FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
CONTROLE DE DOENÇAS E PRAGAS DOS CITROS

LUIZ FERNANDO BRAZ DA SILVA

Monitoramento de inóculo de *Phyllosticta citricarpa* e efeito do controle cultural da mancha preta dos citros em pomar de laranja doce

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior

Araraquara
Julho – 2013

LUIZ FERNANDO BRAZ DA SILVA

Monitoramento de inóculo de *Phyllosticta citricarpa* e efeito do controle cultural da mancha preta dos citros em pomar de laranja doce

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior

Araraquara
Julho - 2013

LUIZ FERNANDO BRAZ DA SILVA

Monitoramento de inóculo de *Phyllosticta citricarpa* e efeito do controle cultural da mancha preta dos citros em pomar de laranja doce

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Araraquara, 04 de julho de 2013

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Nelson Arno Wulff (orientador)

Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, Araraquara, SP

_____

Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior (coorientador)

Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, Araraquara, SP

_____

Prof. Dr. Fernando Alves de Azevedo
Instituto Agronômico de Campinas – IAC, Cordeirópolis, SP

DEDICATÓRIA

Ao senhor Jesus Cristo nosso pai.
“Para que o Deus de nosso Senhor Jesus Cristo, o Pai da glória, vos dê em seu conhecimento o espírito de sabedoria e de revelação” **Efésios 1:17**

A minha esposa Maria Fernanda Guerreiro, companheira em todos os momentos, que juntos formamos o alicerce de nossa família abençoada.

A minha filha Debora Guerreiro Braz da Silva que com a pureza de criança soube me apoiar em mais este desafio.

Aos meus pais José Luiz Braz da Silva e Neide Candido Braz da Silva e meus irmãos e família, que continuam contribuindo para compor a minha história.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Fundecitrus por oferecer o Curso de Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros e pela oportunidade que me foi dada de participar no segundo ciclo em especial ao departamento científico.

Ao Prof. Dr. Nelson Arno Wulff e Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior pela orientação, ensinamentos, dedicação, convívio, paciência no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais professores do Curso, pela dedicação, competência e habilidade de gerar e transferir conhecimento.

Aos funcionários do Fundecitrus, em especial Denis Marin, Marcelo Scapin, Elaine Cristina Martins, Rosana Gonçalves Pereira, Flavia Helena, Tatiane Malara, Deividson Fernandes, Eder Alexandre Souza, Sidnei Ferreira, Jean Martins e Amanda Cristina Gonçalves de Oliveira pelo empenho e participação direta na realização dos trabalhos.

Aos demais funcionários do Fundecitrus que direta, ou indiretamente contribuíram para o bom andamento do curso e desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários da Fazenda Nelson Guerreiro, Orisvaldo Ribeiro da Silva, Geddy R. dos Reis e Susi M. R. Soares pela imprescindível colaboração nos trabalhos de campo.

A todos os companheiros de curso pela boa convivência e laços de amizade formados ao longo deste tempo.

A Profa. Chirlei Glienke por ter cedido o isolado 33/05 da Coleção de Isolados do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Há homens que lutam um dia e são bons.

Há outros que lutam um ano e são melhores.

Há os que lutam muitos anos, e são muito bons.

Mas há os que lutam toda a vida, esses são os imprescindíveis.

Bertold Brecht

SUMÁRIO

RESUMO 7
ABSTRACT 8
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Histórico da Mancha Preta dos Citros 3
2.2 Etiologia da Mancha Preta dos Citros 3
2.3 Epidemiologia da Mancha Preta dos Citros 4
2.4 Sintomatologia da Mancha Preta dos Citros 4
2.5 Controle cultural da Mancha Preta dos Citros 6
2.6 Uso de PCR para detecção de *Phyllosticta citricarpa* 7
3 MATERIAL E MÉTODOS 8
3.1 Manejo da mancha preta dos citros em pomar de laranjeira doce 8
3.1.1 Área experimental 8
3.1.2 Programa de pulverização com fungicidas 8
3.1.3 Poda de limpeza de ramos secos e manejo do mato 9
3.1.4 Delineamento experimental 10
3.1.5 Avaliação da doença 10
3.1.6 Avaliação da produtividade 11
3.1.7 Análise de custo-benefício 11
3.2 Monitoramento da presença de inóculo de *P. citricarpa* no pomar 12
3.2.1 Isolamento e crescimento de *P. citricarpa* 12
3.2.2 Utilização de mudas de laranjeira doce para monitoramento de inóculo 13
3.2.3 Extração de DNA 13
3.2.4 Análise da presença de *P. citricarpa* por PCR 14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 15
4.1 Manejo da mancha preta dos citros em pomar de laranjeira doce 15
4.2 Monitoramento da presença de inóculo de *P. citricarpa* no pomar 21
5 CONCLUSÃO 25
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 26

Monitoramento de inóculo de *Phyllosticta citricarpa* e efeito do controle cultural da mancha preta dos citros em pomar de laranja doce

Autor: Luiz Fernando Braz da Silva
Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff

RESUMO

A mancha preta dos citros (MPC) causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, é uma doença que tem causado diminuição de produtividade e aumentado os custos de controle, com prejuízo econômico na comercialização das principais variedades de citros. O controle da doença é realizado utilizando estratégias de controle químico e cultural. O controle químico com fungicidas ocorre por calendário, independentemente da presença ou não do patógeno, levando a pulverizações desnecessárias, aumentando os custos e causando eventuais prejuízos ao meio ambiente. Neste contexto, objetivou-se com este trabalho: i) avaliar o efeito do controle cultural com a associação da poda de limpeza de ramos secos e do manejo do mato no manejo da doença; ii) fazer uma análise de custo-benefício das estratégias de controle da MPC; iii) estabelecer a quantidade mínima de inóculo necessária para a detecção do patógeno nas folhas via PCR e iv) monitorar a presença de *P. citricarpa* no campo com a utilização de mudas de laranja doce como iscas de esporos. O experimento com controle cultural foi realizado em pomar comercial de laranjeira 'Pêra' (*Citrus sinensis*) enxertada em limão Cravo (*Citrus limonia*), com 6 anos de idade, na cidade de Brotas - SP, Brasil, conduzido em blocos casualizados com 4 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos foram avaliados através da incidência e a severidade da doença em frutos escolhidos ao acaso nas plantas. A determinação da quantidade mínima de esporos de *P. citricarpa* necessária para a detecção por meio da analise da PCR, foi determinada através de suspensões diluídas com 3.10^5, 3.10^4, 3.10^3, 3.10^2, 3.10^1 e 3.10^{-1} conídios/mL. O monitoramento da presença de *P. citricarpa* no campo foi feito a partir de amostras de folhas de plantas iscas coletadas para extração de DNA e testes de detecção através da PCR. O tratamento com a poda de ramos secos e com a rastelagem do mato e folhas cítricas caídas debaixo das plantas foi o que apresentou a menor incidência e severidade da doença. Amostras foliares com 3.10^2 a 3.10^5 esporos foram positivas na detecção de *P. citricarpa*. Não foi detectada a presença de *P. citricarpa* através da PCR em nenhuma das 120 plantas iscas levadas ao campo.

Palavras-chave: concentração de esporos, poda, roçadeira ecológica.

Detection of *Phyllosticta citricarpa spores in bait plants and assessment of cultural practices on the control of citrus Black spot in sweet Orange orchard*

Author: Luiz Fernando Braz da Silva
Advisor: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff

ABSTRACT

Citrus Black Spot (CBS) caused by *Phyllosticta citricarpa* is a disease that reduces productivity and increase control costs, with consequent economical losses due to reduced commercialization of symptomatic sweet orange. CBS control is achieved with various degrees of success when employing chemical and cultural control practices. Chemical control with fungicides is used in a calendar basis, independent on the presence of the pathogen and often resulting in additional and unnecessary sprays, increasing cost and causing damage to the environment. With this background, we have assessed: i) the effect of cultural control involving the association of pruning to remove old, dry branches, weed management and leaf removal under the canopy, in disease incidence and severity, ii) a cost-benefit analysis of the management strategies employed, iii) to detect spores of the causal agent in citrus leaves and, iv) to monitor the presence of *P. citricarpa* in sweet orange leaves from bait plants under field plants. An experiment was set up in a `Pera` sweet orange orchard, grafter into Rangpur Lime six years old, in Brotas – SP, Brazil, with random blocks with four treatments and three repetitions. Evaluations were carried out to assess the incidence and severity of CBS in sweet orange fruits randomly chosen from each tree to be evaluated. The detection limit of *P. citricarpa* in citrus leaves was determined to be 300 spores per sample. Sweet orange bait plants were displaced under field trees for 13 days, when leaves were collected and assayed for *P. citricarpa* detection. The treatment with pruning of dried branches associated to leaf removal under the canopy, resulted in the lower incidence and severity of CBS on the fruits. However, we were unable to detect *G. citricarpa* in bait plant during the evaluation period.

Key words: spore concentration, prunning, ecological brushcutter.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém 53% da produção mundial de suco de laranja, exporta 95% do que produz e consegue 85% da participação no mercado mundial. Com mais de 800 mil ha, a laranja é a fruta mais plantada no país. O estado de São Paulo detém 70% da área plantada. Na safra 2008/2009, a maioria (70%) da produção da laranja no Brasil foi destinada para industrialização de suco, 29,8% para consumo de fruta *in natura* no mercado doméstico e 0,2% para exportação de fruta *in natura*. O estado de São Paulo foi o maior produtor representando cerca de 80% da produção do país (Neves *et al*., 2010).

Apesar de todo o cenário favorável e do domínio do agronegócio citrícola, essa atividade apresenta vários problemas fitossanitários, com destaque para as doenças, incluindo-se a mancha preta dos citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*. Esta doença apresenta grande importância econômica. Todas as principais variedades comerciais de laranjeiras doces (*Citrus sinensis*) são suscetíveis ao patógeno. Trata-se de uma doença quarentenária para os países da União Europeia, cujo nível de tolerância é zero (Aguilar-Vildoso *et al*., 2002).

O patógeno causa lesões em ramos, folhas e frutos, mas os sintomas em laranjeiras são visíveis e problemáticos em frutos (Feichtenberger *et al*., 1997). Estas lesões encontra-se em sua maioria na casca do fruto. No Brasil são descritos seis tipos de sintomas (Laranjeira *et al*., 2005), sendo os mais comuns o tipo mancha dura e o da falsa melanose (Kotzé, 1981; 1988). As lesões nos frutos ocasionam queda precoce, podendo ocasionar perdas superiores a 80% como observado na Austrália e África do Sul (Klotz, 1978) e depreciam os frutos para a comercialização no mercado de fruta fresca.

Durante o ciclo da doença, o patógeno produz dois tipos de inóculo: os ascósporos, esporos sexuais, formados em pseudotécios nas folhas caídas em decomposição e dispersos pelo vento, e os conídios, esporos assexuais, formados em picnídios nas lesões dos frutos, folhas e ramos secos e são dispersos a curtas distâncias pela ação da água (Mconie, 1964; Kotzé, 1981).

O período de incubação da MPC é variável, em frutos com 1,5 cm de diâmetro, esse período pode ser superior a 200 dias e em frutos com diâmetros superiores a 7 cm, o período de incubação é inferior a 60 dias. Os frutos estão suscetíveis desde o início da sua formação no estádio de queda das pétalas das flores até o final da sua maturação (Aguiar *et al*., 2012).

O manejo da MPC é voltado para a eliminação e/ou supressão das duas fontes de inoculo: os conídios e os ascósporos. As principais estratégias de manejo são o plantio de

mudas sadias, pulverizações com fungicidas benzimidazóis, estrobilurinas, cúpricos ou ditiocarbamatos, associados a óleos minerais ou vegetais e práticas culturais como o manejo do mato, poda de limpeza de ramos secos e antecipação da colheita (Feichtenberger *et al*. 1997, FUNDECITRUS, 2008). Problemas relacionados ao uso de fungicidas, como o surgimento de isolados de *P. citricarpa* resistentes a carbendazim (Rodrigues *et al*., 2007), impactos negativos ao ambiente e restrições de ordem pública e econômica relacionadas à exportação do suco de laranja, estimulam estudos voltados para uma integração de diferentes estratégias de manejo desta doença.

A quantificação de inóculo de *P. citricarpa* nos pomares ainda é uma prática sem uso no Brasil e, por este motivo, as pulverizações com fungicidas ainda são realizadas por meio do sistema calendário. Na África do Sul, apenas os ascósporos são importantes na epidemiologia da MPC e o monitoramento dos mesmos é realizado com auxílio de armadilhas caça-esporos. Entretanto, essas armadilhas têm o inconveniente de detectar também ascósporos de outra espécie não patogênica de *Phyllosticta*, pois ambas apresentam esporos indistinguíveis (Fourie *et al*., 2013). No Brasil, os conídios são importantes para o incremento da doença nos pomares (Spósito *et al*., 2007, 2008, 2011), mas as armadilhas caça-esporos não detectam a presença dos conídios no campo, pois não são disseminados pelo vento. Assim, novas metodologias que possam detectar ascósporos e conídios conjuntamente no campo devem ser estudadas.

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho: i) avaliar o efeito do controle cultural com a associação da poda de limpeza de ramos secos e do manejo do mato no manejo da doença; ii) fazer uma análise de custo-benefício das diferentes estratégias de controle da MPC e; iii) estabelecer a quantidade mínima de inóculo necessária para detecção do patógeno nas folhas via PCR convencional e monitorar a presença de *P. citricarpa* no campo com a utilização de mudas de laranjeira doce (*Citrus sinensis*) como iscas de conídios e ascósporos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da Mancha Preta dos Citros

O primeiro relato da MPC foi em 1895 na Austrália (Paul *et al*., 2005). Em 1929, a doença foi descrita na África do Sul (Doidge, 1929), se tornando rapidamente o principal problema fitossanitário da citricultura do país (Schutte *et al*., 1997). Posteriormente, a MPC foi relatada em outros países da África (Quênia, Moçambique, Nigéria, África do Sul, Zâmbia, Suazilândia e Zimbábue), Ásia (Butão, China, Taiwan, Indonésia e Filipinas), América do Sul (Argentina, Uruguai e Brasil), (Kotzé, 1988; Paul *et al*., 2005), e recentemente na América do Norte (Estados Unidos) (Schubert et al., 2012). O patógeno está incluído na lista quarentenária da Comunidade Europeia como praga quarentenária A1 (Laranjeira *et al*., 2005).

No Brasil, a doença foi relatada em pomares comerciais no estado do Rio de Janeiro em 1980 (Robbs, 1990). Em 1992, a doença foi observada em pomares no município de Conchal, região importante da citricultura paulista (Goes & Feichtenberger, 1993). Nos anos seguintes, a doença foi disseminada para vários outros municípios do estado de São Paulo e outros estados do Brasil. A MPC já foi relatada em todos os estados das regiões Sul, Sudeste, na região Centro-Oeste no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e na região Norte no estado do Amazonas (MAPA, 2008). Na região Nordeste a doença já esta presente no estado da Bahia (EMDAGRO, 2013).

2.2 Etiologia da Mancha Preta dos Citros

O patógeno apresenta as fases teleomórfica e anamórfica. Em sua fase teleomórfica (perfeita ou sexuada) é chamado de *Guignardia citricarpa* Kiely. Na fase anamórfica (imperfeita ou assexuada) é chamado de *Phyllosticta citricarpa* McAlp. (Kotzé, 1981).

Na sua fase sexuada, *G. citricarpa* apresenta pseudotécio globoso a subgloboso. Os pseudotécios são corpos de frutificação isolados ou agregados. Por apresentarem fototropismo positivo, essas estruturas são formadas no lado voltado para a luz em folhas cítricas caídas no solo. Em seu interior são formadas ascas bitunicadas de formato cilíndrico-clavado. No interior das ascas são formados até oito ascósporos (Kotzé, 1988). Os ascósporos são unicelulares, hialinos, cilíndricos com o centro dilatado, apresentando apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (Feichtenberger *et al*., 1997). Os ascósporos são cobertos por uma massa gelatinosa na extremidade, medindo 8 - 17 μm x 3,3 - 8 μm. Em sua fase assexual, *P. citricarpa* produz picnídios em lesões contidas em frutos, ramos secos, pedúnculo e folhas

(Mconie, 1964). Os picnídios são de coloração negra, isolados ou agregados (Feichtenberger *et al*., 1997). No interior dos picnídios são formados os conídios que apresentam forma elíptica (8-10,5 x 5,5-7 μm), são hialinos, unicelulares, multigutulados com um apêndice numa das extremidades (Feichtenberger *et al*., 1997).

2.3 Epidemiologia da Mancha Preta dos Citros

O fungo pode sobreviver em folhas caídas no solo, frutos, ramos e folhas nas plantas. Nas folhas caídas, a produção de ascósporos de *G. citricarpa* é favorecida pela alternância de períodos secos e úmidos (Feichtenberger, 1996). A maturação dos ascósporos ocorre após 40-180 dias a contar da queda das folhas (Kotzé, 1981). Os ascósporos maduros são ejetados a uma altura de 1,5 cm, sendo levados pelo vento a médias e longas distâncias (Mconie, 1964; Spósito, 2003). Já os conídios formados em frutos, ramos e folhas são disseminados a curtas distâncias na mesma planta no sentido descendente (Spósito, 2003). Tanto seus esporos sexuais (ascósporos) como os esporos assexuais (conídios) podem colonizar os tecidos do hospedeiro causando infecções em frutos e folhas (Laranjeira *et al*., 2005).

Os esporos na presença de água livre por períodos de pelo menos 24 horas germinam produzindo apressórios (Timmer, 1999). A penetração no tecido do hospedeiro é direta através da cutícula (Laranjeira *et al*., 2005). O fungo pode permanecer dormente por até 12 meses. Por essa razão, os sintomas, muitas vezes, desenvolvem-se somente ao término do inverno e até mesmo, após a colheita dos frutos.

As folhas cítricas infectadas tanto por ascósporos quanto por conídios, quando caem ao solo tornam-se fontes de inóculo primário da doença e podem atingir novas áreas livres da doença (aloinfecção). Já os conídios em ramos e frutos são importantes para o incremento da doença na planta e representam o ciclo secundário da doença (autoinfecção) (Timmer, 1990; Spósito, 2003). No Brasil, ainda não há um consenso sobre qual das duas fontes de inóculo é mais importante uma vez que a doença já tenha sido estabelecida numa área.

2.4 Sintomatologia da Mancha Preta dos Citros

Em termos gerais, apenas a laranjeira azeda (*Citrus aurantium*) e seus híbridos mostram-se resistentes a *P. citricarpa* (Kotzé, 1981). A lima ácida 'Tahiti'(*Citrus latifólia*), por outro lado, mostra-se tolerante ao fungo (Baldassari *et al*., 2008). Os sintomas da MPC ocorrem em ramos, folhas e frutos (Rossetti, 2001), sendo mais problemáticos nos frutos. As lesões limitam se ao albedo, prejudicando a aparência dos frutos, inviabilizando a comercialização para o mercado de fruta fresca (Aguilar-Vildoso *et.al*., 2002). O

aparecimento destes sintomas pode demorar mais de 220 dias, dependendo da variedade (Aguiar *et al*., 2012). A manifestação dos sintomas pode ocorrer após a colheita dos frutos e durante o transporte, sendo um complicador para a exportação de frutas para áreas livres do patógeno.

No Brasil são relatados seis tipos de sintomas em frutos: i) *Mancha dura* – sintoma típico da doença, que aparece quando os frutos estão iniciando a maturação. Apresentam o centro deprimido de cor clara e as bordas salientes de coloração negra (Figura 1A); ii) *Mancha sardenta* – sintoma parecido com a mancha dura, embora apresente a borda de coloração mais clara e são observadas depois que os frutos já atingiram a maturação (Figura 1B); iii) *Mancha virulenta* - aparecem quando os frutos estão maduros ou após a colheita, sendo resultado da coalescência de lesões dos dois tipos anteriores, dando origem a grandes lesões. No interior dos três tipos de lesões citados acima são formados os picnídios contendo conídios e essas são fontes de inóculo da doença (Figura 1C); iv) *Falsa melanose* - aparecem quando o fruto ainda está verde, sendo caracterizada por manchas escuras, pequenas e lisas. Este sintoma pode ser confundido com os de melanose (causada por *Diaporthe citri*), que apresentam lesões mais claras e ásperas; v) *Mancha trincada* - observada em frutos ainda verdes e após a maturação dos frutos as lesões apresentam trincas. Esse sintoma está associado com a presença do ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*); vi) *Mancha rendilhada* - caracterizada pela presença de lesões superficiais de coloração escura que atingem grandes áreas dos frutos com aspecto de escorrimento, quando estes ainda apresentam-se verde. Esta lesão, assim como a mancha trincada e a falsa malanose não apresentam picnídios e não são fontes de inóculo (Fundecitrus, 2008).

Figura 1 – Frutos de laranja doce com sintomas típicos de mancha dura (A), mancha sardenta (B) e mancha virulenta (C).

Em folhas, os sintomas são menos frequentes, são parecidas com aqueles do tipo mancha dura (Fundecitrus, 2008) ou falsa melanose dos frutos (Silva Junior *et al*., 2012).

2.5 Controle cultural da Mancha Preta dos Citros

O controle pode ser realizado reduzindo a produção ou liberação dos esporos ou protegendo os tecidos cítricos a fim de evitar as infecções. Para atuar sobre os ascósporos pode-se utilizar: i) manejo da vegetação verde (gramíneas e leguminosas) entre as ruas de plantio, com roçadeiras ecológicas (Rossêtto, 2009), ii) aceleração da decomposição de folhas cítricas caídas no solo com uso de ureia aplicada por meio de barras de herbicidas (Bellote *et al*., 2009); (iii) eliminação das folhas cítricas caídas com o uso de rastelos manuais ou mecânicos conjugados com trinchas (Scaloppi *et al*., 2012) e, iv) redução da queda de folhas das plantas com o uso de irrigação. Para atuar sobre os conídios, pode-se realizar a poda de limpeza de ramos secos e aplicações com fungicidas para reduzir a produção desses esporos nos frutos e ramos (Goes & Almeida, 2007).

A integração das diferentes estratégias de manejo deve ser realizada para obtenção de sucesso no controle da doença. O manejo com roçadeiras ecológicas que lança o mato da entrelinha sob a copa das plantas apresenta retornos diretos e indiretos (Rossêtto, 2009). A cobertura morta sob a copa da planta cítrica, além servir como barreira física para os ascósporos, contribui para reduzir a amplitude térmica no solo e acelerar a decomposição das folhas (Bellote *et al*., 2013).

Bellotte *et al*. (2013) verificaram que o manejo dos cultivos intercalares como amendoim forrageiro e capim *coastcross*, lançados sob as plantas cítricas por roçadeira ecológica, reduziram a severidade da MPC a níveis comparáveis ao controle químico padrão da doença. Resultados semelhantes foram obtidos por Rossêtto (2009) que observou uma redução dos sintomas da MPC ao utilizar a roçadeira ecológica na entrelinha do pomar para o manejo de diferentes cultivos intercalares.

A poda de limpeza é realizada a fim de remover os galhos e ramos lesionados por pragas e doenças e também os verdes, que não tenham condições de produzir frutos. Esta operação melhora a penetração de luz solar no interior da copa das plantas e a aeração da planta, facilitando os tratos fitossanitários. Normalmente é realizada no inverno (Carvalho *et al*., 2005). Após esta operação recomenda-se aplicar fungicida cúprico nos locais cortados, para evitar danos. As podas podem ser executadas com auxílio de tesouras, serrotes manuais ou serras motorizadas.

Segundo Nozaki (2007) os sintomas de falsa melanose estão associados com a presença de ramos secos na planta e, a realização da poda desses ramos proporciona incremento no controle da doença. Outras doenças como a rubelose (causada por *Erythricium*

salmonicolor), que provoca seca e morte de ramos e galhos parecem estar associadas com o incremento da MPC nos pomares (Goes & Almeida, 2007).

2.6 Uso de PCR para detecção de *Phyllosticta citricarpa*

A reação em cadeia pela ação da polimerase (PCR) é a técnica mais sensível para detecção de DNA. É baseada na amplificação de um determinado segmento de DNA pela extensão de oligonucleotidios (primers ou sequencias iniciadoras) que hibridizam com as fitas complementares de uma sequencia-molde ou sequencia-alvo. Repetidos ciclos com sucessivas variações de temperatura permitem a desnaturação do DNA molde, hibridização e extensão dos primers pela ação da DNA polimerase. Após vários ciclos, o segmento de DNA limitado pelos primers vai sendo amplificado (Eça, 2004). Assim, se partimos de uma única molécula de DNA molde, após 30 ciclos de desnaturação, hibridização e extensão, será obtido cerca de 1,4 bilhões de copias da região limitada pelos primers. Uma das limitações da técnica PCR é a necessidade do conhecimento prévio da sequencia que flanqueia o segmento a ser amplificado (Watson *et al.*, 1992; Alberts *et al.*, 1994).

Blanco (1999) estudando a variabilidade genética em linhagens patogênicas e endofíticas de *Phyllosticta* spp., através de marcadores RAPD, desenvolveu um par de primers (GCP1 e GCP2) capaz de amplificar um fragmento em torno de 300 pb, especifico para identificação de linhagens patogênicas de *P. citricarpa*. Resultado semelhante foi obtido por Stringari *et al*. (2009), mostrando que os primers GPC1 e GPC2 são eficientes na identificação de *P. citricarpa* como o agente causal da MPC através da técnica de PCR. A partir desta analise, a PCR tornou-se importante ferramenta molecular de diagnóstico para detecção e confirmação da presença do patógeno causador da MPC nos tecidos de plantas cítricas. Outros trabalhos descrevem primers específicos para a detecção de *P. citricarpa* e também foram desenvolvidos primers para a detecção da espécie saprofítica, que em sua fase assexual é conhecida por *Phyllosticta capitalensis* (Peres *et al*., 2007).

As ferramentas moleculares ainda não foram utilizadas neste patossistema a fim de monitorar o inóculo do patógeno no campo. Na África do Sul a ferramenta mais utilizada para a quantificação de inóculo no campo tem sido as armadilhas caça-esporos. Entretanto, esse equipamento captura os ascósporos de *G. citricarpa* e também captura os esporos da espécie não patogênica, pois são muito semelhantes. Por outro lado, essas armadilhas não capturam os conídios, pois estes não são disseminados pelo vento (Fourie *et al*., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manejo da mancha preta dos citros em pomar de laranja doce

3.1.1 Área experimental

O experimento foi realizado em pomar comercial de laranjeira 'Pêra' (*Citrus sinensis*) enxertada em limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*), espaçamento de 7 m x 3,5 m, com 6 anos de idade, localizado no munícipio de Brotas, região central do estado de São Paulo, Brasil. A produção deste pomar tem como principal destino o comercio de frutas *in natura* para o mercado interno.

3.1.2 Programa de pulverização com fungicidas

Foram realizadas em todas as parcelas cinco pulverizações com fungicidas acrescidos de óleo mineral, ao longo do desenvolvimento dos frutos. As pulverizações foram realizadas através de turboatomizador Natali modelo Alfa 4000, empregando-se um volume de calda em média de 2,4 litros por planta sendo suficiente para permitir boa cobertura das plantas que apresentavam, em média, 22 m^3 de volume de copa (altura x largura x profundidade). As cinco aplicações foram realizadas da seguinte forma:

1ª aplicação: realizada no estádio de 2/3 de pétalas caídas no dia 16/11/2011. Os fungicidas utilizados foram: i) piraclostrobina (Comet, 250 g/L de ingrediente ativo, Basf S.A.), na dose de 300 mL de produto comercial (p.c.) /2000 L de calda; ii) oxicloreto de cobre (Recop, 840 g/kg de ingrediente ativo, Atar do Brasil Ltda), na dose de 4 kg de p.c./2000 L de calda e iii) óleo mineral (Oppa, 800 g/L de ingrediente ativo, Petrobras Distribuidora S.A.), na dose de 5 L de p.c./2000 L de calda.

2ª aplicação: realizada no dia 13/12/2011, 27 dias após a pulverização anterior (DAA), com: i) oxicloreto de cobre (Recop), na dose de 4 kg de p.c./2000 L e, ii) óleo mineral (Oppa) na dose de 5 L de (p.c.) /2000 L.

3ª aplicação: realizada no dia 5/01/2012, 23 DAA, com: i) carbendazim (Derosal 500 SC, 500 g/L de ingrediente ativo, Bayer S.A.), na dose de 2 L de (p.c.) /2000 L de calda e ii) óleo mineral (Oppa) na dose de 5 L de (p.c.) /2000 L.

4ª aplicação: realizada no dia 1/02/2012, 27 DAA, com: i) trifloxistrobina (Flint, 500 g/kg de ingrediente ativo, Bayer S.A.), na dose de 150 g de (p.c.) /2000 L; ii) mancozebe (Unizeb, 800 g/kg de ingrediente ativo, Upl do Brasil Ltda.), na dose de 5 kg de (p.c.) /2000 e, iii) óleo mineral (Oppa) na dose de 5 L de (p.c.) /2000 L.

5ª aplicação: realizada no dia 05/03/2012, 33 DAA, com: i) piraclostrobina (Comet®, 250 g/L de ingrediente ativo, Basf S.A.), na dose de 300 mL de produto comercial (p.c.) /2000 L de calda e ii) óleo mineral (Oppa), na dose de 5 L de (p.c.) /2000 L.

3.1.3 Poda de limpeza de ramos secos e manejo do mato

A poda de ramos secos foi realizada manualmente utilizando serra ou alicate de poda em novembro de 2011. A roçada do mato da entrelinha foi realizada duas vezes em novembro de 2011 e janeiro de 2012 com a utilização de roçadeira ecológica, que direcionou o mato cortado para debaixo da copa das plantas de citros de forma a cobrir as folhas caídas em decomposição. A rastelagem do mato e folhas cítricas caídas no solo debaixo da copa das plantas foi realizada na mesma data da roçagem do mato com a utilização de um rastelo manual (Figura 2).

Figura 2 – Operação de manejo cultural com poda dos ramos secos (à esquerda), roçagem ecológica do mato da entrelinha (no centro) e rastelagem manual do mato (à direita) em pomar comercial de laranjeira ‘Pera’ em Brotas, SP.

Desta forma, o experimento contou com 4 tratamentos para o controle cultural da MPC. São eles:

T1 – Poda + Roçadeira

Manejo convencional da fazenda com aplicações de fungicidas associado à roçagem ecológica do mato nas entrelinhas. Ao manejo convencional foi adicionada a poda de ramos secos (poda de limpeza) nas plantas.

T2 – Poda + rastelo

Manejo da fazenda com aplicações de fungicidas. A roçagem ecológica do mato nas entrelinhas foi substituída pela rastelagem do mato das folhas cítricas caídas sob a copa das plantas (com rastelo manual). Ao manejo foi adicionada a poda de ramos secos (poda de limpeza) nas plantas e a rastelagem.

T3 – Roçadeira

Manejo convencional da fazenda com aplicações de fungicidas associado à roçagem ecológica do mato nas entrelinhas. Sem poda de ramos secos e sem rastelagem das folhas.

T4 – Rastelo

Manejo da fazenda com aplicações de fungicidas. A roçagem ecológica do mato nas entrelinhas foi substituída pela rastelagem do mato das folhas cítricas caídas sob a copa das plantas (com rastelo manual). Sem poda de ramos secos.

3.1.4 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em blocos casualizados com 4 tratamentos e 3 repetições, sendo 54 plantas por parcela, cada parcela composta por três ruas de 18 plantas, onde se considerou como parcela útil as 5 plantas centrais da rua central. Entre os blocos foi mantida uma linha de plantas como bordadura (Figura 3).

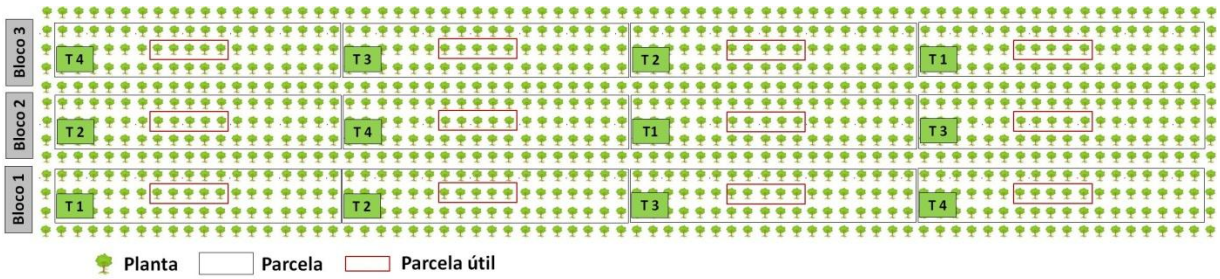

Figura 3 – Croqui da área experimental com a descrição das parcelas e tratamentos para o controle da mancha preta dos citros em pomar de laranjeira 'Pera' em Brotas, SP. T1 = poda de ramos secos + roçagem ecológica do mato; T2 = poda de ramos secos + rastelagem do mato e folhas cítricas; T3 = sem poda de ramos secos + roçagem ecológica do mato; T4 = sem poda de ramos secos + rastelagem do mato e folhas cítricas.

3.1.5 Avaliação da doença

A incidência e a severidade da doença foram avaliadas nas cinco plantas da parcela útil a partir de maio de 2012 (175 dias após o estádio de 2/3 de pétalas caídas), estendendo-se até a colheita dos frutos em janeiro 2013. As avaliações foram realizadas com intervalos de aproximadamente 30 dias, em 50 frutos escolhidos ao acaso por planta da parcela útil. Para a avaliação da severidade foi utilizada a escala adaptada de Spósito *et al.* (2004) (Figura 4).

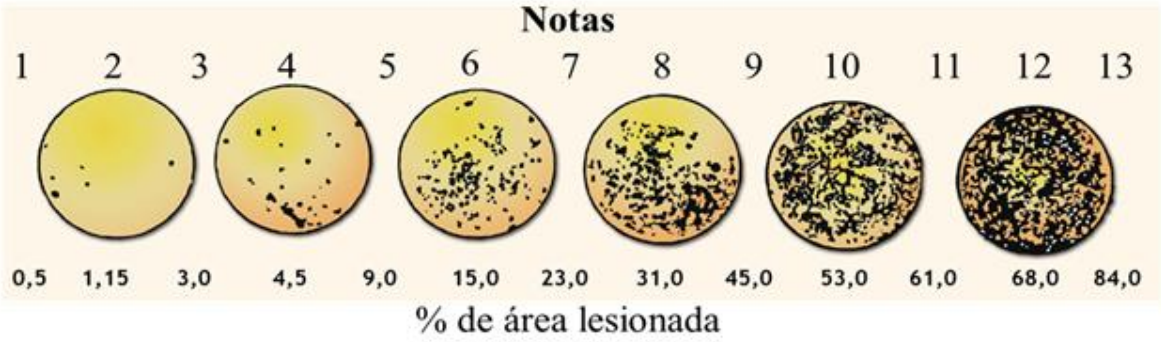

Figura 4 – Escala diagramática utilizada para avaliação da severidade dos sintomas da mancha preta dos citros, adaptada de Spósito *et al*. (2004).

Também foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), expressa pela plotagem da proporção de doença *versus* o tempo. Curvas de progresso da doença podem ser construídas para qualquer patossistema e é uma importante maneira de representar a epidemia de uma dada doença (Bergamin Filho, 1995).

3.1.6 Avaliação da produtividade

A colheita foi realizada em janeiro de 2013 e a produtividade das plantas avaliada por meio do peso e número de frutos obtidos por planta. Em julho de 2012 o pomar experimental foi atingido por uma chuva de granizo. A estimativa de produção inicial que era de 2,5 caixas de 40,8kg / planta, foi reduzida em função dos danos causados aos frutos que apodreceram e caíram prematuramente.

3.1.7 Análise de custo-benefício

Para realizar a análise do custos de produção incluindo as diferentes formas de manejo, a produtividade média adotada foi de 2,5 caixas / planta. O custo médio para a realização das diferentes operações de manejo no controle da mancha preta foi determinado para os quatro tratamentos. Foi considerado o custo de hora/maquina e hora/homem das operações, em reais, de acordo com os preços praticados na região de Brotas/SP, gastos para realizar as diferentes operações em um hectare na safra 2011/2012. O preço da caixa de 40,8 kg de laranja Pera, utilizado nos cálculos foi à média dos valores praticados pela indústria e o mercado de fruta *in natura* nos últimos 5 anos de acordo com o CEPEA (2013). Fruta para indústria de suco de laranja R$ 10,00 e fruta *in natura* para o mercado R$ 13,00.

3.2 Monitoramento da presença de inóculo de *P. citricarpa* no pomar

3.2.1 Isolamento e crescimento de *P. citricarpa*

Para a determinação da quantidade de esporos de *P. citricarpa* (teleomorfo: *G. citricarpa*) necessária para a detecção por meio da analise da PCR (Reação em cadeia da polimerase) foi conduzido um ensaio em laboratório utilizando o isolado 33/05 (cedido pela Profa. Chirlei Glienke da Coleção de Isolados do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná).

O isolado foi cultivado em meio de cultura batata dextrose agar (BDA), por 21 dias e, após este período, suspensão de conídios foi preparada a partir da colônia crescida. A suspensão inicial foi ajustada para a concentração de 3 x 10^5 conídios/mL. A partir desta suspensão foram realizadas diluições em série, sendo 1 mL da suspensão e 9 mL de água, formando assim suspensões diluídas com 3 x 10^4, 3 x 10^3, 3 x 10^2, 3 x 10^1 e 3 x 10^{-1} conídios/mL (Figura 5).

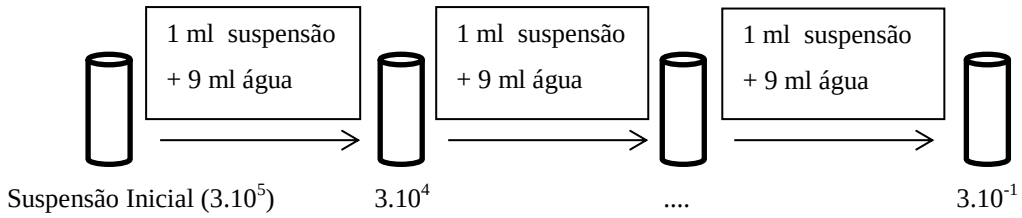

Figura 5 – Diluição em série da suspensão conidial de *Plyllosticta citricarpa.*

Após o preparo das suspensões em diferentes concentrações, foi realizada a inoculação em folhas de laranjeira doce (*Citrus sinensis*). Gotas de 100 µL de cada concentração da suspensão foram adicionadas em fragmentos de folhas destacadas de 2 cm x 2 cm. Para cada concentração foram utilizados três repetições, sendo cada repetição uma gota em cada pedaço de folha. Como controle, apenas água estéril utilizada no preparo da suspensão foi adicionada nos fragmentos. Após a deposição das gotas, os fragmentos de folhas foram mantidos em uma câmara úmida por 48 horas. Em seguida, os fragmentos de folhas foram triturados e utilizados para a extração de DNA e preparo do material para análise via PCR. Gotas de 100 µL de cada concentração da suspensão foram mantidas em microtubos na temperatura de 7 ºC e utilizadas para a extração de DNA sem serem depositadas nos fragmentos de folhas, a fim de verificar se o DNA vegetal poderia interferir na sensibilidade do teste.

3.2.2 Utilização de mudas de laranjeira doce para monitoramento de inóculo

Após o início do ciclo de pulverizações com 2/3 de pétalas caídas, a cada intervalo de 13 dias, um lote contendo 12 mudas de laranjeira doce foi levado até a área experimental em Brotas, SP onde foram distribuídas de tal forma que cada muda permaneceu sob a copa da terceira planta de cada uma das doze parcelas úteis (Figura 6).

Figura 6 – Muda de laranjeira doce sob a copa de uma planta da área experimental servindo como isca de conídios e ascósporos para o monitoramento da presença de inóculo de *Phyllosticta citricarpa*.

Transcorrido o período de 13 dias, cinco folhas de cada muda foram coletadas, ensacadas e transportadas para o laboratório para analise da PCR. Foram levados ao campo experimental 10 lotes de mudas, que produziram 120 amostras para análise da PCR.

3.2.3 Extração de DNA

As folhas coletadas no campo foram congeladas até o momento da extração de DNA, quando a superfície das folhas foi limpa com papel toalha par remover a sujeira grossa. Para a extração de DNA de cada amostra com 5 folhas foi utilizado uma porção de 0,5 g do limbo. O experimento foi repetido duas vezes.

A extração do DNA foi feita com o limbo foliar macerado em um bag de extração no homogeneizador Homex 6 (Bioreba, Suíça) seguindo o protocolo de extração com tampão CTAB (Murray & Thompson, 1980) adaptado conforme Teixeira *et al*. (2005). O macerado foi transferido para um microtubo de 2 mL e incubado por 30 minutos em banho Maria a 65°C, seguido de centrifugação a 15.300 *g* por 5 minutos. Um volume de sobrenadante de 900 µL foi transferido para um novo microtubo e adicionou-se 900 µL de clorofórmio álcool isoamilico (24:1 v/v). As fases foram misturadas invertendo o tubo e o sobrenadante foi

precipitado através de centrifugação a 15.300 *g* por 5 minutos. Um volume de sobrenadante de 800 µL foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 0,6 V de isopropanol, sendo armazenados 30 minutos a - 4 °C. O DNA foi precipitado por centrifugação a 17.700 *g* por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e posteriormente foi adicionado ao sedimento 1 mL de etanol 70% seguido de centrifugação a 17.700 *g* por 10 minutos. A etapa de lavagem do sedimento com etanol 70% foi repetida uma vez. O sedimento foi seco por 6 minutos em evaporador rotativo a vácuo e dissolvido em 50 µL de água ultrapura. O DNA foi armazenado a – 20ºC até sua utilização. Para cada amostra foi determinada a quantidade de DNA com o espectrofotômetro modelo Nano Drop1000 (Thermo).

3.2.4 Análise da presença de *P. citricarpa* por PCR

A reação da PCR foi realizada com os primers GCP1 (AAGTGTGAGTGTCGAAGGTGG) e GCP2 (GACGACTCGCTTTTCTACGGC), que amplificam um fragmento de 300 pb e são específicos para *P. citricarpa* (Blanco, 1999, Stringari *et al*., 2009). Utilizaram-se dois microlitros de DNA genômico, totalizando entre 250 e 500 ng de DNA. O mix para a reação foi preparado em volume final de 20 µL, contendo tampão da PCR (Tris-HCl pH 8,4 20 mM; KCl 50 mM), dNTPs a 0,2 mM, $MgCl_2$ a 1,5 mM, Primers GCP1 e GCP2 a 0,3 µM e 0,8 U Taq polimerase (Invitrogen). O controle negativo contendo todos os reagentes, exceto DNA genomico, foi incluido em todas as reações.

A amplificação foi feita em um termociclador (Eppendorf MasterCycler Gradient) programado para um ciclo inicial de 94 °C por 4 minutos seguidos de 39 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 68 °C por 2 minutos e 72 °C por 1 minuto, seguidos de um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

A análise dos produtos de amplificação na PCR foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (concentração dos reagentes). O DNA foi corado com brometo de etídio e visualização em transluminador com luz UV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Manejo da mancha preta dos citros em pomar de laranjeira doce

No início das avalições, no mês de maio de 2012, a incidência de frutos sintomáticos variou de 4,8 a 7,2% e as médias de todos os tratamentos permaneceram semelhantes até a avaliação de novembro, quando as incidências médias variaram de 42,8 a 59,7% de frutos sintomáticos (Figura 7). Somente na última avaliação, em janeiro de 2013, foi observada uma diferença significativa entre os tratamentos, onde o tratamento 2 (T2) apresentou 40,7% de frutos sintomáticos, diferindo dos demais tratamentos (T1, T3 e T4) com incidência de 62,9 a 67,7% de frutos sintomáticos (Figura 7). O maior incremento da doença se deu a partir do mês de outubro, quando a incidência em todos os tratamentos foi inferior a 26% de frutos sintomáticos (Figura 7).

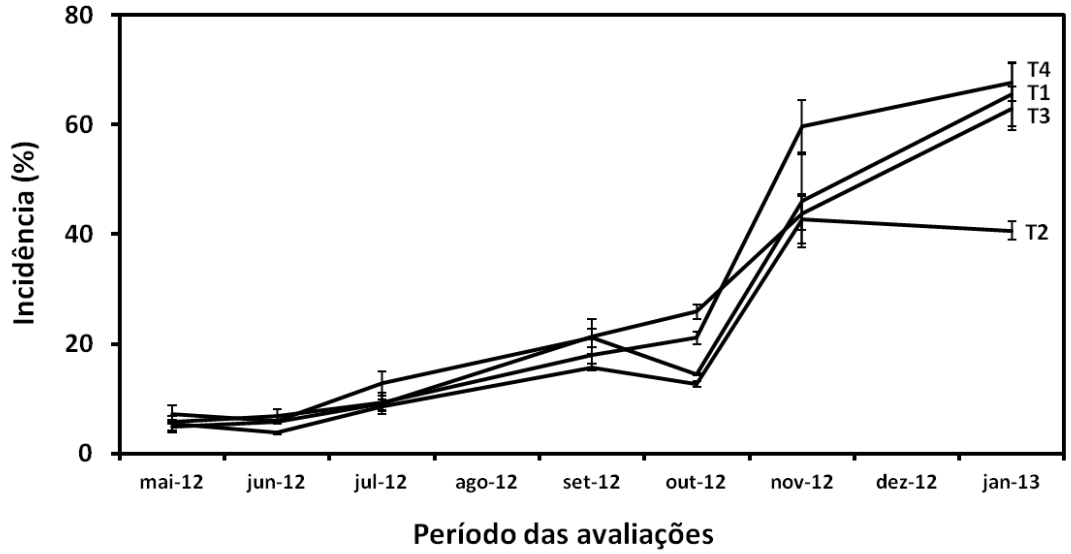

Figura 7 – Progresso da incidência (%) de mancha preta dos citros em frutos de laranjeira doce 'Pera' de maio/2012 a janeiro/2013 nos diferentes tratamentos para o manejo da mancha preta dos citros. T1 = poda de ramos secos + roçagem ecológica do mato; T2 = poda de ramos secos + rastelagem do mato e folhas cítricas; T3 = sem poda de ramos secos + roçagem ecológica do mato; T4 = sem poda de ramos secos + rastelagem do mato e folhas cítricas.

O período de chuvas frequentes na área ocorreu a partir de outubro, desta forma, inicia-se também a disseminação dos ascósporos das folhas em decomposição por meio do vento que se estende principalmente até o mês de janeiro (Reis, 2001) e a disseminação dos conídios dos ramos secos por meio de respingos de chuvas (Spósito, 2003). Este fato poderia explicar a menor incidência de frutos sintomáticos no tratamento 2 onde foram retiradas as folhas caídas em decomposição com rastelo e

realizada a poda de ramos secos. Em contrapartida, nos demais tratamentos onde não foram realizadas as duas estratégias em conjunto, o inóculo presente nas folhas em decomposição e/ou em ramos secos foi mantido na área, sendo as folhas em decomposição apenas cobertas pelo mato da entrelinha.

Para os dados de incidência pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), foi possível observar que o tratamento 2 apresentou valor médio de 1498, valor significativamente inferior aos demais tratamentos, que apresentaram médias variando de 1920 a 2138, os quais não diferiram entre si (Figura 8). Considerando apenas a avaliação final realizada em janeiro, os resultados são os mesmos obtidos para a AACPD, com valores significativamente inferiores no tratamento 2 (poda de limpeza + retirada das folhas) quando comparado aos dos demais tratamentos onde não foram utilizados o rastelo e a poda de limpeza de ramos secos conjuntamente (dados não mostrados).

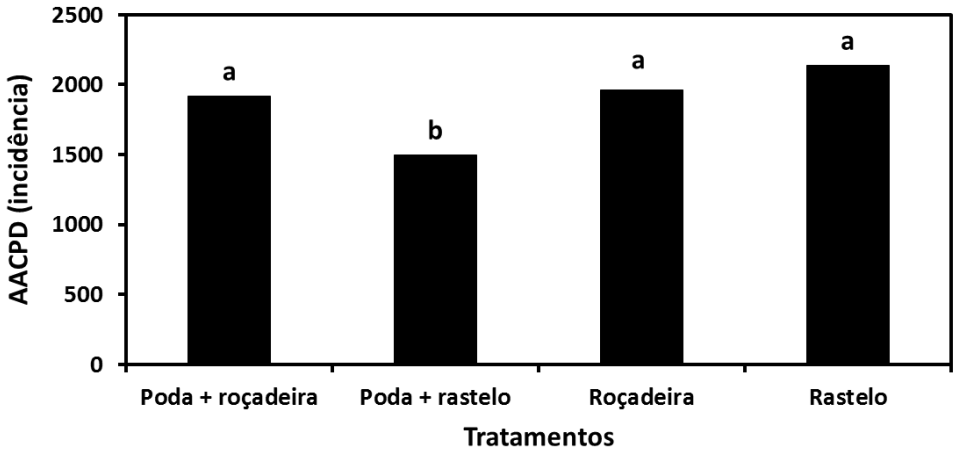

Figura 8 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em incidência (% de frutos com sintomas) da mancha preta dos citros nas 7 avaliações de maio/2012 a janeiro/2013 nos diferentes tratamentos em pomar de laranjeira 'Pera', no município de Brotas. Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os dados de severidade da doença em frutos, os resultados mostraram um comportamento semelhante aos obtidos para a incidência. A severidade foi aumentando ao longo das avaliações, até a última avaliação no mês de janeiro de 2013, com crescimento abrupto a partir de outubro de 2012 em todos os tratamentos (Figura 9). Na primeira avalição realizada no mês de maio de 2012, a porcentagem de área lesionada nos frutos sintomáticos nos tratamentos variou de 0,03 e 0,04%. O tratamento (T2)

apresentou 0,62% de área lesionada dos frutos sintomáticos, diferindo dos demais tratamentos (T1, T3 e T4) que apresentaram a porcentagem de área lesionada dos frutos sintomáticos entre 1,5 e 1,53% (Figura 9).

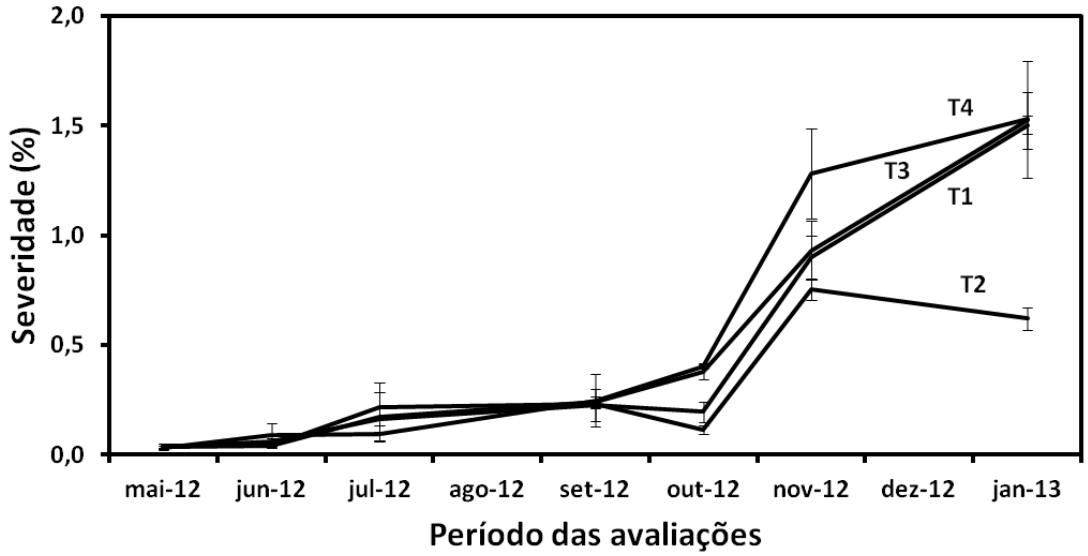

Figura 9 – Progresso da severidade (%) de mancha preta dos citros em frutos de laranjeira doce 'Pera' de maio/2012 a janeiro/2013 nos diferentes tratamentos para o manejo da mancha preta dos citros. T1 = poda de ramos secos + roçagem ecológica do mato; T2 = poda de ramos secos + rastelagem do mato e folhas cítricas; T3 = sem poda de ramos secos + roçagem ecológica do mato; T4 = sem poda de ramos secos + rastelagem do mato e folhas cítricas.

A análise da severidade pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) também mostra que o tratamento (T2) apresentou valor médio significativamente inferior aos valores dos demais tratamentos. Enquanto o tratamento T2 apresentou um valor de 24, os tratamentos T1, T3 e T4 apresentaram médias variando de 33 a 41 (Figura 10). Como ocorreu com os dados da AACPD, a severidade final da doença nos frutos de plantas do T2 apresentou valores significativamente inferiores aos dos demais tratamentos ($p > 0,05$).

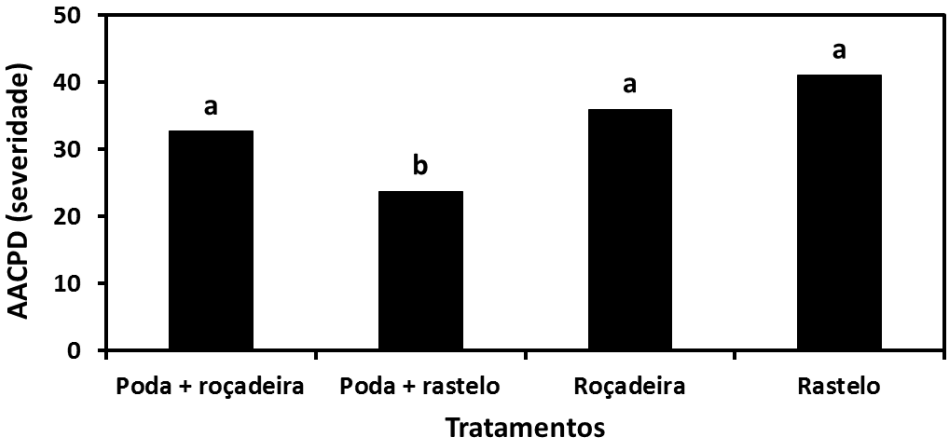

Figura 10 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em severidade (% de área lesionada no fruto) da mancha preta dos citros nas 7 avaliações nos diferentes tratamentos em pomar de laranjeira 'Pera', no município de Brotas. Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A variedade 'Pera' utilizada para este estudo produz frutos de meia estação e é considerada a principal variedade de citros do Brasil (Pio *et al*., 2005), sendo utilizada tanto para a industrialização por produzir um suco de qualidade quanto para consumo *in natura*. No presente trabalho, podemos verificar que, realizando o controle químico associado ao controle cultural com roçagem ecológica do mato nas entrelinhas, rastelagem das folhas cítricas caídas e/ou poda dos ramos secos de forma integrada, foi possível manter a MPC em baixos níveis (severidade média abaixo de 1,5%) até o mês de janeiro no pomar. Estas ações visaram interromper ou desacelerar o ciclo das relações patógeno-hospedeiro como descrito por (Kimati *et al*., 1996).

A cobertura morta proporcionada por roçadeira ecológica contribui para reduzir níveis de várias doenças, como mancha graxa e mancha preta, em que os esporos com importância epidemiológica (ascósporos) são produzidos em folhas caídas ao solo. A formação de cobertura morta sobre folhas cítricas infectadas no solo aceleram sua decomposição, diminuindo significativamente a produção e dispersão de ascósporos desses dois fungos e, consequentemente, diminuindo os níveis de doença (Laranjeira *et al*., 2005).

No trabalho realizado por Rossêtto (2009) foi observada uma redução significativa da intensidade da doença dos frutos com a realização do manejo do mato da entrelinha no pomar. Mas este autor menciona que o volume de biomassa depositado

sobre as folhas caídas é fundamental para o sucesso da operação. De acordo com este autor, pequenos volumes de massa verde/seca são produzidos nas entrelinhas dos pomares antes do início do florescimento e frutificação das plantas de citros, por isso, se torna importante o plantio de culturas intercalares produzindo mais massa vegetal para deposição sob a projeção da copa das laranjeiras. Nos casos em que não se consegue fazer o plantio de culturas intercalares e tenha pouca massa verde na entrelinha, a rastelagem das folhas manualmente, apesar de ser uma operação mais cara e morosa, pode proporcionar melhores resultados no controle da MPC uma vez que toda a fonte de inóculo foi retirada da área, diminuindo a possibilidade de ocorrer à liberação dos ascósporos.

Em nosso trabalho, o custo estimado para a operação de roçagem do mato com roçadeira ecológica foi de R$ 100,00 (1 hora máquina por ha). Para a retirada das folhas de laranjeira caídas com rastelo manual o gasto estimado foi de R$ 6,25 a hora/homen sendo necessário 30 horas homem por ha e custo total da operação de R$187,50 (Tabela 1). Esta rastelagem manual apesar de mais eficiente na redução da MPC nos frutos, apresentou um custo quase 2 vezes maior e um tempo gasto para a realização 30 vezes maior que a roçada ecológica, o que torna essa prática viável para pequenas áreas e inviável para grandes áreas.

Uma opção para substituir o rastelo manual em grandes áreas e aumentar a eficiência da operação é a utilização do rastelo mecânico associado a uma trincha, utilizando um trator. No trabalho realizado por Scalloppi *et al*. (2012), bons resultados no controle da doença foi obtido com este equipamento. Embora, o problema deste equipamento seria a utilização em áreas com sistema de irrigação por gotejamento, pois o rastelo pode causar danos ao sistema, além de ser um equipamento caro para ser utilizado em pequena escala de produção.

A prática do manejo de poda dos ramos secos foi eficiente quando associada ao uso da rastelagem das folhas caídas. A porcentagem de frutos sintomáticos em plantas podadas foi inferior ao observado nas plantas não podadas. Resultados semelhantes com o uso de poda foram obtidos por Nozaki (2007), que relacionou sintomas de falsa melanose à presença de galhos e ramos secos em plantas e, quando removidos mediante poda promoveram um maior controle da MPC. Para a realização da poda de ramos secos foram necessárias 68 horas homem por ha, com um custo de R$ 6,25 a hora/homen, o gasto total foi de R$ 425,00/ha (Tabela 1).

Na tabela 1, pode-se observar que as operações de manejo realizadas no tratamento (T2) foram mais caras em relação as operações de manejo nos demais tratamentos (T1, T3 e T4), mas o tratamento (T2) apresentou menor incidência e severidade da MPC e, com isto obteve uma maior produção de frutos sem sintomas ou com poucos sintomas, ambos com maior aceitação no mercado de frutas *in natura*. Para esta análise, foi considerada a produtividade média de 2,5 caixas por planta em todos os tratamentos. Este valor foi uma estimativa da produtividade do talhão em fevereiro de 2012 antes da ocorrência de uma chuva de granizo em julho que reduziu a produtividade média nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 para as médias de 1,35, 1,34, 1,39 e 1,51 caixas por planta, respectivamente. Como a chuva não atingiu a área de maneiro uniforme, estes valores reais de produtividade foram desconsiderados.

Tabela 1. Análise de custo da implementação das estratégias de manejo cultural da mancha preta dos citros em pomar de laranjeira doce 'Pera', em Brotas, SP.

Trat.	Custo do Manejo [1]				Produção *in natura* [2]	Produção indústria [2]	Renda *in natura* [3]	Renda indústria [3]	Renda total [4]	Lucro [5]
	Poda	Roçada	Rastelo	Total	(cx/ha)	(cx/ha)	(R$/ha)	(R$/ha)	(R$/ha)	(R$/ha)
T1	**425**	**100**	**-**	**525**	**749**	**271**	**9737**	**2710**	**12447**	**11922 b[6]**
T2	**425**	**-**	**188**	**613**	**928**	**92**	**12064**	**920**	**12984**	**12371 a**
T3	**-**	**100**	**-**	**100**	**778**	**242**	**10114**	**2420**	**12534**	**12434 a**
T4	**-**	**-**	**188**	**188**	**737**	**283**	**9581**	**2830**	**12411**	**12223 ab**

[1] Custo em reais de cada operação e custo total (1 R$ = 2,00 US$) para os diferentes tratamentos;
[2] Produção de frutos *in natura* (porcentagem de frutos com nota igual ou inferior a 2 (1,2% de área lesionada) de acordo com escala apresentada na Figura 4. Os demais frutos foram considerados como produção para a indústria. Foi considerada uma produtividade média de 1020 caixas de 40,8 kg por hectare que correspondeu a 2,5 caixas por planta.
[3] O valor da caixa para comércio *in natura* foi R$ 13,00 e para a indústria de suco em R$ 10,00;
[4] O rendimento foi calculado somando-se a renda obtida com a fruta *in natura* e fruta para a indústria;
[5] O lucro foi calculado pela renda total subtraindo-se o custo total do manejo do rendimento.
[6] Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Desta forma, ao analisar os custos das operações de manejo realizadas, a produção estimada e a receita obtida com a comercialização no mercado de frutas *in natura*, fica evidente que a decisão do produtor em utilizar estas operações não deve ser baseada apenas nos custos das mesmas, mas sim na relação custo-benefício e na redução do progresso da MPC.

Neste trabalho foi considerada uma produção de 1020 caixas de 40,8 kg/ha e R$3,00 de diferença pago pela caixa de frutas com maior aceitação para comercio *in natura* e, o retorno financeiro foi o mesmo para o tratamento com maior custo onde se

realizou a poda + a rastelagem (T2) e para o tratamento com o menor custo somente com a roçada ecológica. Entretanto, a incidência e a severidade no tratamento T2 foi significativamente inferior ao tratamento T3.

Vale ressaltar que, o valor pago pela caixa de frutos sem sintomas de MPC pode variar em função da disponibilidade da fruta nas diferentes épocas do ano. Em um ano com oferta maior de fruta, o mercado se torna saturado e a qualidade da fruta passa a ser o diferencial. Assim, ter baixa incidência de frutos com sintomas ou menor quantidade de área lesionada de frutos será determinante para a comercialização da fruta *in natura*.

De acordo com Spósito (2003), no Brasil a MPC pode apresentar crescimento rápido em uma área de um ano para o outro devido às condições favoráveis quando comparadas com outros países. Assim, a utilização do manejo cultural associado ao controle químico se torna uma ferramenta importante para reduzir o progresso da doença em uma área ao longo dos anos, por mais que a utilização do manejo cultural não apresente incremento de produção nas plantas quando a doença está em sua fase inicial.

É importante resaltar que, independente do destino final de comercialização dos frutos, um pomar com altos níveis de MPC pode iviabilizar o negócio, seja por baixa qualidade de fruta ou por aumento na queda prematura dos frutos. A ausência de integração de manejo, poderá acarretar aumento no número de pulverizações, justificando assim, a utilização das práticas de poda de ramos secos, rastelagem folhas cítricas, mesmo que estas apresentem um custo relativamente alto.

4.2 Monitoramento da presença de inóculo de *P. citricarpa* no pomar

A quantidade mínima de esporos presentes em uma amostra detectada por PCR convencional foi determinada para *P. citricarpa*. As folhas inoculadas com suspensão de esporos nas concentrações de 3.10^2, 3.10^3, 3.10^4 e 3.10^5 foram positivas para a detecção de *P. citricarpa* (Figura 11), resultando na amplificação de fragmento de DNA de tamanho esperado para *P. citricarpa* (Stringari *et al*., 2009).

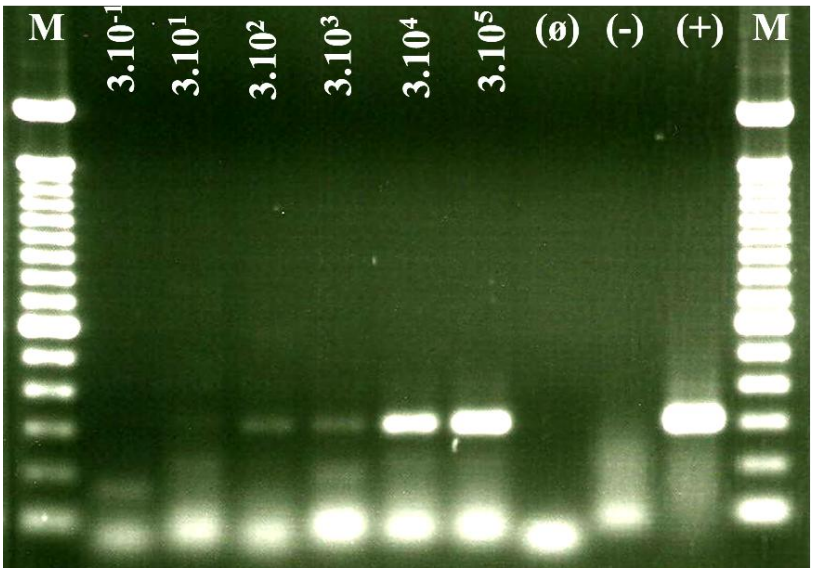

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado por PCR para a detecção do DNA de *P. citricarpa* em uma diluição seriada de conídios do fungo depositado em folha de laranjeira doce. (M) marcador de peso molecular DNA Ladder de 100 pb; (+) Controle positivo, DNA de *P. citricarpa*; (-) Controle negativo, DNA sadio de (*Citrus sinensis*); (ø) Controle negativo (reagentes); 3.10^{-1}, 3.10^{1}, 3.10^{2}, 3.10^{3}, 3.10^{4}, 3.10^{5} diferentes números de esporos de *P. citricarpa*.

A PCR é um método importante para o diagnóstico de fungos, devido à sua especificidade e sensibilidade. De acordo com Fungaro (2000), existem vários exemplos de testes baseados em PCR desenvolvidos para a detecção de fungos em plantas, alimentos e em patologia médica. Bonants *et al*. (2003) observou que a detecção de *P. citricarpa* com a PCR é 40-50% mais eficaz do que o método de incubação prescrita pela União Europeia para o diagnóstico de lesões suspeitas de MPC. Além de mais eficiente, o tempo de execução do teste é menor.

No mesmo pomar onde foi avaliado o impacto das formas de manejo na incidência e severidade da MPC, foi realizado o experimento para monitoramento da presença de inóculo de *P. citricarpa*. Apesar de ser considerado um pomar novo, apresenta histórico da presença da doença como visto anteriormente, a partir das avaliações realizadas no experimento conduzido com controle cultural da MPC.

A Figura 12 ilustra o resultado da PCR obtido com as amostras foliares das plantas iscas, onde todas foram negativas para detecção de *P. citricarpa*.

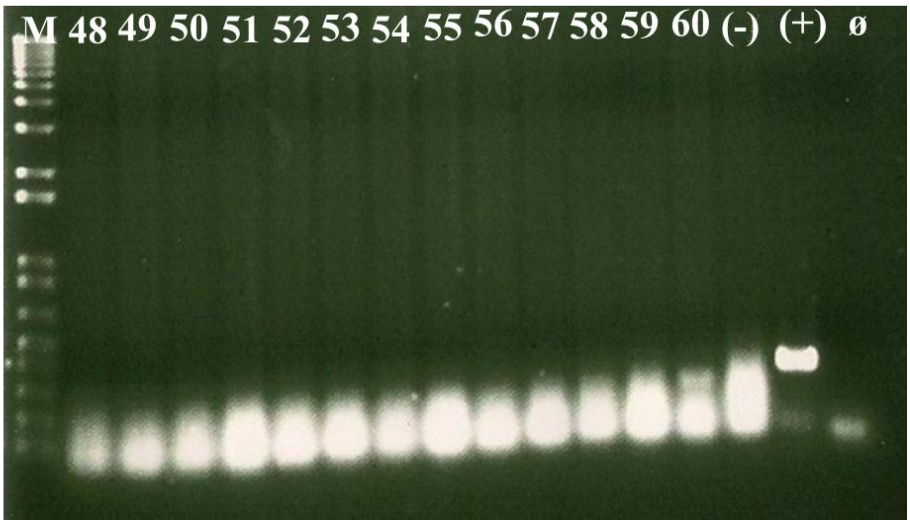

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado por PCR para a detecção de *P. citricarpa* nas amostras foliares 48 a 60, das mudas iscas. (M) marcador de peso molecular DNA Ladder de 1 kb; (+) Controle positivo, DNA de *P. citricarpa*; (-) Controle negativo, DNA sadio de (*Citrus sinensis*); (ø) Controle negativo (reagentes).

A não obtenção de plantas PCR positivas pode ter ocorrido: i) por realmente não existir o patógeno nas amostras coletadas; ii) o fungo estaria presente nas mudas iscas, mas não na porção de folha analisada e; iii) a eficácia do método de PCR convencional pode não ter sido suficiente para detectar baixas quantidades de inóculo, conforme mostrado na Figura 11 onde foram necessários pelo menos 300 conídios para detecção por este método. Além desses fatores, a detecção de *P. citricarpa* via PCR convencional foi de aproximadamente 60-70% para as lesões de MPC sem picnídios, e aproximadamente 90% para as lesões com picnídios (Bonants *et al*., 2003).

As condições climáticas necessárias para ocorrer à infecção, como a presença de água livre por períodos superiores há 24 horas (Timmer, 1999), a alternância de períodos secos e úmidos, uma situação frequentemente observada durante a estação chuvosa do ano (Reis, 2001) e a disponibilidade de inóculo (Kotzé, 1988). Todos esses fatores essenciais para o desenvolvimento do patógeno foram observados durante o experimento.

Os períodos em que os 10 lotes de mudas iscas de laranjeira doce foram levadas a campo com as respectivas precipitações pluviométricas observadas estão descritos na Figura 13.

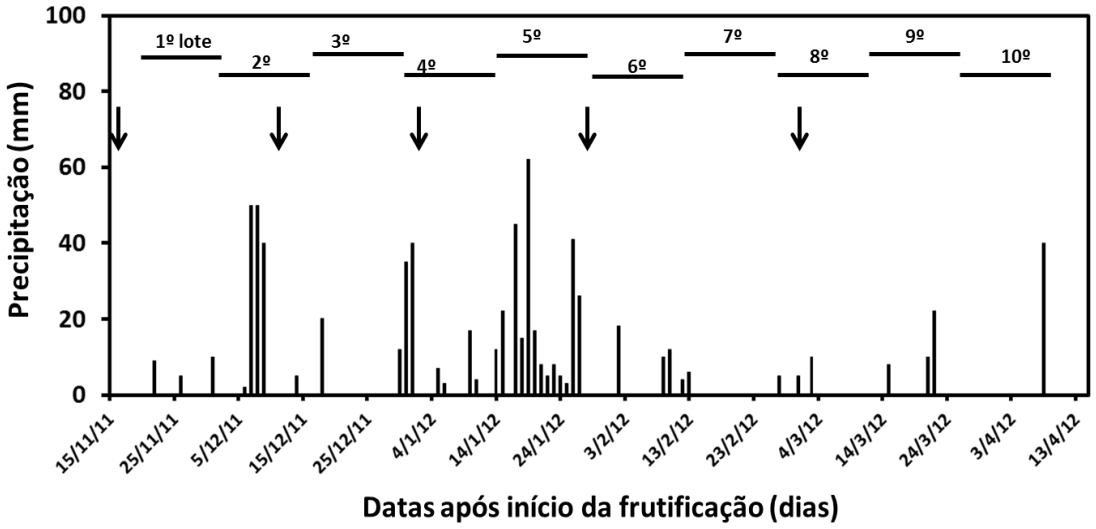

Figura 13 – Período de permanência dos 10 lotes de mudas iscas no campo, os dias de pulverização representados pelas setas e precipitação pluviométrica na área experimental.

Alcoba *et al.* (2000) relatou que a disponibilidade de ascósporo depende, entre outros fatores, do momento da desfolha e do tempo de decomposição das folhas, estando diretamente relacionada com a temperatura e as precipitações. Spósito (2007) mostrou que conídios dispersos por água são responsáveis pelo incremento da doença no interior da copa. Portanto, os lotes de mudas levados para o campo no mês de janeiro (4º e 5º lotes) foram os que ficaram mais expostos às condições favoráveis para a produção de inóculo de *P. citricarpa*. Em um trabalho similar a este realizado com mudas iscas de limoeiro verdadeiro (*Citrus limon*) mantidas em pomar de limão em Barretos/SP no mesmo ano, foi observada PCR positiva nos períodos de exposição no mês de janeiro (Pivello, 2013, Comunicação pessoal).

Esta metodologia se mostrou eficiente para detectar o fungo em folhas de laranjeira inoculadas artificialmente. Entretanto, no campo não foi possível obter amostras positivas. Novos trabalhos deverão ser conduzidos com a utilização de adaptações da técnica de PCR, como exemplo, a PCR em tempo real, a fim de aumentar a sensibilidade e quantificar o inóculo nas diferentes épocas do ano. A partir disso, será possível associar a quantidade de inóculo as condições climáticas e estabelecer o melhor programa de manejo da mancha preta dos citros, com maior ênfase na otimização do controle químico.

5 CONCLUSÃO

O uso da poda de ramos secos (poda de limpeza) associada à rastelagem de folhas cítricas caídas foi mais eficiente em reduzir a incidência e a severidade da mancha preta dos citros em pomar de laranjeira doce, nas condições deste trabalho.

As operações de poda de ramos secos e rastelagem de folhas caídas, apesar de serem onerosas, reduziram a incidência e severidade da MPC nos frutos proporcionando assim, melhores condições para o comércio *in natura*.

A concentração mínima de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em folhas de laranja doce necessária para a detecção com a PCR foi de 300 conídios.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, R.L., Scaloppi, E.M.T., Goes, A. de, Spósito, M.B. 2012. Período de incubação de *Guignardia citricarpa* em diferentes estádios fenológicos de frutos de laranjeira 'Valência'. **Tropical Plant Pathology** 37(2):155-158.

Aguilar-Vildoso, C.I., Ribeiro, J.G.B., Feichtenberger, E., Goes, A. de, Spósito, M.B. 2002. **Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros.** Brasília. MAPA/DAS/DDIV. 72 p.

Alberts, B., Lewis, J., Ralf, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. **Molecular Biology of the Cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing. 1294 p.

Alcoba, N.J., Vigiani, A.R., Bejarano, N.V., Alvarez, S.E., Serrano, M.A., Bonillo, M.C. 2000. **Mancha negra de los cítricos:** epidemiologia y control. San Salvador de Jujuy. Ediciones Universidad Nacional de Jujuy. p. 56.

Baldassari, R.B.,Wickert, E., Goes, A. de. 2008. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. **European Journal of Plant Pathology** 120:103-110.

Bellotte, J.A.M., Kupper, K.C., Rinaldo, D., Souza, A., Pereira, F.D. & Goes, A. 2009. Acceleration of the decomposition of Sicilian lemon leaves as an auxiliary measure in the control of citrus black spot. **Tropical Plant Pathology** 34(2):71-76.

Bellotte, J.A.M., Kupper, K.C., Rinaldo, D., Souza, A., Goes, A. 2013. Efeito de cultivos intercalares nas entrelinhas dos citros na liberação de ascósporos de *Guignardia citricarpa* e na ocorrência da mancha preta dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura** 35(1):102-111.

Bergamin Filho, A. 1995. Curvas de progresso da doença. In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres. p.602-626. v.1

Blanco C. 1999. *Guignardia citricarpa* Kiely: analise genética, cariotipica e interação com o hospedeiro. **Tese Doutorado**. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

Bonants, P.J.M., Carroll, G.C., Weerdt, M., Brouwershaven-Van, I.R., _Baayen, R.P. 2003. Development and Validation of a Fast PCR-Based Detection Method for Pathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology** 109:503-513.

Carvalho, J.E.B. de, Neves, C.S.V.J., Menegucci, J.L.P., Silva, J.A.A. da. 2005. Práticas Culturais. In: Mattos Jr, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M. & Pompeu Junior, J. (Eds). **Citros**. Campinas. Instituto Agronômico e Fundag. cap. 21. p.449- 482.

Cepea. 2013. **Seres Mensais**. ESALQ-USP. Disponível em: < www.cepea.esalq.br/citros/?page=707>. Acesso em: 20 jun. 2013.

Doidge, E.M. 1929. Some diseases of citrus prevalent in South Africa. **South African Journal of Science** 26:320-325.

Eça, L.P. 2004. **Biologia Molecular**: guia prático e didático. Rio de Janeiro: Revinter. p. 262.

Emdagro – Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe. **Estado em alerta contra a pinta preta do citros.** Disponível em:<http://www.emdagro.se.gov.br/modules/news/article.php?storyid=536>. Acesso em: 22 mai. 2013.

Feichtenberger, E. 1996. Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja** 17:93-108.

Feichtenberger, E., Muller, G.W., Guirado, N. 1997. Doenças dos citros. In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**.3. ed...São Paulo: Agronômica Ceres.p.247-280. v. 2

Fourie, P., Schutte, T., Serfontein, S., Swart, F. 2013. Modeling the Effect of Temperature and Wetness on *Guignardia* Pseudothecium Maturation and Ascospore Release in Citrus Orchards. **Ecology and Epidemiology** 103(3):281-292.

Fundecitrus. 2008. **Manual de pinta preta**. Araraquara SP. Fundo de Defesa da Citricultura. 11 p. (Manual técnico).

Fungaro M.H.P. 2000. PCR na Micologia. **Bio Tecnologia Ciência & Desenvolvimento** 14:12-16.

Goes, A. de, Feichtenberger, E. 1993. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (M_cAlp.) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** 18:138.

Goes, A. de, Almeida, T.F. 2007. Atualização em Pinta Preta. **Citricultura Atual** 61:14-15.

Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) 1996. **Manual de fitopatologia**. Princípios gerais de controle. São Paulo: Ceres. 704 p. v. 1.

Klotz, L.J. 1978. Fungal, bacterial and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard. In: Reuther, W., Calavan, E.C. & Carman, G.E. (Eds.) **The Citrus Industry**. University of California. p.1-66.

Kotzé, J.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease** 65(12)945-950.

Kotzé, J.M. 1988. Black spot. In: Whiteside, J.O., Garnsey, S.M. & Timmer, L.W. (Eds.). **Compendium of Citrus Diseases**. Saint Paul: APS Press. p.10-12

Laranjeira, F.F., Amorim, L., Filho, A.B., Vildoso, C.I.A., Filho, H.D.C. 2005. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Mattos Jr, D. de, De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Jr, J. (Eds). **Citros**. Campinas SP. Instituto Agronômico e Fundag. p. 511-566.

Mapa – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:< http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18888>. Acesso em: 22 mai. 2013.

Mconie, K.C. 1964. The latent occurrence in *Citrus* and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology** 54: 40-43.

Murray M.G., Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weigth plant DNA. **Nucleic Acids Research** 8(19):4321-4325.

Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto SP. Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia. 137 p.

Nozaki, M.H. 2007. Produção de estruturas reprodutivas e efeito do ambiente nos tipos de sintomas produzidos por *Guignardia citricarpa* em *Citrus* spp. **Tese Doutorado**. Jaboticabal SP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

Paul, I., Van Jaarsveld, A.S., Korsten, L., Hattingh, V. 2005. The potencial global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by Guignardia citricarpa (Kiely): likelihood of disease establishment in the European Union. **Crop Protection** 24:297-308.

Peres, N.A., Harakava, R., Carroll, G.C., Adaskaveg, J.E., Timmer, L.W. 2007. Comparison of Molecular Procedures for Detection and dentification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. **Plant Disease** 91(5): 525-531.

Pio, R.M., Figueiredo, J.O. de, Stuchi, E.S., Cardoso, S.A. de B. 2005. Variedades copas. In: Mattos Jr, D. de, De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Jr, J. (Eds). **Citros**. Campinas SP. Instituto Agronômico e Fundag. p. 37-60.

Reis, R.F. dos 2001. Influência de controle e de fatores climáticos na produção e liberação de ascósporos de *Guignardia citricarpa*, em pomares de laranjeiras 'Natal' e 'Valência'. **Dissertação Mestrado**. Jaboticabal SP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

Robbs, C.F. 1990. A Mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja** 11:87- 95.

Rodrigues M.B.C., Andreote F.D., Spósito M.B., Aguillar-Vildoso C.I., Araújo W.L., Pizzirani-Kleiner A.A. 2007. Resistência a benzimidázois por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42:323-327.

Rossetti, V. (Ed.) 2001. Mancha preta ou pinta preta. **Manual Ilustrado de Doenças dos Citros.** Piracicaba SP. Fealq/Fundecitrus. 207 p.

Rossêtto, M.P. 2009. Resistência varietal e manejo da mancha preta dos citros. **Dissertação Mestrado**. Campinas SP. Instituto Agronômico de Campinas.

Scaloppi, E.M.T. 2010. Mancha preta dos citros: técnicas de manejo e queda precoce de frutos. **Tese (Doutorado)**. Jaboticabal SP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

Scaloppi, E.M.T., Aguiar, R.L., Goes, A. de, Spósito, M.B. 2012. Efeito do manejo cultural e químico na incidência e severidade da mancha-preta dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura** 34(1):102-108.

Schubert, T.S., Dewdney, M.M., Peres, N.A., Palm, M.E., Jeyaprakash, A., Sutton, B., Mondal, S.N., Wang, N.Y., Rascoe, J., Picton, D.D. 2012. First Report of *Guignardia citricarpa* Associated with Citrus Black Spot on Sweet Orange (*Citrus sinensis*) in North America. **Plant Disease** 96(8):1225.

Schutte, G.C., Kotzé, J.M. 1997. Grass mulching as part in integrated control programme for the control of citrus black spot. **Citrus Journal** 7:18-20.

Silva-Junior G.J., Pereira R.G., Marin D.R., Wulff N.A., Scapin M.S., and Sala I. 2012. First report of false melanose symptoms of Citrus Black Spot on sweet orange leaves in Brazil. In: **XII International Citrus Congress**, International Society of Citriculture (ISC), Valencia, Spain. p. 260.

Spósito, M.B. 2003. Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. **Tese Doutorado**. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

Spósito, M.B., Amorim, L., Junior, J.B., Bassanezi, R.B., Aquino, R. de. 2004. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira** 29(1):81-85.

Spósito, M.B., Amorim, L., Ribeiro, P.J., Bassanezi, R.B., Krainski, E.T. 2007. Spatial Pattern of Trees Affected by Black Spot in Citrus Groves in Brazil. **Plant Disease** 91(1): 36-40.

Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Bergamin Filho, A. & Hau, B. 2008. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. **Plant Pathology** 57:103-108.

Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Felippe, M.R. & Czermainski, A.B.C. 2011. Relative importance of inoculum sources of Guignardia citricarpa on the citrus black spot epidemic in Brazil. **Crop Protection** 30:1546-1552.

Stringari, D., Glienke, C., Christo, D. de, Maccheroni Jr, W., Azevedo, J.L. de. 2009. High Molecular Diversity of the Fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and New Primers for the Diagnosis of the Citrus Black Spot. **Brazilian Archives Of Biology And Technology** 52:1063-1073.

Teixeira D.C., Danet J.L., Eveillard S., Martins E.C., Jesus Junior W.C., Yamamoto P.T., Lopes S.A., Bassanezi R.B., Ayres A.J., Saillard C & Bové J.M. 2005. Citrus huanglongbing in São Paulo state, Brazil: PCR detection of the "Candidatus" Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes** 19:173-179.

Timmer, L.W. 1990. "Blight"- Uma doença infecciosa dos citros. Anais, **Seminário Internacional sobre porta-enxertos de Citros**, Bebedouro SP. p.195-209.

Timmer, L.W. 1999. Diseases of fruit and foliage. In: Timmer, L.W., Duncan, L.W. (Ed.). **Citrus health management**. Florida US. APS Press. p.107-123.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkoswski, J., Zoller, M. 1992. **Recombinant DNA** 2. ed. New York. Freeman and Company. 626 p.