

FITOPATOLOGIA

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DOENÇAS CAUSADAS POR *PHYTOPHTHORA* EM CITROS

AMAURI SIVIERO¹, EDSON L. FURTADO¹ e MARCOS A. MACHADO²

RESUMO

O estudo das doenças provocadas por *Phytophthora* em citros depende de fatores como crescimento vigoroso das plantas, patógeno ativo, condições ambientais favoráveis e métodos de inoculação e avaliação utilizados. Neste trabalho estão descritos os principais métodos de inoculação e avaliação de doenças provocadas por *Phytophthora* em citros, desde a fase de plantas jovens até plantas adultas em campo. Especial atenção é dada aos métodos de inoculação de plantas jovens para avaliação de gomose e podridão de radículas.

Termos de indexação: gomose, resistência, podridão de radículas.

SUMMARY

INOCULATION AND EVALUATION METHODS FOR THE *PHYTOPHTHORA* - INDUCED DISEASES OF CITRUS

Studies on *Phytophthora*-induced diseases of citrus depend upon several factors as the use of healthy and vigorous test plants, the activity of the pathogen, environmental conditions which favor the optimum disease development

¹ Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, Caixa Postal 237, 18603-970 Botucatu (SP).

² Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Caixa Postal 04, 13490-970 Cordeirópolis (SP).

ARTIGO DE REVISÃO

and expression and the availability of good inoculation and evaluation methods. In this work, it is described inoculation and evaluation methods that are used to study these diseases both in seedlings and in mature trees in orchards, with special emphasis on those that are used to study of *Phytophthora* gummosis and root rot of young plants.

Index terms: citrus gummosis, resistance, root rot

1. INTRODUÇÃO

Entre as principais doenças do complexo *Phytophthora*-citros, destacam-se a gomose (podridão do pé, das raízes e do colo e gomose do tronco) e a podridão de radículas.

Phytophthora spp. são patógenos do solo e agentes causais de importantes doenças em centenas de hospedeiros em todo o mundo. Em viveiros, eles atacam as radículas, as raízes e o colo das plântulas, causando-lhes tombamento e mela; também infectam folhas e ponteiros, principalmente, em viveiros e em telados sem proteção contra a chuva. No campo e em pós-colheita, infectam também frutos.

A gomose de *Phytophthora*, uma das mais antigas doenças dos citros, ocorre no Brasil há mais de cem anos (AVERNA-SACCÁ, 1917). As espécies *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* são as principais causadoras da doença. *P. parasitica* ataca mais de 400 hospedeiros e *P. citrophthora*, mais de 80 (ERWIN & RIBEIRO, 1996).

No Brasil, *P. parasitica* ocorre em mais de 90% dos casos de viveiros e pomares de citros atingidos pela doença. Os principais sintomas da gomose no campo são os seguintes: escurecimento e morte da casca e do lenho, exsudação de goma, seca e fendilhamento da casca, podridão do pé e das raízes, amarelecimento e queda de folhas, baixo desenvolvimento, murcha, queda de folhas e morte da planta. Nos pomares, sintomas parecidos com os de gomose causada por *Phytophthora* podem ser confundidos com os provocados por outros patógenos, insetos e ferimentos químicos ou físicos, gerando confusão e diagnósticos incorretos (FEICHTENBERGER, 2001).

A podridão de radículas dos citros, comum em viveiros, pomares novos e adultos, é causada, sobretudo, por *P. parasitica* e *P. citrophthora*. Os sintomas típicos da doença são estes: podridão de radículas e de raízes finas, exsudação de goma, escurecimento e morte de raízes nutritoras, redução de radículas de plantas, amarelecimento, seca e morte de mudas. A podridão de radículas em relação à gomose é uma doença de importância relativa no Brasil em vista de fatores relacionados ao clima, manejo da irrigação, tipo de solo, matéria orgânica e cultivar de porta-enxerto (FEICHTENBERGER, 2001).

A avaliação de moléstias pode ser feita no campo ou em condições controladas, adotando-se diversos métodos. Os objetivos de tal avaliação relacionam-se aos trabalhos de epidemiologia, controle químico, cultural, biológico e seleção de genótipos, etapa importante em programas de melhoramento.

Métodos de inoculação artificial devem ser práticos, seguros e estáveis e correlacionar com as infecções naturais no campo. Métodos de avaliação de doenças devem ser voltados prioritariamente a plantas jovens a fim de contribuir para agilizar o processo de seleção de material. O objetivo deste trabalho é apresentar os principais métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de citros a *Phytophthora* spp.

2. PRODUÇÃO DE INÓCULO

O fator mais importante na produção de inóculo de *Phytophthora* relaciona-se ao tipo de propágulo: micélio (conjunto de hifas), clamidósporos (estrutura vegetativa de sobrevivência), esporângios (estruturas reprodutivas assexuais) ou zoósporos (esporos assexuais móveis formados no interior dos esporângios).

A produção de micélio pode ser feita em laboratório em placas de Petri contendo meio de cultura como o cenoura-ágar (CA: 50-250 g de cenoura, 10-20 g de ágar/L de água) ou batata-dextrose-ágar (BDA: 200 g de batata, 20 g de glicose, 15 g de ágar/L de água). O patógeno é repicado para o meio e as placas, mantidas no escuro por cinco a sete dias, a 25°C. A próxima etapa é a separação mecânica do micélio do meio e a padronização da concentração do inóculo.

A produção de clamidósporos de *P. parasitica* em laboratório é realizada pelo empobrecimento nutricional do meio (GRAHAM & TIMMER, 1992; MITCHELL & KANNWISCHER-MITCHELL, 1993), como, por exemplo, a substituição do meio rico em nutrientes por água esterilizada e incubação em placas mantidas por três a cinco dias no escuro (TSAO, 1971; GRAHAM, 1990).

A produção de esporângios e zoósporos é realizada mediante estresse nutricional (MITCHELL & KANNWISCHER-MITCHELL, 1993). O patógeno é transferido do meio de cultura para água destilada estéril, estimulando, assim, a formação de estruturas de reprodução, principalmente, esporângios (MITCHELL & KANNWISCHER-MITCHELL, 1993). Uma alternativa é semear discos de meio de cultura infestado pelo patógeno em placas de Petri contendo meio de cultura ou substrato, mantendo-os em seguida a 25°C, por cinco a sete dias, em regime de luz fluorescente. Após esse período, as placas são submetidas ao resfriamento de 4 a 8°C, por 15-120 minutos, para promover a indução da clivagem citoplasmática do esporângio e subsequente liberação dos zoósporos, após o retorno à temperatura ambiente (HENDERSON et al., 1986; MITCHELL & KANNWISCHER-MITCHELL, 1993; MATHERON et al., 1998). A suspensão de inóculo, independentemente da estrutura do patógeno, pode ser quantificada com auxílio de hemacitômetro ou por espectrofotometria (MITCHELL & KANNWISCHER-MITCHELL, 1993).

3. MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO

A avaliação de doenças pode ser realizada em plantas com infecções naturais ou naquelas inoculadas experimentalmente em campo ou em ambiente controlado. Em condições naturais de infecção, há o risco de a resistência ser superestimada em razão do fenômeno do “escape”, ou seja, a planta, embora suscetível, encontra-se em local onde o patógeno está inativo ou ausente: sua presença no solo não significa que ele esteja associado às plantas cítricas, causando doença.

Os principais fatores relacionados ao processo ideal para avaliação são: planta sadia e bem nutrida e mostrando seu potencial genético, atividade do patógeno, potencial de inóculo ajustado, método de inoculação

adequada e ambiente controlado visando proporcionar condições ideais para estabelecimento e desenvolvimento da doença.

A princípio, qualquer parte da planta pode ser infectada e avaliada para resistência ao patógeno (FAWCETT, 1923). A escolha do seu órgão a ser inoculado e avaliado deve levar em consideração o tipo da doença, ou seja, se é foliar, um método de inoculação usando as folhas da planta deve ser empregado.

3.1. Necroses foliares e de ponteiros causadas por *Phytophthora*

A necrose das folhas e de ponteiros de plantas jovens pode ser quantificada por incidência ou severidade. A inoculação pode ser feita via pulverização de suspensão contendo estruturas do patógeno, como micélio, clamidósporos, zoósporos ou suas misturas. Pequenos ferimentos são necessários na área de inoculação para facilitar a penetração do patógeno. As plantas devem ser mantidas em ambiente úmido (umidade relativa do ar > 80%) e temperatura por volta de 25°C. O momento ideal para avaliação da doença dá-se com o aparecimento dos sintomas, em torno de 30 a 40 dias da inoculação, realizando-se a avaliação pela incidência ou porcentagem de área foliar infectada (FAWCETT, 1923).

3.2. Tombamento

O tombamento ou mela que ocorre em canteiros, leito de sementeira e tubetes, deve ser quantificado pela incidência da moléstia. É importante salientar que o tombamento também pode ser causado por outros patógenos, além de *Phytophthora*, como *Pythium* spp. e *Rhizoctonia solani*. As etapas necessárias para avaliação do tombamento de mudas são: esterilização do substrato, plantio de sementes sadias, aplicação de produto químico, caso pertinente, inoculação do substrato, adequação do ambiente e avaliação da incidência da doença após trinta dias (TSAO & GARBER, 1960; MITCHELL & KANNWISCHER-MITCHELL, 1993).

3.3. Podridão parda dos frutos cítricos

A inoculação de frutos cítricos para fins de avaliação de resistência a *Phytophthora* não é um procedimento usual, pois pode não haver relação

entre as lesões em frutos inoculados e a resistência do genótipo. A técnica de inoculação de frutos é, principalmente, utilizada na detecção e nos testes de patogenicidade em material destinado ao isolamento e diagnóstico e na confirmação e/ou manutenção da sua patogenicidade. Os frutos atuam como filtro de outros patógenos e microrganismos contaminantes: são lavados e desinfestados, podendo ser inoculados por um dos seguintes métodos: injeção de suspensão de inóculo, inserção de disco de meio de cultura infestado na região do albedo da casca, ferimento com agulha infestada, deposição de gotas da suspensão de inóculo ou inserção de tecido vegetal infectado. Ferimentos na casca são necessários para facilitar a infecção. Após a inoculação, os frutos são mantidos em bancadas de laboratório até o aparecimento de sintomas (manchas pardas e odor acre característico). No processo de isolamento, seções de polpa do fruto ou de sementes infectadas são transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura semi-seletivo para *Phytophthora* (TSAO & OCANA, 1969; TIMMER et al., 1993).

A avaliação de podridão-parda em frutos cítricos atacados no campo pode se dar por meio da contagem do número de frutos doentes em cada árvore e pelo tamanho da lesão no fruto.

3.4. Podridão de radículas

Os cultivares de porta-enxertos de citros apresentam maior ou menor capacidade de emitir novas radículas em presença de *Phytophthora* em resposta às infecções provocadas pelo patógeno. Essa característica recebe o nome de tolerância, podendo ser quantificada por diferentes métodos (GRAHAM, 1990; GRAHAM & TIMMER, 1992).

A principal técnica de inoculação de *Phytophthora* utilizada para avaliação da podridão de radículas consiste na inoculação da planta ou do substrato com zoósporos e/ou clamidósporos. O tempo entre a inoculação e a avaliação pode variar de 15 dias a 6 meses, dependendo de fatores como método de inoculação, condução do experimento, substrato e concentração de inóculo. No processo de avaliação, deve-se considerar a redução do número, peso ou volume de radículas das plantas inoculadas em relação à testemunha não inoculada.

Os principais fatores relacionados aos métodos de avaliação de podridão de radículas são: planta sadia e vigorosa, idade, padronização e tipo de inóculo, ajuste de ambiente, escolha do substrato (solo, solo + areia, vermiculita, argilas expandidas e outros recomendados para citros) e método de avaliação.

A quantificação da tolerância de genótipos à podridão de radículas é uma tarefa trabalhosa e desafiadora. Fatores como ambiente, constituição genética da planta, padronização dos testes, diferenças na agressividade do isolado, baixa repetibilidade e dificuldade de quantificar o processo de tolerância, pela sua sutileza, geram resultados contraditórios (CARPENTER & FURR, 1962; MATHERON et al., 1998). A seguir, são descritos os principais métodos de inoculação e avaliação da podridão de radículas em condições controladas e no campo.

3.4.1. Teste de tanque - Consiste na imersão de plantas jovens em recipientes contendo solução nutritiva + água areada + suspensão de zoósporos por longos períodos (18-20 horas) e plantio em substrato estéril. Essa técnica permite avaliar grande número de indivíduos em pequeno espaço físico. As principais etapas são: produção e imersão de plantas em tanque com inóculo, plantio das plantas pós-inoculação e sua manutenção em boas condições de irrigação, nutrição e avaliação (KLOTZ et al., 1958; CARPENTER & FURR, 1962).

3.4.2. Infestação do substrato - A infestação do substrato pode ser feita com micélio, clamidósporos e esporângios, usando-se discos de meio de cultura + estruturas do patógeno, ou com suspensões padronizadas de zoósporos. As principais etapas do processo são: produção e padronização do inóculo (propágulos/cm³ de substrato), infestação do substrato com estruturas do patógeno, plantio das mudas sadias no substrato, avaliação do experimento (TSAO & GARBER, 1960; CAMERON et al., 1972; GRIMM & HUTCHISON, 1973; GRAHAM & TIMMER, 1992). A infestação do substrato com clamidósporos é o método mais eficiente empregado na avaliação da podridão de radículas. Os controles de irrigação e nutrição das plantas são fatores importantes no processo (GRAHAM, 1990).

3.4.3. Avaliação de campo - A avaliação da podridão de radículas no campo é trabalhosa e apresenta baixa reprodutibilidade, pela alta variação das condições de ambiente. É importante ressaltar que *Phytophthora* é um competidor fraco em relação aos demais microrganismos do solo, principalmente quando se elevam os teores de matéria orgânica.

Na avaliação os principais passos são os seguintes: implantação na época chuvosa e quente do ano, enriquecimento do solo com estruturas do patógeno (pedaços de micélio + meio, frutos cítricos ou maçã infectados) e monitoramento da população do patógeno. A avaliação da podridão de radículas em campo é realizada, principalmente, em testes de eficiência de produtos químicos e verificação do nível de infestação do patógeno no solo (SANDLER et al., 1989; TIMMER et al., 1989).

A avaliação da podridão de radículas pode ser realizada pela sobrevivência de plântulas (CARPENTER & FURR, 1962), radículas doentes (GRIMM & HUTCHISON, 1973), redução do peso da matéria fresca das radículas (SANDLER et al., 1989; TIMMER et al., 1989; GRAHAM, 1990), viabilidade das radículas pelo teste de tetrazólio (KLOTZ & DeWOLFE, 1965), vigor via aspecto geral das plantas (CARVALHO, 2000), vigor e produtividade das plantas (SANDLER et al. 1988, 1989; TIMMER et al., 1989; FEICHTENBERGER, 1997) e pela associação dos métodos (MATHERON et al., 1998).

3.5. Gomose

Os genótipos apresentam diferentes reações às infecções de tronco causadas por *Phytophthora*. A resistência dos citros à gomose é mais fácil de ser avaliada do que a podridão de radículas. O patógeno causador da gomose necessita de ferimento para causar infecção nas plantas. A resistência dos citros à gomose é de caráter quantitativo, sendo controlada por poligenes (SIVIERO, 2001).

As condições essenciais para avaliação da gomose são: planta sadia e vigorosa, patógeno ativo, método seguro e eficiente de inoculação e ambiente com alta umidade relativa do ar e temperatura entre 25 e 30°C. Em trabalhos de campo, a avaliação de gomose deve ser realizada priorizando as inoculações no tronco e em ambiente controlado em hastes/ramos jovens inoculados (ROSSETTI, 1947; SIVIERO, 2001).

3.5.1. Avaliação *in vitro* - Trabalhos em condições axênicas demonstram que genótipos de porta-enxertos para citros podem ser avaliados *in vitro*, infectando-se plântulas obtidas de sementes. O método consiste em pequenos ferimentos com auxílio de agulha infestada com micélio do patógeno na região do colo das plântulas. Para tal, as sementes devem ser lavadas em água e desinfestadas superficialmente em álcool 70% e em solução fungicida por cinco minutos e imersão em solução 25% de hipoclorito de sódio a 2% do princípio ativo. Em seguida, são germinadas em meio de cultivo MT (MURASHIGUE & TUCKER, 1969), suplementado com 0,1 mg/L de benzilamilopurina (BAP) e 1 mg/L de ácido indolbutírico (IBA). As plântulas devem permanecer em sala de crescimento quarenta dias, devendo, nos dez primeiros dias, ser mantidas no escuro para estimular o estiolamento e, logo após, submetidas a ambiente de 27°C e fotoperíodo de 18 horas. A avaliação da lesão pode ser realizada entre dez e quinze dias da inoculação do patógeno, medindo-se o comprimento da lesão e a porcentagem de plantas mortas (SIVIERO et al., 2001).

3.5.2. Inoculação de *Phytophthora* usando casca destacada - As inoculações são realizadas na parte interna de secções de cascas removidas de plantas adultas. As cascas são primeiramente desinfestadas com álcool 70%, flambadas e, em seguida, infectadas com um disco de meio de cultura infestado com patógeno, retirado de colônias com cinco a oito dias de idade. O lado correspondente ao crescimento do patógeno é posto em contato com a parte interna da casca, por quatro horas e, em seguida, retirado.

Após a inoculação, as cascas são acondicionadas em câmara úmida, a 25°C, e luz fluorescente contínua. A avaliação da lesão é efetuada de cinco a sete dias após a inoculação através da medida da área da lesão do patógeno. SIVIERO et al. (2000) constataram que tal método não foi eficiente na discriminação de genótipos quanto à resistência à gomose.

3.5.3. Método do disco - Consiste na inserção de um disco de meio de cultura colonizado com o patógeno e retirado de colônias com cinco a oito dias de idade. Primeiramente, um disco da casca da planta é retirado

com auxílio de um furador de metal. A seguir, um disco de mesmo diâmetro contendo meio de cultura e estruturas do patógeno é retirado da placa de Petri e posto junto ao ferimento, com a face do inóculo voltada para o lenho da planta. Posteriormente, o disco de casca é recolocado no local da inoculação. Após esse procedimento, a área correspondente a 2,0 cm acima e abaixo desse ponto é protegida com esparadrapo e algodão umedecido e, finalmente, envolvida com fita adesiva. Este método, descrito detalhadamente por ROSSETTI (1947), continua sendo o mais utilizado em inoculações para estudos de gomose em condições controladas e no campo.

A área da lesão provocada pelo patógeno pode ser transferida para papel/fita adesiva transparente, circundando-se a lesão com auxílio de caneta/pincel do lenho/casca. A área da lesão pode ser obtida usando papel quadriculado, pesagens comparativas, planímetro, mesa digitalizadora, *scanner*, aparelho integrador de área foliar, área da elipse e largura ou comprimento da lesão. A medida da largura apresenta limitações para trabalhos com plantas jovens, pois a lesão pode anelar a haste. A medida do comprimento é a mais adotada para mensurar as lesões em plantas jovens e apresenta alta correlação com a área real da lesão (KLOTZ et al., 1958; AFEK & SZTEJNBERG, 1990; MATHERON et al., 1998; SIVIERO et al., 2000; SIVIERO, 2001).

3.5.4. Método da inserção sob casca - Foi idealizado por GRIMM & HUTCHISON (1973) para uso em infecções de plantas adultas, sendo, posteriormente, adaptado para as de plantas jovens, por AFEK & SZTEJNBERG (1990). Consiste em introduzir um disco de meio de cultura infestado com o patógeno sob a casca da planta, sem destacar o tecido vegetal. Os cortes em T invertido são realizados com bisturi estéril. Em seguida, o disco contendo estruturas do patógeno é inserido e, a casca, comprimida contra o lenho da planta. A região externa é então protegida com esparadrapo, algodão e gaze umedecidos e envolta com fita adesiva. A avaliação pode ser feita a partir de duas semanas da inoculação através da medida da área ou do comprimento das lesões (SIVIERO et al., 2000).

3.5.5. Método do palito - Consiste na introdução de palitos de dente previamente infestados na haste de plantas jovens. Esse método foi usado em citros para inoculação de plântulas por AGUILAR-VILDOSO & POMPEU JR. (1997). Para tal, os palitos são cortados a 1/4 do seu tamanho normal, afilados em uma das extremidades, esterilizados com álcool 70%, fervidos em água por três vezes, com sucessivas trocas de água visando extrair possíveis substâncias tóxicas, e autoclavados. A seguir, são colocados em placas de Petri contendo meio de cultura juntamente com discos de meio de cultura infestados com *P. parasitica*, por cinco a sete dias. No momento em que o micélio de *P. parasitica* recobre todos os palitos, considera-se que estes estão prontos para a inoculação. Esta consiste na inserção do palito infestado com o patógeno nas hastes de plantas a uma altura de 3,0 a 5,0 cm do colo. O ponto de inoculação deve sofrer ferimentos prévios com agulha estéril visando facilitar a entrada do palito. O palito infestado permanece na planta até a data da avaliação. A área deve ser recoberta com algodão e gaze umedecidos. A avaliação pode ser realizada, medindo-se o comprimento da lesão 15 a 30 dias após a inoculação (SIVIERO, 2001).

3.5.6. Método da agulha - É realizado com auxílio de uma agulha de metal ou espinhos de plantas cítricas previamente desinfestados com álcool 70%. Posteriormente, agulha ou espinho é infestado com estruturas do patógeno obtidas em colônias de *P. parasitica* com cinco a oito dias de idade. A haste da planta é perfurada à altura de 2,0 cm do colo, introduzindo-se uma agulha até atingir a extremidade oposta da haste e, em seguida, insere-se a agulha infestada no ponto de inoculação, retirando-a posteriormente. O ponto de inoculação é protegido com algodão umedecido e vedado com auxílio de fita de enxertia. A avaliação é realizada de 20 a 30 dias após a inoculação. O método da agulha é indicado para uso em plântulas com 75 a 120 dias de idade e altura aproximada de 10 cm. A avaliação é realizada pelo número de plantas mortas ou pelo comprimento das lesões (SIVIERO, 2001).

3.5.7. Injeção de zoósporos - O método consiste na injeção de uma suspensão de zoósporos de *Phytophthora* em incisões realizadas junto à casca na parte basal das plantas. O método de inoculação pode ser adotado em trabalhos com plantas jovens e adultas no campo (WHITESIDE, 1974). O ponto de inoculação deve estar sempre umedecido, protegendo-se a área inoculada contra o ressecamento que pode inviabilizar a infecção e o desenvolvimento da doença. Papel e algodão úmidos podem ser usados para essa finalidade.

3.5.8. Avaliação de campo - A avaliação da gomose em condições naturais de infecção no campo pode ser realizada via incidência da moléstia, mediante contagem das plantas com sintomas, e por severidade, medindo-se a área externa e/ou interna da lesão no tronco de plantas atacadas, empregando-se uma escala diagramática desenvolvida para estimar a porcentagem de anelamento da lesão no tronco (GRIMM & HUTCHISON, 1973; SMITH et al., 1987). A técnica é útil em trabalhos de levantamento da resistência dos genótipos no campo; no entanto, apresenta a desvantagem de ser tardia na avaliação.

Em experimento de avaliação de porta-enxertos, realizou-se um levantamento de campo registrando-se a incidência de plantas doentes O limão ‘Siciliano’, genótipo altamente suscetível à gomose, apresentou 100% de incidência e 80% de plantas mortas, em oito anos apenas no campo (SIVIERO et al., 1999). Em todas as amostras de solo retiradas do campo experimental, detectou-se a presença de *P. parasitica* usando-se o método da isca descrito por GRIMM & ALEXANDER (1973).

Os ensaios de avaliação de eficiência, dose, formulações de produtos químicos são realizados, usando-se, principalmente, o método do disco. As principais etapas são: inoculação do patógeno, aplicação dos produtos antes (controle preventivo) ou após a inoculação (controle curativo), avaliação do tamanho das lesões das plantas infectadas tratadas e não tratadas cerca de dois meses após aplicação do produto (FEICHTENBERGER, 1990; FEICHTENBERGER & TRAVEL, 1999).

Tabela 1. Comparação de métodos de inoculação de *Phytophthora* em relação à idade da planta e ao tipo de doença em estudo

Métodos de inoculação	Gomose			Podridão de radículas	
	Plântulas	Mudas	Árvores	Mudas	Árvores
Agulha	XX*	X			
Palito de dente	X				
Disco		XXX	XXX		
Inserção sob casca		XX	X		
Injeção de inóculo		XX	XX		
Teste de tanque				X	
Infestação do substrato				XX	X

XXX = ideal; XX = bom e X = regular. *Inclui método *in vitro*.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na Tabela 1, encontram-se, resumidamente, os resultados de um estudo comparativo dos métodos de inoculação de *Phytophthora* utilizados em trabalhos de campo e em ambiente controlado, para gomose e podridão de radículas.

SMITH et al. (1991) compararam diversos métodos de inoculação de *Phytophthora* em plantas jovens visando avaliar a suscetibilidade de genótipos de citros à gomose e concluíram que: a) o método de inoculação via clamidósporos é eficiente e prático, quando comparado com o do disco e suspensão de zoósporos, e permite quantificar o inóculo com mais facilidade, e b) o uso do método do disco é muito severo em vista do alto potencial de inóculo.

No caso da podridão de radículas, os métodos de inoculação descritos são eficientes; no entanto, o teste de tanque tem sido substituído por outros menos trabalhosos.

A escolha do método de inoculação de *Phytophthora* em citros depende da idade das plantas. No estágio de plântulas, o método *in vitro* e o da agulha podem ser adotados para avaliação da gomose. A inoculação de plantas com mais de 4,0 mm de diâmetro pode ser feita pelo método do disco ou por inserção sob casca (SIVIERO, 2001) e, a avaliação, pela medida da área, comprimento da lesão e sobrevivência. O método do disco tem sido o preferido para estudos de resistência e controle químico no campo. A doença pode ser quantificada pela medida da área da lesão, obtida por diversos métodos, ou pela determinação do comprimento da lesão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFEK, U. & SZTEJNBERG, A. A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, n.1, p.66-68, 1990.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I. & POMPEU JÚNIOR, J. Inoculação de *Phytophthora parasitica* em caules de variedades cítricas pelo método do palito. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.240, 1997.
- AVERNA-SACCÁ, R. Moléstias da laranjeira. **Boletim Agrícola**, Piracicaba, v.18, p.334-346, 1917.
- CAMERON, J.W.; KLOTZ, L.J.; DeWOLFE, T.A. & SOOST, R.K. Estimates of the resistance of *Citrus x Poncirus* hybrids to feeder root infection by *Phytophthora* spp. by greenhouse seedling test. **Plant Disease**, St. Paul, v.56, n.11, p.927-931, 1972.
- CARPENTER, J.B. & FURR, J.R. Evaluation of tolerance to root rot caused by *Phytophthora parasitica* in seedlings of citrus and related genera. **Phytopathology**, St. Paul, v.52, n.1, p.1277-1285, 1962.
- CARVALHO, M.L.T. **Reação de porta-enxertos híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora parasitica***. Campinas, 2000. 87p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Campinas.

- ERWIN, D.C. & RIBEIRO, O.K. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul : APS Press, 1996. 562p.
- FAWCETT, H.S. Gummosis of citrus. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.24, n.3, p. 235-255, 1923.
- FEICHTENBERGER, E. Control of *Phytophthora* gummosis of citrus with systemic fungicides in Brazil. **EPPO Bulletin**, Oxford, v.20, p.139-148, 1990.
- FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In.:LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. & SANTOS, A.F. (Eds.) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas : Livraria Rural, 2001. p. 283-342.
- FEICHTENBERGER, E. Effect of systemic fungicides applications on growth responses and fruit yields of sweet orange trees in *Phytophthora* infested soil: gummosis of citrus with systemic fungicides in Brazil. In.: WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 5., 1997, Montpellier. **Proceedings...** p.267-279.
- FEICHTENBERGER, E. & TRAVEL, A.P. Efeito de fungicidas sistêmicos e fosfitos no desenvolvimento de lesões de *Phytophthora parasitica* em laranjeiras ‘Hamlin’. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.289, 1999.
- GRAHAM, J.H. Evaluation of tolerance of *Citrus* rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospores infested soil. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, n.10, p.743-746, 1990.
- GRAHAM, J.H. & TIMMER, L.W. *Phytophthora* disease of citrus. In: KUMAR, J.; CHAUBE, H.S.; SINGH, U.S.; MUKHOPADHY, A.N. (Eds.) **Plant diseases of international importance - diseases of fruit crops**. New Jersey: Prentice-Hall, 1992. v.3, p.250-269.
- GRIMM, G.R. & ALEXANDER, A.F. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from slurries. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, n.6, p.540-541, 1973.
- GRIMM, G.R. & HUTCHISON, D.J. A procedure for evaluating resistance of citrus seedlings to *Phytophthora parasitica*. **Plant Disease**, St. Paul, v.57, n.8, p.669-672, 1973.
- HENDERSON, C.T.; HUTCHISON, D.J. & GARNSEY, S.M. Rapid production of zoospores of *Phytophthora parasitica* for citrus germless screening. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, p.1143, 1986.

- KLOTZ, L.J. & DeWOLFE, T.A. Tetrazolium, an indicator of extent of infection in *Phytophthora* root rot citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v.49, n.12, p.423-424, 1965.
- KLOTZ, L.J.; DeWOLFE, T.A. & PO-PING, W. Decay of fibrous roots of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v.48, n.11, p.615-622, 1958.
- MATHERON, M.E.; WRIGHT, G.C. & PORCHAS, M. Resistance to *Phytophthora citrophthora* and *Phytophthora parasitica* and nursery characteristics of several citrus rootstocks. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, n.11, p.1217-1225, 1998.
- MITCHELL, D.J. & KANNWISCHER-MITCHELL, M.E. *Phytophthora*. In: SINGLETON, L.L. MIHAIL, J.D. & RUSH, C.M. (Eds.) **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul : American Phytopathological Society, 1993. p.31-38.
- MURASHIGUE, T. & TUCKER, W. F. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In.: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM,1., 1968, Riverside. **Anais...** Riverside: SIC, 1969. v.3, p.1155-1166.
- ROSSETTI, V. Estudos sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros. I - Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de *Phytophthora*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.18, p.97-124, n.1,1947.
- SANDLER, H.A.; TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H. & PELOSI, R.R. Effect of fosetyl-AI and metalaxyl application on foot rot incidence and growth of young citrus trees under field conditions. **Proceedings Florida State Horticultural Society**, Salt Lake, v.101, p.10-12, 1988.
- SANDLER, H.A.; TIMMER, L.W.; GRAHAM, J.H. & ZITKO, S.E. Effect of fungicides application on populations of *Phytophthora parasitica* and feeder root densities and fruit yields of citrus trees. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, p.902-906, 1989.
- SIVIERO, A. **Métodos de inoculação da *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* a gomose**. 117p. Botucatu, 2001. 117p. Tese (Doutorado) - FCA/UNESP.
- SIVIERO, A.; FEICHTENBERGER, E. & LEDO, A.S. Avaliação de quatro porta-enxertos de citros a gomose de *Phytophthora* no Acre. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.28, 1999.

- SIVIERO A.; FURTADO, E.L.; BOAVA, L.P. & MACHADO, M.A. Reação de porta-enxertos de citros usando-se diferentes métodos de inoculação. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.126, n.1, p.95, 2000.
- SIVIERO, A.; SANTOS, F.A. FURTADO, E.L. & MACHADO, M.A. Avaliação in vitro de porta-enxerto de citros a gomose causada por *Phytophthora parasitica*. **Fitopatologia brasileira**, Fortaleza, v.26, p.395, 2001.
- SMITH, G.S.; HUTCHISON, D.J. & HENDERSON, T. Comparative use of soil infested with Chlamydospores to screen for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot in citrus cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n.4, p.402-405, 1991.
- SMITH, G.S.; HUTCHISON, D.J. & HENDERSON, T. Screening sweet orange citrus cultivars for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot. **Proceedings Florida State Horticultural Science**, Gainesville, v.110, n.1, p.64-66, 1987.
- TIMMER, L.W.; MENGE, J.A.; ZITKO, E.S.; POND, E.; MILLER, S.A. & JOHNSON, E.L.V. Comparison of ELISA techniques and standard isolation methods for *Phytophthora* detection in citrus orchards in Florida and California. **Plant Disease**, v.77, p.791-796, 1993.
- TIMMER, L.W.; SANDLER, H.A.; GRAHAM, J.H. & ZITKO, S.E. *Phytophthora* feeder root rot of bearing citrus fungicide effects on soil populations of *Phytophthora parasitica* and tree productivity. **Proceedings Florida State Horticultural Society**, Salt Lake, v.102, p.5-9. 1989.
- TSAO, P.H. Chlamydospore formation in sporangium-free liquid cultures of *Phytophthora parasitica*. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n.12, p.1412-1413, 1971.
- TSAO, P.H. & GARBER, M.J. Methods of soil infestation, watering and assessing degree of root infection for greenhouse in situ ecological studies with citrus *Phytophthora*. **Plant Disease**, St. Paul, v.44, n.6, p.710-715, 1960.
- TSAO, P.H. & OCANA, G. Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils on an improved antibiotic medium. **Nature**, London, v.23, p.636-638, 1969.
- WHITESIDE, J.O. Zoospore-inoculation techniques for determining the relative susceptibility of citrus rootstocks to foot rot. **Plant Disease**, St. Paul, v.58, n.8, p.713-717, 1974.