

SOBRE UMA NOVA MANCHA EM EPICARPO DE "CITRUS SINENSIS" Osbeck CAUSADA PELO PHOMA PUTTEMANSII n. sp.

RUBENS BENATAR,
Ajudante, servindo no I.B.V.

INTRODUÇÃO

Distribuidas pelo DR. H. GRILLO, assistente-chefe do Instituto de Biologia Vegetal, chegaram-nos ás mãos, para exame, em Outubro de 1936, algumas laranjas manchadas. Tive ainda, pelo mesmo tecnico, a atenção chamada para a originalidade do material, que foi remetido pelo DR. J. SOARES BRANDÃO FILHO, assistente do Serviço de Defesa Sanitaria Vegetal, em Nova Iguassú, Estado do Rio de Janeiro.

Logo após as primeiras observações, notamos tratar-se de um fungo do genero *Phoma*, diferente dos demais deste genero descriptos em "Citrus", tanto no aspecto macro como microscopico.

Posteriormente mostramos o andamento dos trabalhos ao DR. A. BITTANCOURT do Instituto Biologico de S. Paulo, que se interessou no presente estudo e a quem devo a deferencia da informação abaixo transcripta:

... "Com referencia á mancha do *Phoma* que está estudando, tenho a communicar-lhe que encontrei no nosso herbario sob o n.º. 2.217 um espécimen dessa mancha proveniente do herbario de A. PUTTEMANS e com as seguintes indicações:

N.º. 1.718 — Herb. Arsene Puttemans
PHOMA SP.

Sobre *Citrus aurantium* L. var. *dulcis* (casca)
S. Paulo, Capital, Mercado publico
Coll. A. Puttemans 3-12-912

A julgar pela data a fructa deveria ser proveniente do Rio de Janeiro pois em Dezembro a maioria das laranjas encontradas a venda em São Paulo são provenientes dos pomares do D. Federal e do E. do Rio. Isso mostra que a doença não é nova e portanto não deve apresentar muita seriedade, a não ser ocasionalmente..."

Ainda depois desta noticia, por solicitação nossa, receberemos daquelle phytopathologista a excicata em questão (Fig. 1), onde

constatamos ser aquella mancha da mesma natureza da que agora nos occupamos. Verifica-se, pois, a occurrencia deste *Phoma* em 1912, em character occasional, no mercado publico de S. Paulo. Se porém, naquella época este fungo mostrou-se de maneira isolada, este anno tem causado regulares prejuizos nos municipios do E. do Rio e, nas casas de embalagem, avaliamos em cerca de 5 % o numero de fructos prejudicados no refugo.

Tivemos ainda a oportunidade de consultar o eminente especialista Prof. H. S. FAWCETT da Universidade de California, quando de sua passagem pelo Rio de Janeiro em transito para S. Paulo. Verificando a marcha dos estudos e examinando o material de museu, herbario e laminas, corroborou em nossa opinião, embora não houvesse até então observado a presente doença.

Não tivemos ainda o tempo sufficiente para um estudo mais aprofundado sobre o comportamento deste fungo, pois que só no fim da safra do anno passado iniciamos os nossos trabalhos. Julgamos, entretanto, interessante e opportuno o relato das observações e experimentos realizados, assim como o estudo comparativo de especies afins.

O Genero *PHOMA* EM "*CITRUS SINENSIS*" Osb. ESTUDO COMPARATIVO — DISTRIBUIÇÃO GEOGRAPHICA

Innumeros fungos deste genero têm sido descriptos parasitando "*Citrus*", todavia apenas duas especies deste genero são exclusivamente parasitas do epicarpo de "*Citrus sinensis*" Osbeck: *Phoma aurantiiperda* RUGIERI e *Phoma citricarpa* McALPINE.

O primeiro delles, *Phoma aurantiiperda* Rug., vem de ser descripto em 1935 no Boletim de Pathologia Vegetal de Roma (10). Foi assignalado na primavera daquelle anno em Littoria, Italia, apresentando-se externamente como uma pequena macula de côr castanho clara, exactamente em correspondencia com a parte umbilical do fructo. Apreciado microscopicamente, os picnidios se formam no endocarpo e no extracto do mesocarpo, densamente agregados, globulosos com esporios hyalinos de $1-1,6 \times 2,4-4 \mu$.

Evidentemente, quer no seu aspecto macro como microscopico, differe bastante do que passaremos a descrever, não só pela disposição e tamanho dos picnidios como pelo tamanho do esporio, de aspecto bacteriforme.

O *Phoma citricarpa* McALPINE é o agente responsavel pela doença chamada "black spot", causadora de sensiveis prejuizos á laranja, mais do que no pomar, principalmente quando armaze-

signado na ASIA (4), (5), (13) e (14), AFRICA (9), OCEANIA (1), (2), (3), (6), (11) e (12), e, em 1928 MARCHIONATTO, em uma lista de fungos que causam novas doenças na Republica Argentina (8), assignalado o *Ph. citricarpa* em "*Citrus limonea*" Osb. Parece, todavia, que este parasito foi ali notado em caracter muito transitório, pois que desta data em diante não foi mais elle mencionado.

Apresenta-se o *Phoma citricarpa*, conforme verificou LEE, (7), macroscopicamente salpicando o fructo de pequenas maculas a principio marron-avermelhadas, passando depois a inteiramente negras. A mancha pode ter 1 a 2 m/m até 9 m/m em casos extremos. Este fungo semeado em meios artificiaes de Beef agar + 1, glucose agar + 1 e em meio solido de batata, teve restricto desenvolvimento. Examinado ao microscopio mostrou conidiophoros hyalinos, esporios apicaes ovaes ou piriformes e bastante granuloso 9,25 a 12,25 \times 5,5 a 12,1 μ .

Differe o *Ph. citricarpa* do que passamos a descrever, não só pela absoluta falta de semelhança macroscopica como no aspecto do esporio que em nosso caso é singularmente dotado de uma gotula olivacea que toma quasi todo o tamanho do esporio.

Procurando mostrar desta maneira não existir similariedade entre a presente nova especie e outras assignaladas em epicarpo de "*Citrus sinensis*" Osb., passamos ao seu estudo propriamente dito.

ISOLAMENTO — CARACTERISAÇÃO

A mancha só foi observada em fructos de *Citrus sinensis* Osb., com a maturação já iniciada e adiantada, sempre localisada na metade inferior. A principio apresentam-se pequenas, de cor parda escura (Fig. 2a). Mais tarde a mancha augmenta, estende-se, chegando a occupar cerca de 1/3 do fructo, já com a coloração negra, carbonacea, mostrando pequenos pontos salientes, negros, que prelevados com a ponta fina de uma agulha e examinados, vieram mostrar os picnidios do fungo (Figs. 2 e 3 b, c, d). Nesta phase o mycelio do *Phoma* atravessa a casca e penetra cada vez mais profundamente na polpa, apodrecendo-a (Fig. 4).

Procedendo ao isolamento do fungo, conseguimos obtel-o com uniformidade em todos os meios usados, tanto no de batata-agar como no meio solido de batata (Fig. 5).

Recebido o material e usando um fructo com uma phase adiantada da doença, removemos a casca e fomos colher na parte interna o material necessario para a sementeira, que foi collocado em meios de agar-batata de pH 6,8 e tambem em meios solidos de batata.

As sementeiras dentro de 48 horas mostravam ligeiro desenvolvimento negro-baço com irradiações de côr branco leitosa. Dahi accentuou-se o desenvolvimento, porém, sómente de mycelio por isso que não conseguimos picnidios nas culturas. Visto ao microscopio, as hyphas jovens são hyalinas e de septos distantes; as velhas tem côr olivacea escura, torulosas e muito septadas, exactamente com o mesmo aspecto daquellas observadas nos cortes feitos (Fig. 6 a, b).

INOCULAÇÕES EXPERIMENTAES

As inoculações experimentaes foram realizadas em *Citrus sinensis* Osb., variedade "Pera". Os fructos escolhidos para isso, mostravam-se absolutamente indemnes de manchas, foram previamente desinfectados com alcool e usados todos os cuidados asepticos no sentido de se evitar contaminações. Damos a seguir um graphico dos resultados obtidos:

Exp. n. 1 — Inoculações em camara humida na temperatura de laboratorio. Laranjas da variedade Pera, *escarificadas*. Testemunhas escarificadas mas sem inoculum.

| Fructo n.º | Especificados | Inoculum | Meio usado | Resultado | Observações |
|------------|---------------|-----------|---------------|-----------|---|
| 1 | + | — (test.) | — | — | Como inoculum comprehende-se a cultura pura do <i>Phoma</i> , obtida da maneira acima citada. |
| 2 | + | + | agar-batata | + | |
| 3 | + | — (test.) | — | — | |
| 4 | + | + | solido batata | + | |
| 5 | + | — (test.) | — | — | |
| 6 | + | + | agar-batata | + | |
| 7 | + | — (test.) | — | — | |
| 8 | + | + | solido batata | + | |
| 9 | + | — (test.) | — | — | |
| 10 | + | + | agar-batata | + | |

Obs. — Os resultados acima foram todos positivos a principio e o fungo caracterizado em novos cortes. Posteriormente prejudicados por causas alheias ás experiencias.

Exp. n. 2 — Inoculações em camara humida na temperatura do laboratorio. Laranjas da variedade "pera" sem escarificações. Testemunhas.

| Fructo n.º | Especificados | Inoculum | Meio usado | Resultado | Observações |
|------------|---------------|-----------|---------------|-----------|---|
| 1 | — | + | agar-batata | — | Estes fructos não escarificados conservaram-se perfectos. |
| 2 | — | — (test.) | — | — | |
| 3 | — | + | solido batata | — | |
| 4 | — | — (test.) | — | — | |
| 5 | — | + | agar-batata | — | |
| 6 | — | — (test.) | — | — | |
| 7 | — | + | solido batata | — | |
| 8 | — | — (test.) | — | — | |
| 9 | — | + | agar-batata | — | |
| 10 | — | — (test.) | — | — | |

O inoculum usado nas experiencias foi isolado de um fructo doente de onde proveio a cultura pura.

Na experiencia n. 1, as manchas foram obtidas em cinco dias. Notava-se que em volta da incisão feita no fructo, a area pardo escura apparecia, extendendo-se pela casca. Não foram, porém, avante as infecções. O desenvolvimento de outros fungos, principalmente a podridão causada pelo *Phomopsis*, vieram prejudicar a boa marcha do trabalho.

Na experiencia n. 2, em que não foram processadas escarificações, os resultados foram na totalidade negativos. Após a remoção, 48 horas depois, do algodão humedecido que deixava a cultura em contacto com a casca do fructo, nada mais se observou de anormal.

Passamos, então, a outra phase de experiencias, usando desta vez as inoculações directamente em fructos pendentes. Isso, tam-

bem, a principio, tornou-se difficil por já estar a safra colhida. No sentido, todavia, de não prejudicar a marcha e oportunidade do trabalho, fizemol-o em fructos serodios ainda não colhidos, nos pomares da Estação de Pomologia de Deodoro.

Separando uma arvore em que as condições sanitarias nos pareceram satisfactorias, innoculamos com uma cultura pura do *Phoma*, isolado como da vez precedente, cerca de 30 fructos pendentes. Usamos, para isso, de todo cuidado, dividindo a experiencia em duas series.

Na 1.^a serie, tomamos 15 fructos que após serem limpos superficialmente, foram escarificados com uma agulha desinfectada. Sobre estas escarificações depositamos directamente o inoculum, cobrindo-o com um algodão humedecido em agua distillada collocada em um tubo de ensaio. A seguir foram os fructos envolvidos em papel impermeavel.

Na 2.^a serie, foram tomados tambem 15 fructos, porém, nelles não procedemos escarificações. No mais, os mesmos cuidados acima mencionados.

Em ambos os casos, após 48 horas, retiramos o algodão e realizadas continuas observações sobre a marcha dos acontecimentos. Destas experiencias, porém, não obtivemos resultados positivos.

Como se vê, exceptuando a experiencia de laboratorio n. 1, não conseguimos reproduzir artificialmente o fungo, sobre laranjas, embora partindo de culturas puras e inoculações directas. Não seria de mais opinar-se que este fungo necessita de uma phase estaccionaria em outro qualquer órgão da planta onde aguarde o seu momento optimo de virulencia para infestalo; ou ainda, que necessita de uma outra mancha previa para seu desenvolvimento. Na presente safra, intensificaremos o trabalho de observações e experiencias, tentando uma solução definitiva do cyclo de vida deste *Phoma*.

DIAGNOSE

Após as considerações que vimos de fazer, bem como seu estudo sob diferentes aspectos, concluímos que, quer no seu aspecto macroscopico, culturas ou cortes microscopicos, trata-se indiscutivelmente de uma especie nova, por não corresponder absolutamente ás outras já descriptas. Para ella propomos a seguinte diagnose:

Phoma Puttemansii n. sp.

Mycello initio albo postea vero olivaceo-nigro, septato, toruloso; plic-nidiis erumpentis, pseudo stromaticus, sparsis vel gregaris, generatim in ectocarpo inclusis, rarius in mesocarpo, sub-globosis vel ellipsoideis, atris,

ostíolo minuti, magnitudine variabili 210-90 x 100-50 μ ; sporulis ellipsoides vel oblongo-ovatis utrimque obtuso-rotundatis 13-6 x 7-4,5 μ , unica guttula magna olivacea praeditis.

HABITAT — In fructibus maturis *Citri sinensis* Osbeck, formans maculas nigras attingentes 1-8 cm., superficiem externam deturpantes atque putredinem in interna parte producentes.

HOSPEDEIRO — DISTRIBUIÇÃO

Até o momento actual, só assignalamos o presente fungo em fructos de *Citrus sinensis* var. *pera*.

O copioso material que nos serviu para estudo, foi colligido nos municipios de S. Gonçalo, Campo Grande e Nova Iguassú, no Estado do Rio de Janeiro. Não nos consta que em outras regiões do paiz haja sido assignalado este *Phoma*, causando manchas como as descriptas. Proseguiremos os nossos trabalhos no sentido de elucidar a biologia do fungo e os tratamentos mais adequados.

LITTERATURA CITADA

- 1) ANONYMO — Biologist — Rept. Dept. of Agr. N. South Wales — 930.
- 2) ANONYMO — Biology — Rept. Dept. of Agr. N. South Wales — 927.
- 3) ANONYMO — Black spot of Citrus — Fruit World of Australasia — 1932.
- 4) ANONYMO — Plant quarantine and control administration. Service and regulatory announcement. Lis of intercept. plant pets. U.S.
- 5) BIRMINGHAM (W G.) — Black spot on dried Orangepeel from China — Agr. Gaz. New South Wales — 1922.
- 6) DARNELL-SMITH (G. P.) — Biological Branch — Ann. Rept. of Agr. New South Wales — 1922.
- 7) LEE (H. A.) — Black spot of Citrus caused by *Phoma citricarpa* Mc Alpine — The Philip. Jour. of Sci. — 1920.
- 8) MARCHIONATTO J. B. Fitoparasitos de la Argentina nuevos o poco conocidos. II. — Physis, B. Ayres — 1928.
- 9) POLE EVANS (I.B.), TOMPSON (Mary R. H.), PUTTERILL (V. A.) & HOBSON G. — Further investigations into the cause of wastage in export Citrus from South Africa — Dept. of Agr. S. Africa. Bull. n^o. 1 — 1921.

HERBARIO ARSENE PUTTEMANS

Nº.1718

Phoma sp.

sobre Citrus aurantium L.var dulcis
(casca da fruta)

São Paulo, Capital, mercado publico

3-12-1912

Coll: Ars. Puttemans



Fig. 1 — Aspecto do material colligido por Puttemans em 1912.
(Photo Lahera)