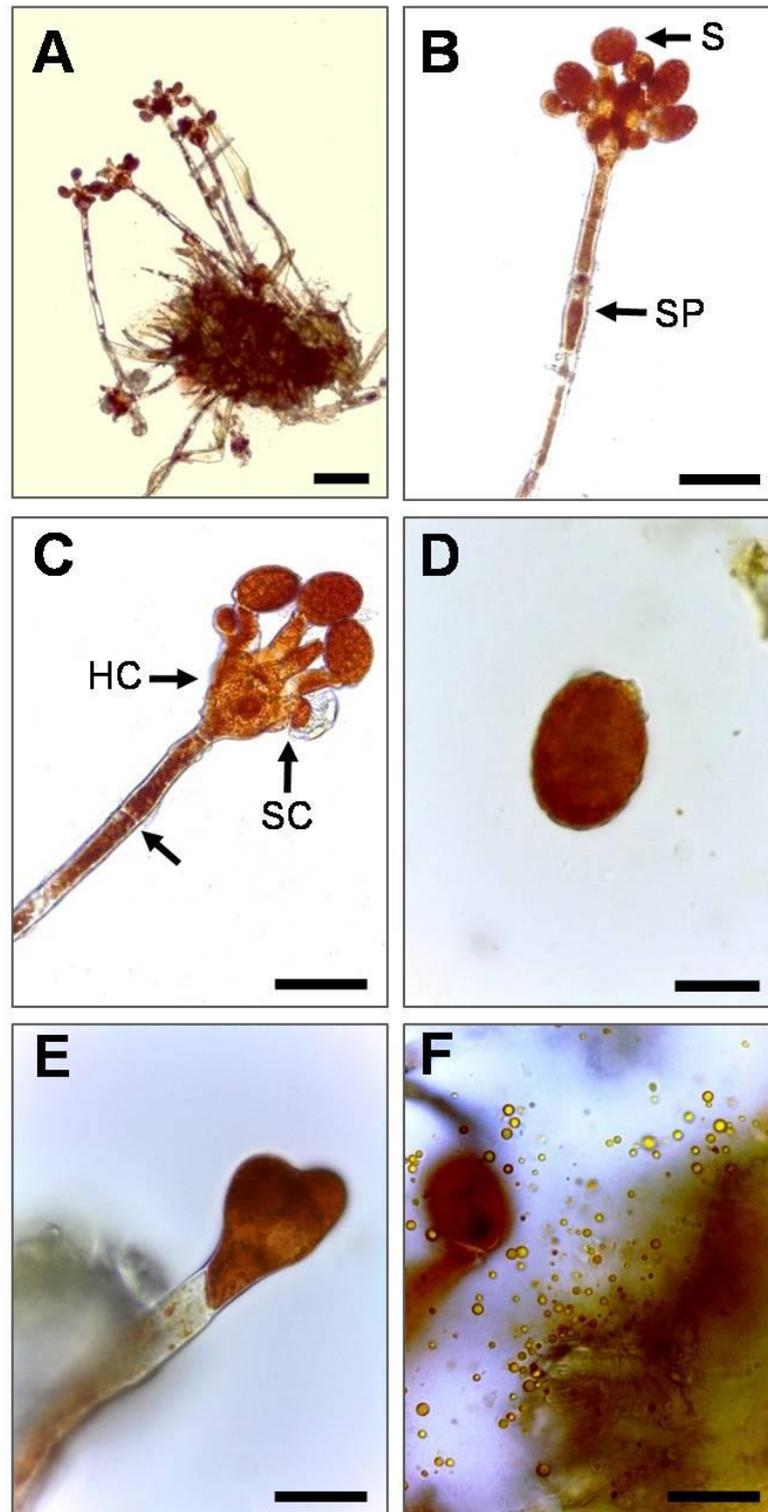
Com relação a sintomatologia, foram observadas nas folhas em plantas no campo, lesões de formato arredondado (Figura 2A) e coalescentes (Figura 2B), de cor laranja, com textura aveludada, espalhadas principalmente na face adaxial, podendo ocorrer raramente na face abaxial (Figura 2D). Folhas lesionadas por *C. virescens* ocorreram principalmente na parte basal das plantas de mangueira, com alta infestação (Figura 2C).



**Figura 2.** Lesões em folhas de mangueira (*Mangifera indica*) causadas por *Cephaleuros virescens* com aspecto saliente e coloração alaranjada. **(A)** Lesões de formato circular; **(B)** Lesões coalescentes; **(C)** Sintomas observados na parte basal da mangueira e; **(D)** Lesões na face abaxial. Barras (A, B, C e D = 1,5; 3,5; 6,5 e 1,5 cm, respectivamente).

Após mensuração das estruturas da alga, verificou-se que os esporangióforos possuíam 245,5 - 545,6 x 10,5 - 19,1  $\mu\text{m}$  (431,5 x 12,9  $\mu\text{m}$ ) (Tabela 1; Figura 3B), enquanto que os esporângios apresentaram 21,4 - 34,2 x 16,3 - 24,7  $\mu\text{m}$  (27,8 x 20,3  $\mu\text{m}$ ) (Tabela 1; Figuras 3B e 3D). O número de septos dos esporangióforos variou de 4 a 9 (Figura 3C), com média de 5,6 septos por esporangióforo. O número total de esporângios gerados por cada

esporangióforo foi de 2 a 7, com 3,9 em média, sendo 2,4 presos e 1,5 desprendidos da célula suspensora (Figura 3C). As células cabeça apresentaram dimensões de 26,3 - 55,5 x 22,2 - 59,0  $\mu\text{m}$  (35,5 - 34,6  $\mu\text{m}$ ) (Figura 3C). A tabela 2 resume as características micromorfológicas obtidas da alga ocorrente em mangueira frente a outros relatos do mesmo gênero em outras culturas de importância econômica.



**Figura 3.** Características micromorfológicas de *Cephaleros virescens*. (A) Esporangióforo ocorrendo em forma de tufo; (B) Esporangióforo solitário (SP: esporangióforo; S: esporângio); (C) Célula cabeça (HC) e célula suspensora (SC) (Seta isolada indica um septo no esporangióforo); (D) Esporângio em maior detalhe; (E) Esporangióforo com início do desenvolvimento dos esporângios e; (F) Zoósporos. Barras (A, B, C, D, E e F = 27,5; 52,12; 56,98; 37,48; 27,93; 26,21  $\mu\text{m}$ , respectivamente).

**Tabela 1.** Características de *Cephaleuros* sp. em diferentes hospedeiros, incluindo *C. virescens* encontrada em mangueira no campus da UEG. Ipameri, GO, Brasil, 2014.

Espécie da alga	Hospedeiro	Esporangióforo ( $\mu\text{m}$ )		Esporângio ( $\mu\text{m}$ )	
		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
<i>Cephaleuros virescens</i> <sup>(1)</sup>	<i>Mangifera indica</i>	245 - 545	10,5 - 19,1	21,4 - 34,2	16,3 - 24,7
<i>Cephaleuros virescens</i> <sup>(2)</sup>	<i>Ficus benghalensis</i>	500 - 1000	12,0 - 25,0	30,0	22,0
<i>Cephaleuros virescens</i> <sup>(3)</sup>	<i>Bixa orellana</i>	130 - 346	13,0 - 19,0	33,0 - 45,0	36,0 - 41,0
<i>Cephaleuros parasiticus</i> <sup>(4)</sup>	<i>Camellia sinensis</i>	880 - 1256	22,5 - 32,2	17,4 - 27,5	17,4 - 20,8

<sup>(1)</sup>*Cephaleuros virescens* encontrado em folhas de mangueira; <sup>(2)</sup>Han et al. (2011); <sup>(3)</sup>Lopez (2005); <sup>(4)</sup>Ponmurugan et al. (2010).

### 3.2 Isolamento do agente causal da mancha de algas em meio agarizado a partir de tecido lesionado

Com relação ao isolamento direto da alga em meio sólido (usando fragmentos de tecido vegetal desinfestado e não desinfestado), nenhum meio de cultura agarizado proporcionou desenvolvimento da alga *Cephaleuros virescens* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Seleção de diferentes meios de cultura sintéticos e naturais para isolamento e cultivo de *Cephaleuros virescens* a partir de folhas de mangueira. Ipameri, Goiás, Brasil, 2014.

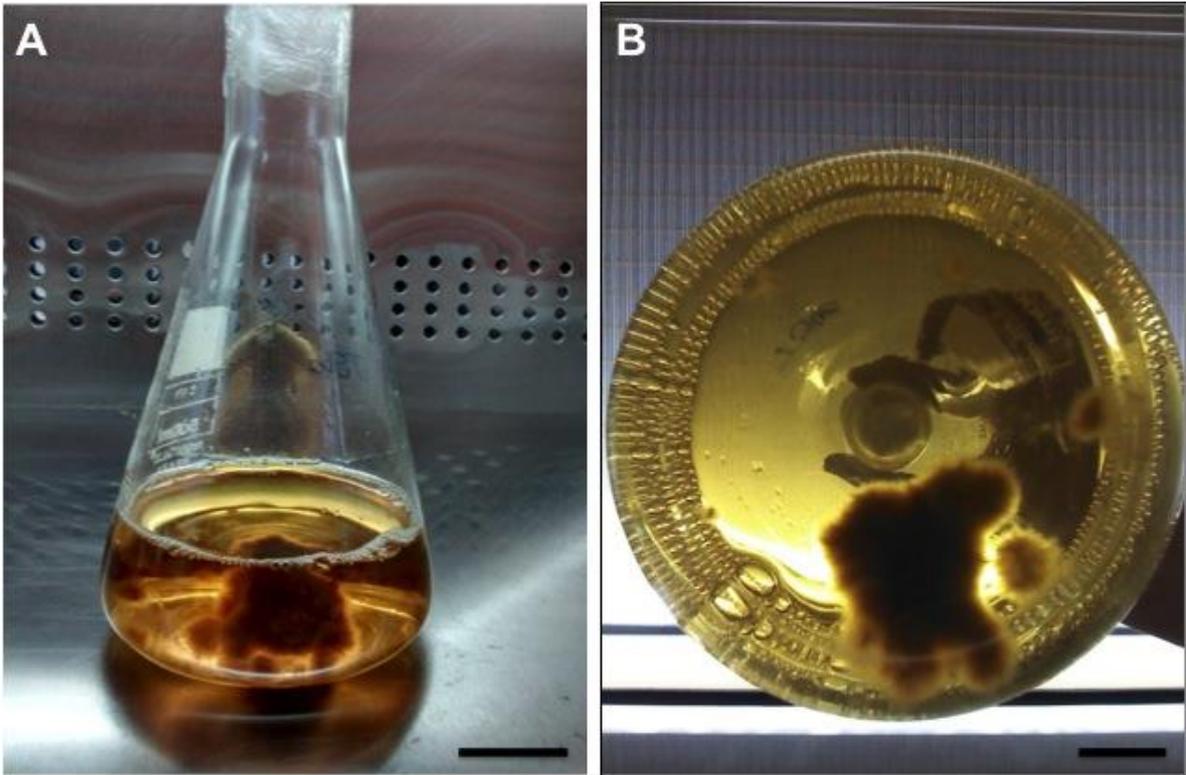
Meios de cultura	Crescimento de <i>Cephaleuros virescens</i> <sup>(1)</sup>				
	Meio agarizado a partir de fragmentos de tecido lesionado <sup>(2)</sup>		Meio líquido a partir de fragmentos de tecido lesionado <sup>(2)</sup>		Meio agarizado a partir de micélio de Trebouxia líquido <sup>(3)</sup>
	(d)	(nd)	(d)	(nd)	(nd)
BDA	0	0	na	na	0
BSA	0	0	na	na	0
MBB	0	0	0	0	4
EFH	0	0	0	0	4
Bristol	0	0	0	0	4
Trebouxia	0	0	2	1	4

<sup>(1)</sup>Escala de notas adaptada de Ponmurugan et al. (2010). **Nota 0:** ausência de crescimento; **Nota 1:** Alga coloniza de 1 até 16% da área superficial (as - meio agarizado) ou volume (v - meio líquido) do meio de cultura (mc); **Nota 2:** Alga coloniza de 16,1 até 33% da as ou v do mc; **Nota 3:** Alga coloniza de 33,1 até 50% da as ou v do mc. **Nota 4:** Alga coloniza mais de 50,1% da as ou v do mc; <sup>(2)</sup>As avaliações nos meios agarizados e líquidos a partir de fragmentos de tecido lesionado foram realizadas aos 7 e 3 dias de cultivo, respectivamente. <sup>(3)</sup>As avaliações nos meios agarizados a partir do meio líquido Trebouxia foram realizadas aos 4 dias de cultivo; <sup>(d)</sup>Fragmentos de tecido vegetal desinfestados; <sup>(nd)</sup>Fragmentos de tecido vegetal não desinfestados; <sup>(na)</sup>Não avaliado.

### 3.3 Isolamento do agente causal da mancha de algas em meio líquido a partir de tecido lesionado e subsequente repicagem para meio agarizado

Dentre os meios líquidos avaliados, os meios MBB, EFH e Bristol não proporcionaram crescimento *in vitro* da alga, tanto para o tecido vegetal desinfestado como o não desinfestado (nota 0). Já o meio líquido Trebouxia permitiu o isolamento da alga, em que utilizando fragmento de tecido vegetal desinfestado e não desinfestado, houve um crescimento da alga que ficou entre 16,1 e 33% (nota 2; Figuras 4A e 4B) e entre 1 e 16% (nota 1) do volume do meio de cultura, respectivamente (Tabela 2).

Após sucesso obtido no cultivo líquido, fragmentos da alga cultivada em Trebouxia (Figuras 4A e 4B) foram transferidos para o meio MBB agarizado até obtenção do isolado H-27-01 purificado. Após purificação, o isolado H-27-01 foi cultivado em meio sólido (EFH, MBB, Bristol e Trebouxia), colonizando mais do que 50% da área superficial da placa de Petri (nota 4; Tabela 2).



**Figura 4.** Crescimento de *Cephaleuros virescens* em meio líquido Trebouxia a partir de fragmentos de tecido vegetal lesionado desinfestado, exibindo nota 2 na escala de avaliação adaptada de Ponmurugan et al. (2010). Barras (A e B = 3,9 e 1,54 cm, respectivamente).

### 3.4 Fisiologia e morfologia *in vitro*

As maiores médias de crescimento micelial ocorreram quando a alga foi cultivada nos meios Trebouxia e MBB (8,2 e 8,0 cm), sendo superior aos demais tratamentos (Tabela 3). O meio Bristol proporcionou crescimento intermediário, de 6,0 cm e, os meios que proporcionaram os menores crescimentos foram EFH e CA (5,5 e 5,3 cm). O crescimento micelial até o 4º dia em placas de Petri foram melhores ajustados por um modelo linear, para todos os meios de cultura, em que os modelos foram significativos e com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) acima de 98% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Crescimento de *Cephaleuros virescens* no 4º dia de avaliação e modelos lineares de regressão. Ipameri, GO, Brasil, 2014.

Meios de cultura	Crescimento ao 4º dia <sup>(1)</sup> (cm)	Modelos	R <sup>2</sup> (%)	(P≤X)
MBB	8,0a	$y = 2,2210x - 0,9900$	99,81	0,01
EFH	5,5c	$y = 1,4201x - 0,0005$	99,50	0,05
Bristol	6,0b	$y = 1,6195x - 0,4450$	99,85	0,01
Trebouxia	8,2a	$y = 2,5015x - 2,1325$	98,05	0,01
Coeficiente de variação (%)		6,71		

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05).

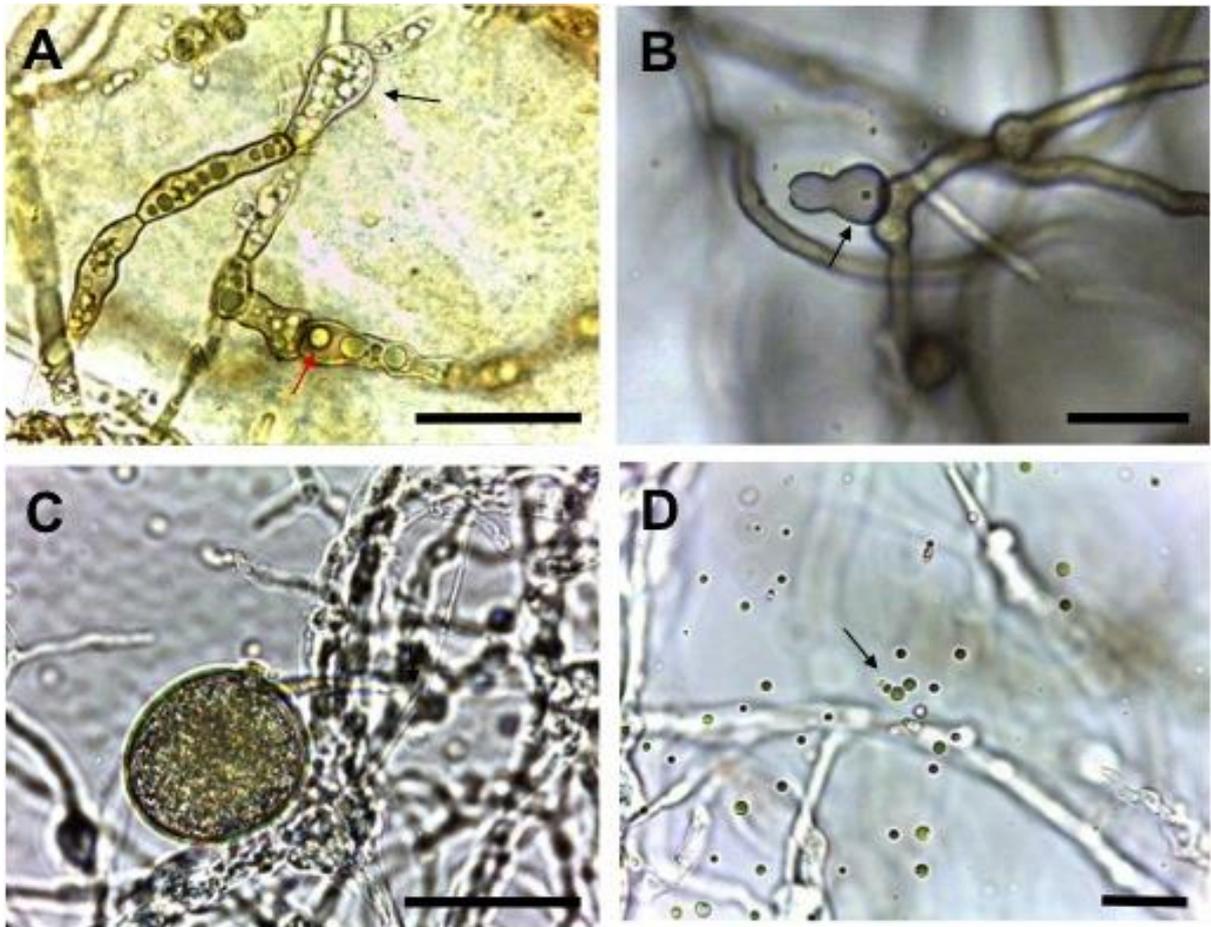
O meio Trebouxia proporcionou a obtenção de células maiores no talo vegetativo principal (comprimento e largura: 69,1 x 6,1 µm) em comparação aos outros meios de cultura (Tabela 4).

**Tabela 4.** Comprimento e largura das células do talo vegetativo principal de *Cephaleuros virescens* cultivado em diferentes meios de cultura. Ipameri, GO, Brasil, 2014.

Meios de cultura	Dimensões das células <sup>(1)</sup>	
	Comprimento (µm)	Largura (µm)
MBB	46,4b	4,8b
EFH	42,6c	4,5b
Bristol	39,1c	4,8b
Trebouxia	69,1a	6,1 <sup>a</sup>
Coeficiente de variação (%)		17,50

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05).

Estruturas vegetativas e reprodutivas puderam ser visualizadas em meio de cultivo *in vitro* com ou sem adição de hormônio, dependendo do meio de cultura. No meio Bristol, sem adição de hormônio, células filamentosas, por vezes, cresceram de forma globosa, em formato elipsoide ou fusiforme (Figura 5A). Tais células, inchadas como se apresentavam, assemelhavam a gametângios e, frequentemente, células filamentosas surgiram a partir delas. Além disso, estruturas arredondadas e diminutas com a presença do pigmento clorofila (seta vermelha, Figura 5A) foram observados nas células filamentosas no meio Bristol. Surpreendentemente, houve formação de gametângio maduro no meio MBB-AIA (Figura 5B). No meio Trebouxia, com ou sem adição de hormônio, não foi verificada a formação de estruturas reprodutivas, apenas vegetativas. O meio EFH-GA3 possibilitou a formação de esporângios maduros (Figura 5C) e zoósporos (Figura 5D).



**Figura 5.** Estruturas reprodutivas e vegetativas de *Cephaleuros virescens* observadas em cultivo *in vitro* em meio agarizado. (A) Gametângios sendo produzidos a partir de células de filamento vegetativo em meio Bristol (seta preta indica estrutura semelhante a um gametângio; seta vermelha indica estruturas arredondadas e diminutas com a presença do pigmento clorofila); (B) Gametângio maduro formado em meio MBB-AIA (Seta indica zoósporo dentro do gametângio antes da liberação no meio); (C) Esporângio produzido em meio EFH-GA3 e; (D) Seta indicando zoósporos em meio EFH-GA3. Barras (A, B, C e D= 36; 20,36; 35,7; 12  $\mu\text{m}$ , respectivamente).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização micromorfológica do agente causal da mancha de algas

Baseando-se nas características micromorfológicas da Tabela 1, verificou-se que as medidas obtidas para o esporangióforo (245,5 - 545,6  $\mu\text{m}$  x 10,5 - 19,1  $\mu\text{m}$ ) de *Cephaleuros* em mangueira foram próximas às obtidas para *C. virescens* em plantas de *Ficus benghalensis* na Coreia, por Han et al. (2011), cujas medidas foram 500 - 1000  $\mu\text{m}$  x 12 - 25  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Embora *C. virescens* e *C. parasiticus* possuam similaridades quanto a forma e coloração, os esporangióforos de *C. parasiticus* apresentam dimensões maiores para comprimento e

largura: 880 - 1256  $\mu\text{m}$  x 22,5 - 32,2  $\mu\text{m}$  (PONMURUGAN et al., 2010), principalmente para largura (13,0 - 19,0  $\mu\text{m}$ ), como observado por Lopez (2005).

Além disso, Suto et al. (2014) afirmaram que as características macroscópicas das manchas nas folhas são claramente diferentes entre *C. virescens* e *C. parasiticus*. No presente estudo foi visto que as lesões ocorreram principalmente na face adaxial (Figuras 2A e 2B) e, raramente, na face abaxial. Os mesmos autores afirmam que em *C. virescens*, o talo vegetativo desenvolve apenas na face adaxial da folha, de onde emergem os esporângios e o talo cresce apenas subcuticularmente e apenas as células epidérmicas e paliçádicas são afetadas. De forma contrária, em *C. parasiticus*, as lesões se desenvolvem no tecido da folha a partir da face adaxial até à face abaxial, sendo visível em ambas as superfícies, nas quais possuem esporangióforos projetados, principalmente, a partir da face abaxial da folha e, raramente, a partir da face adaxial. Ainda, em *C. parasiticus*, o talo vegetativo cresce subepidêrmicamente, onde a necrose das células do hospedeiro é observada em todo o tecido foliar. Como consequência, descrições baseadas na sintomatologia, aliada às características apresentadas na Tabela 1 indicaram, que a alga encontrada em mangueira trata-se de *C. virescens*.

Em concordância com Thompson e Wujek (1997), é importante mencionar que os esporângios de *C. virescens* encontrados em mangueira (21,4 - 34,2  $\mu\text{m}$  x 16,3 - 24,7  $\mu\text{m}$ ) foram maiores do que os esporângios de *C. parasiticus* encontrados em *Camellia sinensis* (17,4 - 27,5 x 17,4 - 20,8  $\mu\text{m}$ ) por Ponmurugan et al. (2010). De qualquer forma, pode-se afirmar que o tamanho do esporangióforo é um caractere mais seguro para diferenciar as duas espécies, uma vez que Suto et al. (2014) tenha afirmado que o tamanho de esporângios são os mesmos para *C. virescens* e *C. parasiticus*.

É importante salientar que nem todos os caracteres micromorfológicos são completamente avaliados em cada estudo publicado, isto é, existe uma falta de padronização dos caracteres que necessitam ser mensurados. Os caracteres mais dimensionados são o comprimento e largura dos esporângios e esporangióforos, ou apenas de um deles, sendo muitas vezes descritas somente as médias obtidas para as medições, enquanto que o mais adequado seria referir-se aos intervalos obtidos para cada estrutura. Outro ponto importante, consiste na variabilidade dos dados, em que, foram obtidos coeficientes de variação de 18,5; 14,2; 11,22 e 7,93% para o comprimento e largura dos esporangióforos e comprimento e largura dos esporângios, respectivamente. Assim, para a caracterização micromorfológica de *Cephaleuros* sp. é necessário mensurar as seguintes estruturas: comprimento e largura dos (1) esporangióforos, (2) esporângios, (3) células cabeça; número de (4) esporângio por esporangióforo, (5) esporângios presos a célula suspensora, (6) esporângios desprendidos da

célula suspensora; (6) número de septos por esporangióforo e; (7) coeficiente de variação para o comprimento e largura dos esporangióforos e esporângios.

#### **4.2 Isolamento do agente causal da mancha de algas em meio agarizado a partir de tecido lesionado**

O isolamento direto a partir de tecido lesionado para os meios agarizados BSA, BDA, MBB e EFH, não permitiu obtenção de sucesso. Uma explicação para este fato pode ser atribuída a não formação do talo vegetativo a partir de outro talo vegetativo, diretamente, a partir de uma lesão foliar em meio de cultura artificial agarizado, pois há necessidade da germinação de estruturas reprodutivas para originar talo vegetativo *in vitro*. Outros autores como Holcomb (1986) e Malagi et al. (2011), tentaram o isolamento da alga em meio BSA, não conseguindo a multiplicação da mesma, sugerindo que *Cephaleuros* sp. trata-se de um organismo sensível quanto a metodologia de isolamento e requerimento nutricional.

#### **4.3 Isolamento do agente causal da mancha de algas em meio líquido a partir de tecido lesionado e subsequente repicagem para meio agarizado**

Apenas em meio líquido foi possível o desenvolvimento *in vitro* da alga. Tal metodologia se mostrou mais adequada porque quando submetido a agitação (120 rpm), ocorre desprendimento de esporângios e zoósporos das lesões para o meio líquido, o que proporcionou o subsequente desenvolvimento de talo vegetativo a partir da germinação destas estruturas reprodutivas.

Dentre os meios líquidos avaliados, o meio Trebouxia foi o único que permitiu o isolamento da alga para posterior repicagem para os outros meios. Tal evento pode ser explicado pelo fato de que o meio Trebouxia fornece nitrogênio por meio da Peptona proteose, que é um nutriente essencial ao crescimento de algas (REN et al., 2013). De forma análoga, Ponmurugan et al. (2010) também isolaram a alga primeiramente em meio líquido para depois repicagem para os meios agarizados e relataram que o meio Trebouxia líquido propiciou um bom desenvolvimento da alga. Os meios BSA e BDA não foram avaliados para isolamento em meio líquido, bem como apresentaram nota 0 no cultivo quando agarizados a partir de micélio proveniente de meio Trebouxia líquido, por conterem em sua composição nutricional apenas açúcar e amido, sendo estes componentes insuficientes para o cultivo *in vitro* de *Cephaleuros* sp.

O cultivo da alga nos meios sólidos MBB, EFH, Bristol e Trebouxia só foi possível após isolamento em meio líquido. As seguintes teorias podem explicar este evento: (1) adaptação gradual da alga em meio de cultivo artificial, primeiramente líquido para depois em

meio sólido, em que o talo vegetativo tenha ficado independente do crescimento sobre uma matriz foliar e (2) obtenção, em abundância, de talo vegetativo, o que pode facilitar a transferência do microrganismo para o cultivo em meio sólido.

#### 4.4 Fisiologia e morfologia *in vitro*

Os meios MBB e Trebouxia foram os meios de cultura que proporcionaram uma taxa de crescimento maior que os demais, pois são os meios mais completos, fornecendo nutrientes essenciais (fósforo, cálcio, magnésio, boro, cobre e zinco) para o desenvolvimento de microalgas (PONMURUGAN et al., 2010). Em estudo recente, Ponmurugan et al. (2010) testaram diversos meios de cultura, sintéticos e naturais, para o crescimento *in vitro* de *C. parasiticus* e, de forma similar, obtiveram crescimento proeminente em meio Trebouxia. Um rápido crescimento micelial é importante, uma vez que reduz os índices de contaminações na cultura pura do microrganismo (SALES CAMPOS e ANDRADE, 2010).

Curiosamente, além de proporcionar maior taxa de crescimento das colônias, o meio Trebouxia permitiu obtenção de maiores dimensões para o comprimento e largura de células do talo vegetativo de *C. virescens*, sugerindo que estes eventos estejam diretamente relacionados. Além disso, tais dados são valiosos para o campo da Ficologia, visto que características culturais (característica de colônias, desenvolvimento de filamentos e morfologia das células do talo vegetativo) em meios agarizados são consideradas úteis para a identificação de espécies de *Cephaleuros* (SUTO e OHTANI, 2011).

Existem poucos estudos relacionados ao uso de hormônios para indução ao crescimento e reprodução de algas. Chowdary (1969) reportaram que esporângios e gametângios foram produzidos em *C. virescens* quando auxinas (ácido indolil-3-acético, indolil-3-butírico e indolil-3-propionico) foram adicionadas ao meio de cultura. Embora a adição de hormônio não tenha feito diferença nos meios Bristol e Trebouxia, foi visto que no meio MBB, o acréscimo de AIA, estimulou a formação de gametângio maduro e de zoósporos. Similarmente, o meio EFH acrescido de GA<sub>3</sub> possibilitou a formação de esporângio e zoósporos. Apenas a adição de hormônio, individualizada, não está relacionada como promotor do processo de gametogênese em *Cephaleuros*, mas a combinação deste com o meio de cultivo ou mesmo meios de cultivo que não necessitam destas substâncias como catalizador para este processo.

Em conformidade com Suto e Ohtani (2011), estruturas diminutas e arredondadas com presença do pigmento clorofila foram encontradas nas células filamentosas do meio Bristol. Além disso, houve a formação de estruturas semelhantes a gametângios formados a partir das células filamentosas. Adicionalmente, Ponmurugan et al. (2010) constatou a presença do

pigmento clorofila e de pigmento semelhante a carotenoide em *C. parasiticus*. Em todos os meios de cultura utilizados o crescimento da alga foi diferente daquele ocorrente na natureza, sendo que os filamentos cresceram de forma livre. Características das colônias foram bastante diferentes daquelas observadas quando a alga cresceu em folhas vivas (JOSE e CHOWDARY, 1977; SUTO e OHTANI, 2009).

## 5 CONCLUSÕES

- 1 - Descrições baseadas na sintomatologia, aliada às características micromorfológicas indicaram, que a alga encontrada em mangueira trata-se de *Cephaleuros virescens*.
- 2 - O tamanho do esporangióforo é um caractere mais seguro para diferenciar *C. virescens* de *C. parasiticus*.
- 3 - Há necessidade da germinação de estruturas reprodutivas para originar talo vegetativo *in vitro*.
- 4 - Apenas a adição de hormônio ao meio de cultivo, individualizada, não está relacionada como promotor do processo de gametogênese *in vitro* em *Cephaleuros*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) por uma bolsa de mestrado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. Oxford, UK: Academic Press Publications, 2005. pp. 719-722.
- CHOWDARY, Y.B.K. Induction of reproductive organs in *Cephaleuros virescens*. **Indian Journal Microbiology**, v.3, p.153-158, 1969.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, p.1039-1042, 2011.
- HAN, K.; PARK, M.; PARK, J.; SHIN, H. First report of algal leaf spot associated with *Cephaleuros virescens* on greenhouse grown *Ficus benghalensis* in Korea. **Australasian Plant Disease Notes**, v.6, p.72-73, 2011.
- HOLCOMB, G.E. Hosts of the parasitic alga *Cephaleuros virescens* in Louisiana and new host records for the continental United States. **Plant Disease**, v.70, n.11, p.1080-1083, 1986.
- ICHIMURA, T.; WATANABE, M. The *Closterium calosporum* complex from the Ryukyu Islands, Variation and taxonomical problems. **Memoirs of the National Science Museum**, v.7, p.89-102, 1974.

JOSE, G.; CHOWDARY, Y.B.K. Karyological studies on *Cephaleuros* Kunze. **Acta Botanica Indica**, v.5, p.114-122, 1977.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. v.2. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663p.

LOPEZ, A.M.Q. Doenças de anonáceas e do urucuzeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. v.2. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663p.

MALAGI, G.; SANTOS, I.; MAZARO, S.M.; GUGINSKI, C.A. Detection of algal leaf spot (*Cephaleuros virescens* Kunze) in Citrus in Paraná State. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.17, n.1, p.148-152, 2011.

NELSON, S.C. *Cephaleuros* Species, the Plant-Parasitic Green Algae. **Plant Disease**, v.43, p.1-6, 2008.

PONMURUGAN, P.; BABY, U.I.; RAJKUMAR, R. Growth, photosynthetic and biochemical responses of tea cultivars infected with various diseases. **Photosynthetica**, v.45, n.1, p.143-146, 2007.

PONMURUGAN, P.; SARAVANAN, D.; RAMYA, M. Culture and biochemical analysis of a tea algal pathogen, *Cephaleuros parasiticus*. **Journal Phycology**, v.46, n.5, p.1017-1023, 2010.

PONMURUGAN, P.; SARAVANAN, D.; RAMYA, M.; SRINIVASAN, T.R.; BABY, U. U.; AJAY, D. Studies on *Cephaleuros parasiticus* Karst, a pathogenic alga causing red rust disease in tea plantations. **Journal of Plantation Crops**, v.37, n.1, p.70-73, 2009.

REN, H.; LIU, B.; MA, C.; ZHAO, L.; REN, N. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p.143, 2013.

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M.C.N. Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao crescimento micelial de uma linhagem de *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.539-543, 2010.

SUTO, Y.; GANESAN, E.K.; WEST, J.A. Comparative observations on *Cephaleuros parasiticus* and *C. virescens* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from India. **Algae**, v.29, n.2, p.121-126, 2014.

SUTO, Y.; OHTANI, S. Morphological features and chromosome numbers in cultures of five *Cephaleuros species* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan. **Phycological Research**, v.59, n.1, p.42-51, 2011.

SUTO, Y.; OHTANI, S. Morphology and taxonomy of five *Cephaleuros species* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan, including three new species. **Phycologia**, v.48, n.4, p.213-236, 2009.

## Capítulo II

**Incidência e severidade de mancha de algas em mangueira cv. 'Amrapali'**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi quantificar a incidência e severidade da mancha de algas ocorrente em plantas de manga cv. 'Amrapali'. O estudo foi desenvolvido durante o mês de setembro de 2014 em área experimental da Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Ipameri, Goiás, Brasil, em plantas com 8 anos de idade. A mancha de algas ocorreu de forma natural no campo. Um total de dez plantas do pomar (5 x 5 m) foram avaliadas ao longo de cinco dias mediante emprego de uma escala descritiva de notas. Foi obtido o coeficiente de variação para incidência e severidade de mancha de algas. Folhas com manchas de formato arredondado, de cor laranja, textura aveludada semelhante a feltro, foram observadas na face adaxial. A partir destas lesões, foram observados esporângios (24,5 - 34,7 x 17,7 - 25 µm), característicos de *Cephaleuros virescens*. A incidência nas plantas foi de 80 - 100% (média de 92,25%) não havendo diferença estatística entre as plantas; enquanto que para a severidade, metade das plantas exibiram de 4,68 a 7,31% de área foliar coberta com sintomas da mancha de algas (afcsma) e a outra metade posicionou-se em uma faixa superior (de 9,37 a 15,06% de afcsma). Assim conclui-se que: (1) de forma oposta a incidência, a severidade possibilita evidenciar plantas em maior grau de ataque do que as demais e; (2) plantas com maior sombreamento apresentam maior severidade.

**Palavras-chave:** Epidemiologia, Sintomatologia, Diagnose de doenças de plantas.

## ABSTRACT

The objective of this study was to quantify the incidence and severity of algal leaf spot occurring in mango plants cv. 'Amrapali'. The study was conducted during the month of September 2014 in the experimental area of the University State of Goiás, Câmpus Ipameri, Goiás, Brazil, in plants with 8 years old. The algal leaf spot occurred naturally in the field. A total of ten plants of the orchard (5 x 5 m) were evaluated over five days by use of a descriptive scale of notes. It was obtained the coefficient of variation for incidence and severity of algal leaf spot. Leaves with round spots, orange, velvety texture like felt, were observed in the upper side. From these lesions, were observed sporangia (24.5 - 34.7 x 17.7 - 25 µm), characteristic of *Cephaleuros virescens*. The incidence on plants was 80-100% (mean 92.25%) with no statistical difference between plants; while for the severity, half of the plants exhibited 4.68 to 7.31% of leaf area covered with symptoms of algal leaf spot (afcsma) and the other half positioned itself in a higher range (of 9.37 a 15.06% of afcsma). Thus it is concluded that: (1) As opposed to the incidence, the severity enables show plants with greater degree of attack than the others and; (2) Plants with higher shading present higher severity.

**Key-words:** Epidemiology, Symptomatology, Diagnosis of plant diseases.

## 1 INTRODUÇÃO

A mancha de algas, causada pelo patógeno *Cephaleuros* sp., ocorre frequentemente em condições de temperatura e umidade elevadas (NELSON, 2008). Mantidas as condições favoráveis, manchas circulares de coloração alaranjada e textura semelhante a feltro, com o tempo, tendem a se expandir, apresentando superfície lisa e de coloração pardo-acinzentada, ocupando um grande volume foliar (PONMURUGAN et al., 2009; HAN et al., 2011). Como consequência do grande volume foliar ocupado, os danos causados são advindos da redução da área fotossintética das folhas (PONMURUGAN et al., 2007; MALAGI et al., 2011). Poucos são os estudos abordando a mancha de algas em frutíferas no Brasil e, além disso, a maioria dos estudos existentes se limitam a etiologia e caracterização do agente causal, não havendo estudos epidemiológicos ou com alguma abordagem em campo.

A quantificação de uma doença por incidência é mais fácil e simples, ao passo que a avaliação da severidade exige a adoção de chaves descritivas, escalas diagramáticas ou a análise de imagens digitalizadas por programas computacionais (BELASQUE JÚNIOR et al., 2005). Incidência refere-se ao percentual de plantas doentes em uma determinada amostra e, severidade refere-se à proporção do volume ou área do tecido vegetal afetado e com sintomas (BOWEN, 2010). Segundo AMORIM e BERGAMIN FILHO (2011), pouco vale conhecer o agente causal, uma vez que não são quantificadas a extensão dos seus danos no hospedeiro. Neste contexto, quantificar as doenças ocorrentes nas culturas é importante quando se pensa na adoção de medidas de manejo integrado e no aumento da produtividade (TAVARES, 2004). O objetivo deste trabalho foi quantificar a incidência e severidade da mancha de algas ocorrente em plantas de mangueira cv. ‘Amrapali’.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido durante o mês de setembro de 2014, em um pomar de mangueiras cv. ‘Amrapali’ localizado em área experimental da Universidade Estadual de Goiás, Campus Ipameri, Goiás, Brasil (latitude 17°41’S, longitude 48°11’N, altitude 800 m), cujas plantas possuíam 8 anos de idade. Folhas exibindo sintomas de manchas de algas foram coletadas e os sintomas analisados e comparados com as descrições da doença segundo QUEZADA-GUTIÉRREZ et al. (2009), bem como as estruturas reprodutivas da alga (esporângios). A mancha de algas ocorreu de forma natural no campo, não sendo assim necessária inoculação. Para avaliação da incidência e severidade da mancha de algas foram utilizadas 10 plantas (espaçadas a 5 x 5 m) do pomar (área total: 500 m<sup>2</sup>), obedecendo a recomendação de TAVARES e COSTA (2002), que preconizam avaliar 10 plantas 5 ha<sup>-1</sup>. Assim, cada planta foi dividida em quatro quadrantes e, em cada quadrante foram escolhidos

dois galhos ao acaso e, em cada galho, cinco folhas ao acaso (40 folhas por planta) (TAVARES e COSTA, 2002). Em seguida, a severidade foi avaliada ao longo de cinco dias (05-09-14 a 10-09-14), mediante o emprego de uma escala descritiva de notas, como a seguir: nota 0 - ausência de manchas da doença na folha; nota 1 - até 10 % da área foliar com sintomas da mancha de algas (afcsma); nota 2 - de 11 a 25 % de afcsma; nota 3 - de 26 a 50% de afcsma; nota 4 - de 51 a 75 % de afcsma; nota 5 - de 76 a 100 % de afcsma. Para as análises estatísticas, foi considerado o ponto médio de cada nota atribuída, o que permitiu expressar os resultados em percentagem de área foliar lesionada. Foi obtido o coeficiente de variação das variáveis incidência e severidade com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011). Todas as plantas foram avaliadas na parte da manhã.

### **3 RESULTADOS**

Após levantamento no campo, as observações foram direcionadas primeiramente para as folhas de mangueira exibindo sintomas de mancha de algas, nas quais verificou-se manchas de formato arredondado, de cor laranja, com textura aveludada semelhante a feltro, espalhadas na face adaxial (Figura 1A). Nas plantas com maior infestação, folhas lesionadas ocorreram principalmente no terço inferior. Desta forma, para observação de esporângios da alga, foram utilizados os materiais coletados no campo, os quais possuíam abundância das estruturas, permitindo que boas lâminas microscópicas fossem feitas, as quais revelaram esporangióforos medindo 245,5 - 545,6 x 10,5 - 19,1  $\mu\text{m}$  e esporângios medindo de 24,5 - 34,7 x 17,7 - 25  $\mu\text{m}$  (Figura 1B).



**Figura 1.** **A)** Folhas de mangueira cv. ‘Amrapali’ exibindo sintomas de mancha de algas; **B)** Esporângio de *Cephaleuros virescens*. (Barras correspondem a 2,9 cm e 23,5  $\mu\text{m}$  para as figuras 1A e 1B, respectivamente).

A incidência nas plantas avaliadas foi de 80 - 100%, com média de 92,25%, sendo que não houve diferença estatística entre as plantas para esta variável. Já para a severidade, metade das plantas exibiram de 4,68 a 7,31% de área foliar coberta com sintomas da mancha de algas (afcsma) e a outra metade das plantas exibiram de 9,37 a 15,06% de afcsma.

#### 4 DISCUSSÃO

Os sintomas da mancha de algas são caracterizados pela formação de lesões circulares, com 1,0 - 7,0 mm (principalmente 3,0 - 4,0 mm) de diâmetro e, 15,0 - 50,0  $\mu\text{m}$  de altura, (SUTO et al., 2014). *Cephaleuros virescens* é um parasita subcuticular, sendo que a necrose das células do hospedeiro é observada apenas nas células epidérmicas e paliádicas da face superior da folha, de onde emergem os esporângios (NELSON, 2008), os quais medem 26,0 - 36,0 x 17,0 - 20,0 (SUTO et al., 2014). Tais características estão em conformidade com a Figura 1A e as medições obtidas no presente trabalho, revelando a importância da sintomatologia, aliada à caracterização micromorfológica do patógeno durante a diagnose da mancha de algas.

Segundo NELSON (2008) e MALAGI et al. (2011), a ocorrência de mancha de algas em mangueira é favorecida por temperaturas altas e elevada umidade relativa do ar. Durante o mês de setembro de 2014, a temperatura no município de Ipameri, apresentou valores

máximos variando de 29 a 42°C, condição que, associada à precipitação de 14,4 mm, ocorrida entre 02-10-14 e 04-10-14, favoreceu o desenvolvimento da doença. Isto ocorre porque períodos chuvosos com temperatura variando de 28 a 32°C, são ideais para que a membrana envoltória dos esporângios rompa-se, facilitando a dispersão dos zoósporos pelo vento e como consequência, estes podem infectar novas folhas, brotos e frutos de plantas (DUARTE et al., 2005).

No presente estudo, foi visto que a quantificação da incidência gerou dados alarmantes com relação a mancha de algas (80 a 100% de incidência). Segundo VALE et al., 2004 a incidência é mais adequada a doenças do sistema radicular, viroses sistêmicas e doenças que geram dano direto ao produto final, pois para a maioria das doenças foliares a relação entre severidade e incidência é menos evidente. Além disso, AMORIM e BERGAMIN FILHO (2011) explicam que quando a epidemia está em sua fase inicial, a incidência é um parâmetro satisfatório para avaliar a maioria das doenças já que, nesta fase, ela pode ser correlacionada com a severidade. No entanto, em fases mais avançadas da epidemia, como é o caso do presente estudo, a incidência não pode ser utilizada independentemente da severidade pois a incidência não discerne com clareza a intensidade da doença. Embora a severidade seja uma variável mais difícil de ser obtida, principalmente no caso de escalas descritivas de doença, apresenta melhor ajuste em estudos de eficiência de controle, condições favoráveis a epidemias e em estudos de danos (VALE et al., 2004; NUTTER et al., 2006).

A variável severidade (coeficiente de variação = 39,43%) apresentou uma amplitude maior do que a incidência (coeficiente de variação = 12,82%), o que possibilitou a discriminação das plantas em dois grupos. As plantas do grupo com menor severidade (4,68 a 7,31% de afcsma) foram aquelas menos sombreadas em seu interior, ao passo que aquelas pertencentes ao grupo com maior severidade (de 9,37 a 15,06% de afcsma) possuíam as folhas de seu interior mais sombreadas. Assim, de forma oposta a incidência, a severidade possibilitou evidenciar plantas em maior grau de ataque do que as demais.

Segundo RIVERO e CASTELLANO (2004), com o avanço de uma epidemia de mancha de algas, os prejuízos já são evidentes com 10% da área foliar lesionada pelo patógeno, sendo que com 50% há uma perda na produção de 28%, no caso de lima persa. De acordo com os mesmos, é necessário o controle de *C. virescens* no início do seu estabelecimento na cultura atacada. De forma análoga, o presente estudo confirmou ocorrência de plantas com a doença em estágio mais avançado, as quais se posicionaram em uma faixa semelhante (de 9,37 a 15,06% de afcsma).

O Programa da Produção Integrada de Frutas (PIF) estabelece que para doenças que acometem a parte aérea, o nível de ação ocorre quando a incidência na área monitorada for

maior ou igual a 10% de folhas com sintomas, estando a planta sem flores (TAVARES e COSTA, 2002). A incidência da mancha de algas no pomar do presente estudo foi alta, no entanto esta doença ainda não está inserida no PIF.

## 5 CONCLUSÕES

1 - De forma oposta a incidência, a severidade possibilita evidenciar plantas em maior grau de ataque do que as demais.

2 – Plantas com maior sombreamento apresentam maior severidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Fenologia, Patometria e Quantificação de dados. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 4. ed., pp.517-540, 2005.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; RIBEIRO, L.M.; JESUS JUNIOR, W.C.; AMORIM, L. Escalas Diagramáticas para Avaliação da Severidade do Cancro Cítrico. **Fitopatologia brasileira**, v.30, n.4, p.387-393, 2005.

BOWEN, K.L. Epidemiologia de doenças de plantas. In: TRIGIANO, R.N.; WIDHAM, M.T.; WIDHAM, A.S. (Eds.). **Fitopatologia: Conceitos e Exercícios de Laboratório**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, pp.393-409.

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Doenças da pimenta-do-reino. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 4. ed., p.515, 2005.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, p.1039-1042, 2011.

HAN, K.; PARK, M.; PARK, J.; SHIN, H. First report of algal leaf spot associated with *Cephaleuros virescens* on greenhouse grown *Ficus benghalensis* in Korea. **Australasian Plant Disease Notes**, v.6, p.72-73, 2011.

MALAGI, G.; SANTOS, I.; MAZARO, S.M.; GUGINSKI, C.A. Detection of algal leaf spot (*Cephaleuros virescens* Kunze) in Citrus in Paraná State. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.17, n.1, p.148-152, 2011.

NELSON, S.C. *Cephaleuros* Species, the Plant-Parasitic Green Algae. **Plant Disease**, v.43, p.1-6, 2008.

NUTTER, F.W.; ESKER, P.D.; COELHO NETTO, R.A. **Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data**. Plant disease epidemiology: facing challenges of the 21st Century. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p.95–103.

PONMURUGAN, P.; BABY, U.I.; RAJKUMAR, R. Growth, photosynthetic and biochemical responses of tea cultivars infected with various diseases. **Photosynthetica**, v.45, n.1, p.143-146, 2007.

PONMURUGAN, P.; SARAVANAN, D.; RAMYA, M.; SRINIVASAN, T. R.; BABY, U. U.; AJAY, D. Studies on *Cephaleuros parasiticus* Karst, a pathogenic alga causing red rust disease in tea plantations. **Journal of Plantation Crops**, v.37, n.1, p.70-73, 2009.

QUEZADA-GUTIÉRREZ, M.D.C.; DÍAZ-CELAYA, M.; DEL ROSARIO, M.; CIPRIANO, G.; RODRÍGUEZ-ALVARADO, G.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S.P. Mancha algal en guayabo (*Psidium guajava* L.) y mango (*Mangifera indica* L.) ocasionada por *Cephaleuros virescens* en Michoacán, México. **Biológicas**, n.11, p.87-92, 2009.

RIVERO, T.; CASTELLANOS, L. Estudio de la nocividad del alga *Cephaleuros virescens* Kunze. **Fitosanidad**, v.8, n.2, p.41-43, 2004.

SUTO, Y.; GANESAN, E.K.; WEST, J.A. Comparative observations on *Cephaleuros parasiticus* and *C. virescens* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from India. **Algae**, v.29, n.2, p.121-126, 2014.

TAVARES, S.C.C.H. **Manejo integrado de doenças**. Sistemas de Produção, 2: Embrapa Semi-Árido, 2004. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/doencas.htm>> Acesso em: 20 de janeiro de 2014.

TAVARES, S.C.C.H.; COSTA, V.S.O.C. **Metodologia de Amostragem e nível de ação para as principais doenças da mangueira no Vale do São Francisco**. Circular técnica, Petrolina: Embrapa, p.1-15, 2002.

VALE, F.X.R.; JESUS JUNIOR, W.C.; LIBERATO, J.R.; SOUZA, C.A. **Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro**. In: Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas. Belo Horizonte: Perfil, 2004. p.91-121.

## CONCLUSÕES GERAIS

A mancha de algas causada pelo patógeno *Cephaleuros virescens* foi encontrada em folhas de mangueira e posteriormente analisada em microscópio de luz, para então ser caracterizada morfológicamente e conhecimento de sua fisiologia. O estudo de campo realizado possibilitou estimar sua incidência e severidade. A seguir, são apresentadas as conclusões gerais para todas as componentes exploradas no decorrer destes estudos:

- 1 - Descrições baseadas na sintomatologia, aliada às características micromorfológicas indicaram, que a alga encontrada em mangueira trata-se de *Cephaleuros virescens*.
- 2 - O tamanho do esporangióforo é um caractere mais seguro para diferenciar *C. virescens* de *C. parasiticus*.
- 3 - Há necessidade da germinação de estruturas reprodutivas para originar talo vegetativo *in vitro*.
- 4 - Apenas a adição de hormônio ao meio de cultivo, individualizada, não está relacionada como promotor do processo de gametogênese *in vitro* em *Cephaleuros*.
- 5 - De forma oposta a incidência, a severidade possibilita evidenciar plantas em maior grau de ataque do que as demais.
- 6 - Plantas com maior sombreamento apresentam maior severidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. Oxford, UK: Academic Press Publications, 2005. pp. 719-722.
- AKIYAMA, M. On some brazilian species of Trentepohliaceae. **Natural Science**, Japão, v.5, p.81-95, 1971.
- ALENCAR; T.S.M.; GARCIA, K.G.V.; SILVA, R.M.; SILVA, C.P.; AGUIAR, A.V.M. Positions of sowing and physical treatment on seed germination and growth of rootstocks of mango tree 'Espada'. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.8, n.2, p.16-21, 2012.
- ANUÁRIO Brasileiro de Fruticultura. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 136 p., 2013.
- BATISTA, A.C.; LIMA, D.A. Host list of the alga, *Cephaleuros mycoidea* Karsten, in Pernambuco. **Indus. e Com. B.**, v.16, p.32-46, 1949.
- BROOKS, F.E. Plant-Parasitic Algae (Chlorophyta: Trentepohliales) in American Samoa. **Pacific Science**, v.58, n.3, p.419-428, 2004.
- BUSTAMANTE, P.M.A.C. A fruticultura no Brasil e no Vale São Francisco: Vantagens e Desafios. **Revista Econômica do Nordeste**, v.40, n.1, p.153-171, 2009.
- CARVALHO, D.D.C.; ALVES, E.; BATISTA, T.R.S.; CAMARGOS, R.B.; LOPES, E. A.G.L. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.792-798, 2008.
- CHAPMAN, R.L.; WATERS, D.A. Lichenization of the Trentepohliales. In: SECKBACH, J. (ed.). **Symbiosis**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002. pp. 359-371.
- FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungal-databases/>> Acesso em 18 de novembro de 2014.
- HAN, K.; PARK, M.; PARK, J.; SHIN, H. First report of algal leaf spot associated with *Cephaleuros virescens* on greenhouse grown *Ficus benghalensis* in Korea. **Australasian Plant Disease Notes**, v.6, p.72-73, 2011.
- INSTITUTO Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes. Produção Agrícola Municipal, Rio de Janeiro, v.39, p.1-101, 2012.
- LIMA, C.S.; PFENNING, L.H.; COSTA, S.S.; ABREU, L.M.; LESLIE, J.F. *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, v.104, n.6, p.1408-1419, 2012.
- LIMA, C.S.; PFENNING, L.H.; COSTA, S.S.; CAMPOS, M.A.; LESLIE, J.F. A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil. **Plant Pathology**, v.58, n.1, p.33-42, 2009.
- LIMA, L.C.; DIAS, M.S.C.; CASTRO, M.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; SILVA, E.B. Control of anthracnose and quality of mangoes (*Mangifera indica* L.) cv. Haden, after

hydrothermic treatment and storage under refrigeratio and in modified atmosphere. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.298-304, 2007.

LÓPEZ-BAUTISTA, J.M.; CHAPMAN, R.L. Phylogenetic affinities of the Trentepohliales inferred from small-subunit rDNA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, n.6, p.2099-2106, 2003.

LÓPEZ-BAUTISTA, J.M.; RINDI, F.; GUIRY, M.D. Molecular systematics of the subaerial green algal order Trentepohliales: an assessment based on morphological and molecular data. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, n.7, p.1709-1715, 2006.

LÓPEZ-BAUTISTA, J.M.; WATERS, D.A.; CHAPMAN, R.L. Constancea 83.1:**The Trentepohliales Revisited**. University of California, Berkeley, 2002. Disponível em: <[http://ucjeps.berkeley.edu/constancea/83/lopez\\_etal/trentepohliales.html](http://ucjeps.berkeley.edu/constancea/83/lopez_etal/trentepohliales.html)>. Acesso em: 20 de novembro de 2014.

MALAGI, G.; SANTOS, I.; MAZARO, S.M.; GUGINSKI, C.A. Detection of algal leaf spot (*Cephaleuros virescens* Kunze) in Citrus in Paraná State. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.17, n.1, p.148-152, 2011.

QUEZADA-GUTIÉRREZ, M.D.C.; DÍAZ-CELAYA, M.; DEL ROSARIO, M.; CIPRIANO, G.; RODRÍGUEZ-ALVARADO, G.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S.P. Mancha algal en guayabo (*Psidium guajava* L.) y mango (*Mangifera indica* L.) ocasionada por *Cephaleuros virescens* en Michoacán, México. **Biológicas**, n.11, p.87-92, 2009.

RAMYA, M.; PONMURUGAN, P.; SARAVANAN, D. Management of *Cephaleuros parasiticus* Karst (Trentepohliales: Trentepohliaceae), an algal pathogen of tea plant, *Camellia sinsensis* (L) (O. Kuntze). **Crop Protection**, v.44, p.66-74, 2013.

SALES JÚNIOR, R.; COSTA, F.M.; MARINHO, R.E.M.; NUNES, G.H.S.; AMARO FILHO, J.; MIRANDA, V.S. The use of azoxystrobin in the control of mango anthracnosis. **Fitopatologia brasileira**, v.29, n.2, p.193-196, 2004.

SUTO, Y.; GANESAN, E.K.; WEST, J.A. Comparative observations on *Cephaleuros parasiticus* and *C. virescens* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from India. **Algae**, v.29, n.2, p.121-126, 2014.

SUTO, Y.; OHTANI, S. Morphological features and chromosome numbers in cultures of five *Cephaleuros species* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan. **Phycological Research**, v.59, n.1, p.42-51, 2011.

SUTO, Y.; OHTANI, S. Morphology and taxonomy of five *Cephaleuros species* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) from Japan, including three new species. **Phycologia**, v.48, n.4, p.213-236, 2009.