

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

MARCOS ALEXANDRE PIVELLO

**Detecção de *Phyllosticta citricarpa* em folhas e manejo da mancha
preta dos citros em limão verdadeiro**

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

Orientador: Dr. Geraldo José da Silva Junior

Coorientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Araraquara
Julho-2013

MARCOS ALEXANDRE PIVELLO

**Detecção de *Phyllosticta citricarpa* em folhas e manejo da mancha
preta dos citros em limão verdadeiro**

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

Orientador: Dr. Geraldo José da Silva Junior
Coorientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Araraquara
Julho-2013

MARCOS ALEXANDRE PIVELLO**Detecção de *Phyllosticta citricarpa* em folhas e manejo da mancha preta dos citros em limão verdadeiro**

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

Araraquara, 10 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior (orientador)
Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP

Prof. Dr. Nelson Arno Wulff (coorientador)
Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP

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

DEDICO

Aos meus pais, ***Vitalino Pivello*** e ***Benedita Cleide Marques Pivello*** e ao meu irmão ***José Carlos***,

Por seus exemplos de força, confiança, persistência, por ensinar que aprender nunca é demais, por ensinar que a vida é repleta de obstáculos e desafios a serem superados sem desânimo e sem jamais pensar em desistir. Por estarem sempre próximos em todos os momentos de minha vida, apoiando, incentivando e mostrando que todo esforço, por mais árduo que seja, vale a pena.

OFEREÇO

À Monisa, pelo companheirismo, amizade, confiança, dedicação, incentivo, amor e apoio que me proporcionou em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a **Deus**, por me dar forças, coragem, serenidade para cumprir mais uma etapa desta jornada em minha vida.

À Empresa Sucocítrico Cutrale por proporcionar a oportunidade de realizar este curso de pós-graduação, o qual agregou muito em minha formação profissional, através do Diretor Agrícola Valdir Guessi, dos Gerentes de Produção Rogério Visconti Vieira, Marco Antonio Marchesi, Antonio Ricardo Violante e do Gerente Regional Luiz Basílio Gil Cruz.

Aos Professores Dr. Geraldo José da Silva Junior e Dr. Nelson Arno Wulff pela orientação, atenção, dedicação, paciência e empenho. Pela amizade, não medindo esforços para o bom desempenho e aprendizado durante todo o tempo.

Ao Administrador Kleber Teixeira da Silva, ao Engenheiro Agrônomo Fábio Gimenez do Amaral e ao Técnico Agrícola Alessandro Maciel Vaz pela colaboração, auxílio, amizade e empenho para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, junto com todos os funcionários que colaboraram, em especial a Amanda Cristina Gonçalves de Oliveira, Denis Rogério Marin, Rosana Gonçalves Pereira, que auxiliaram em todas as avaliações no decorrer do trabalho.

Ao professor Dr. José Belasque Junior e ao Engenheiro Agrônomo Marcelo S. Scapin pelo auxílio e orientação nas análises dos dados obtidos no decorrer do trabalho.

Aos funcionários da Fazenda Guanabara, pela imprescindível colaboração na condução deste trabalho no campo.

Aos demais colaboradores da fazenda que ajudaram durante a montagem e condução do experimento, sem as quais impossibilitaria o desenvolvimento do mesmo.

Ao pesquisador Eduardo Feichtenberger do APTA-Sorocaba/SP pela contribuição na realização dos testes de indução no Laboratório de Sanidade Vegetal “Dra Victoria Rossetti”.

A todas as pessoas que colaboraram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1 Introdução.....	1
2 Revisão de literatura.....	4
2.1 Considerações sobre Limão Verdadeiro (<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.).....	4
2.2 Histórico da mancha preta dos citros	5
2.3 Etiologia e epidemiologia da mancha preta dos citros.....	5
2.4 Sintomatologia da mancha preta dos citros.....	7
2.5 Manejo da mancha preta dos citros	8
3 Material e Métodos.....	12
3.1 Detecção de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em folhas de limão verdadeiro e utilização de mudas como armadilha para monitoramento de inóculo no campo	12
3.2 Efeitos de diferentes estratégias de manejo sobre o controle da mancha preta dos citros em pomar comercial de limão verdadeiro.	15
4 Resultados e Discussão	20
4.1 Detecção de <i>P. citricarpa</i> em folhas de limão verdadeiro e utilização de mudas como armadilhas para monitoramento de inóculo no campo.....	20
4.2 Efeito de diferentes estratégias de manejo sobre o controle da mancha preta dos citros em pomar comercial de limão verdadeiro.	23
5 Conclusões.....	34
Referências Bibliográficas	35

Detecção de *Phyllosticta citricarpa* em folhas e manejo da mancha preta dos citros em limão verdadeiro

Autor: Marcos Alexandre Pivello

Orientador: Dr. Geraldo José da Silva Junior

RESUMO

O estado de São Paulo é o maior produtor nacional de limão, com aproximadamente 70% da produção, 853 mil toneladas da fruta. Dentre os fatores que afetam a sua produção, destaca-se a mancha preta dos citros (MPC), causada por *Phyllosticta citricarpa*, que provoca queda prematura e depreciação dos frutos para o comércio *in natura*. O manejo da MPC é realizado pela integração de diferentes estratégias como o controle químico, cultural, biológico e físico. O trabalho teve por objetivos: i) validar uma metodologia de detecção de *P. citricarpa* em folhas de limão verdadeiro e; ii) avaliar diferentes tipos de poda, manejo do mato, agentes de decomposição de folhas ou inibidores da liberação de ascósporos em conjunto com o controle químico no manejo da MPC em pomar de limão verdadeiro. Em casa-de-vegetação, folhas de limão foram inoculadas com diferentes concentrações de esporos (10^1 a 10^5 conídios.mL⁻¹) de *P. citricarpa* e analisadas por PCR. No campo, mudas de limão foram utilizadas como armadilha para capturar esporos por períodos de aproximadamente 10 dias de outubro de 2011 a março de 2012 e, em seguida as folhas foram coletadas e analisadas por PCR. O experimento de manejo da doença foi conduzido em pomar comercial de limão verdadeiro “Eureka” no município de Barretos, SP. A área foi dividida em duas, com roçada convencional ou ecológica do mato. Em cada área as podas foram feitas de 3 tipos: i) convencional, ii) convencional + ramos secos ou, iii) convencional + ramos secos + remoção drástica no topo) e 4 tratamentos nas folhas caídas no solo: i) água, ii) ureia, iii) cloreto benzalcônio ou, iv) *Trichoderma harzianum*. O controle químico com fungicidas foi realizado em toda a área. Avaliou-se a incidência e a severidade da MPC em frutos e folhas e a produção de frutos. Foi possível detectar *P. citricarpa* por PCR nas folhas de limão inoculadas com 3000 conídios. As folhas das mudas armadilhas apresentaram PCR positiva apenas no mês de janeiro de 2012. Dentre os tratamentos avaliados, o controle da MPC foi mais eficiente e a produtividade das plantas foi maior nas áreas onde se utilizou a roçadeira ecológica. Os três tipos de podas apresentaram resultados variáveis quanto ao controle da MPC. Os produtos aplicados nas folhas não apresentaram efeito na redução da MPC.

Palavras-chave: *Citrus limon*, armadilha de esporos, controle cultural, poda, roçadeira ecológica.

Detection of *Phyllosticta citricarpa* on lemon leaves and citrus black spot management in lemon orchard

Author: Marcos Alexandre Pivello
Advisor: Dr. Geraldo José da Silva Junior

ABSTRACT

São Paulo State is currently the largest Brazilian lemon producer, with 70% of production (853 000 tons). Among the factors affecting its production, there is a citrus black spot (CBS), caused by *Phyllosticta citricarpa*, which provokes the premature fruit drop and depreciation for fresh fruit market. CBS management is performed by integration of different control strategies such as chemical, cultural, biological and physical. Thus, this study aims to: i) validate a methodology for *P. citricarpa* detection in lemon leaves and, ii) evaluate different types of pruning, weed management, lemon leaf decomposition agents or ascospores release inhibitors along with chemical control for CBS management on lemon orchard. In greenhouse, lemon leaves were inoculated in different *P. citricarpa* conidia concentrations (10^1 - 10^5 conidia.mL⁻¹) and analyzed by PCR. In orchard, the young lemon trees were used to capture spores for 10-day periods from October 2011 to March 2012, and then the leaves were collected and analyzed by PCR. The CBS management field trial was carried out in a Eureka lemon orchard in the municipality of Barretos, São Paulo, Brazil. The area was divided into two parts, with conventional or ecological mowing. In each mowing area three types of pruning were done: i) conventional pruning, ii) conventional + dried twigs pruning or, iii) conventional + dried twigs + top drastic removal pruning. In each pruning area four products were sprayed on lemon fallen leaves: i) water, ii) urea, iii) benzalconic chloride or, iv) *Trichoderma harzianum*. Chemical control with fungicides was performed in all area. CBS incidence and severity were evaluated in fruits and leaves and the yield was evaluated per tree. It was possible to detect *P. citricarpa* by PCR on lemon leaves inoculated with 3000 conidia. The *P. citricarpa* positive PCR was obtained only in young lemon trees kept in the orchard in January 2012. Among the treatments evaluated, the CBS control was more efficient and yield was higher in areas where the ecological mowing was used. The three types of pruning showed variable results for CBS control. The products applied on fallen lemon leaves showed no effect in reducing CBS.

Keywords: *Citrus limon*, spore trap, cultural control, pruning, ecological mowing.

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria cítrica brasileira destaca-se por ser responsável por 60% da produção mundial de suco. O Brasil colheu na safra 2011/2012 mais de 19 milhões de toneladas de laranja, o que equivale a um terço da produção mundial (FNP, 2013). Além da laranja o Brasil em 2011 produziu aproximadamente 1,1 milhões de toneladas de limão. Essa estimativa de produção de limão inclui as frutas cítricas com suco muito ácido, nela estão incluídos tanto os limões verdadeiros (*Citrus limon*) quanto às limas ácidas “Tahiti” (*Citrus latifolia*) e “Galego” (*Citrus aurantifolia*) (IEA, 2013). A área colhida de limão nesta safra foi de 47 mil hectares. O Estado de São Paulo, assim como na produção de laranja, destaca-se como o maior produtor nacional de limão, com aproximadamente 70% da produção brasileira, representando 853 mil toneladas da fruta em uma área de 28,8 mil hectares (BRASIL, 2013a).

Apesar desta importância para o setor agrícola nacional, a citricultura passa por grandes dificuldades, principalmente relacionada a doenças, dentre elas, destacam-se o *huanglongbing* (HLB) causado por *Candidatus Liberibacter* spp, o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, a clorose variegada dos citros (CVC) causado pela bactéria *Xylella fastidiosa* e a pinta preta ou mancha preta dos citros (MPC). A MPC, causada pelo fungo *Phyllostica citricarpa* McAlp (teleomorfo: *Guignardia citricarpa* Kiely), foi constatada no estado de São Paulo na década de 90 afetando limões verdadeiros e laranjeiras de maturação tardia na região do município de Conchal (Goes & Feichtenberger, 1993).

Dentre os danos causados pela MPC, destaca-se a queda prematura de frutos que pode causar reduções severas na produtividade, a comercialização de frutos *in natura* de limões verdadeiros e laranjas que é prejudicada devido à presença de sintomas MPC nos mesmos, sendo o agente causal uma praga quarentenária do tipo A1 na União Europeia, o que restringe a entrada de frutos sintomáticos nestes países considerados livres desta doença (Mendes & Freitas, 2005).

A MPC produz dois tipos de inóculos (esporos), a fase perfeita (sexuada) produz os ascósporos e a fase imperfeita (assexuada) produz os conídios (Kotzé, 1981). Os ascósporos são formados em folhas cítricas infectadas em decomposição no solo, quando maduros são ejetados sendo dispersos pelo vento, infectando ramos, frutos e folhas da mesma planta ou de plantas vizinhas (Kotzé, 1981; Spósito, 2003; Spósito et al., 2007, 2008, 2011). Em frutos, folhas e ramos secos são formadas lesões que podem produzir em seu interior os conídios, estes são dispersos a curta distância pela água de chuva, orvalho ou irrigação, podendo

infectar novos ramos, folhas e frutos, principalmente os localizados abaixo da fonte de inoculo, aumentando a doença na planta (Spósito, 2003; Spósito et al., 2011).

O controle da MPC é baseado principalmente na eliminação, supressão da formação ou impedindo a disseminação e posterior infecção destes dois tipos de inóculo, conídios e ascósporos (Scaloppi, 2010). O controle dos ascósporos pode ser feito por meio da redução da queda de folhas, aceleração da decomposição das folhas caídas no solo, barreira física com o manejo do mato da entrelinha que dificulta a liberação e dispersão ou remoção dessas folhas caídas (Almeida, 2009; FUNDECITRUS, 2008).

O manejo do mato nas entrelinhas com o uso da roçadeira ecológica apresentou bons resultados na redução da severidade da doença. Esta roçadeira lança a massa de mato cortada sob a copa das plantas, formando uma barreira física sobre as folhas cítricas caídas que produzem os ascósporos (Rôssetto, 2009).

O uso de decompositores de folhas, como a uréia entre outras formulações aplicadas através de equipamentos como barras de herbicidas são técnicas que agregam no manejo da doença visando o controle de ascósporos. No trabalho realizado por Bellotte (2006) foi observado redução significativa da severidade da doença utilizando como decompositores de folhas a uréia, nitrato de cálcio, calcário dolomítico, microorganismos eficazes e outros produtos comerciais.

O controle da fase imperfeita (conídios) leva em consideração as lesões formadas em ramos secos, folhas e frutos e basicamente é realizado por meio do controle químico com fungicidas visando à proteção dos frutos e com poda de ramos secos das plantas que reduzem a quantidade de ramos secos nas plantas (Scaloppi, 2010). A poda para o manejo de doenças é uma importante medida sanitária, onde são removidos da planta tecidos mortos, nos quais são produzidos conídios, que são possíveis focos de infecção da doença (Rôssetto, 2009).

A MPC é uma doença com controle complexo, em algumas áreas o controle químico tem sido utilizado como estratégia única no manejo da doença. Em limão verdadeiro, o controle da MPC se torna difícil devido a diferentes fatores tais como: floradas desuniformes sendo necessário um maior número de pulverizações para proteção dos frutos, queda intensa de folhas contribuindo para o aumento da produção de ascósporos, grande quantidade de ramos secos contribuindo para a produção de conídios e freqüente formação de lesões em folhas.

As pulverizações ainda são realizadas por meio do sistema calendário em função de ainda não existir uma metodologia eficiente para a quantificação dos dois tipos de inóculo

(conídios e ascósporos) no campo. As armadilhas caça-esporos são utilizadas para este fim, mas quantificam apenas os ascósporos do fungo, pois os conídios não são disseminados pelo vento. Entretanto, essas armadilhas têm o inconveniente de detectar ascósporos de *G. citricarpa* e também de outra espécie não patogênica de *Guignardia*, pois ambas apresentam ascósporos indistinguíveis (Fourie et al., 2013). O emprego de outras estratégias de manejo como o controle cultural, físico ou biológico em conjunto com o controle químico tem sido essencial para reduzir os danos causados por esta doença.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivos: i) validar metodologia de detecção de conídios e ascósporos de *G. citricarpa* conjuntamente no campo, em folhas de limão verdadeiro e; ii) avaliar o efeito de diferentes estratégias de manejo sobre o controle de MPC em pomar comercial de limão verdadeiro, utilizando diferentes tipos de podas, de manejo do mato e agentes de decomposição de folhas ou inibidores da liberação de ascósporos em conjunto com o controle químico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre Limão Verdadeiro (*Citrus limon* (L.) Burm. f.)

De origem controversa relacionada à sua taxonomia e história, acredita-se que o limão verdadeiro seja originário do Himalaia, daí levado para Europa nas épocas das cruzadas religiosas (Webber, 1943) e para a América foi trazido pelas expedições de Colombo em 1493 (Tolkowsky 1938; Sinclair 1984 apud Pio et. al., 2005).

Como característica da planta do limoeiro, apresenta hábito de crescimento ereto, com bastante vigor que exige podas das plantas, normalmente após o sétimo ano de cultivo do pomar. Os frutos apresentam formato oblongo-elipsóide, variando o tamanho de acordo com a variedade, e quando maduros ficam com a coloração da casca amarela (Donadio et. al., 1995). A massa dos frutos varia de 120 a 220g, o teor de suco entre 45 e 55%, os sólidos solúveis em torno de 9% e a acidez em torno de 5,5% (Cardoso, 1998).

Os limões estão adaptados a regiões de clima sub-tropical com temperaturas médias inferiores a 20°C. Em regiões com maiores amplitudes térmicas o florescimento pode ser desuniforme propiciando a colheita durante todo o ano (Coggins, 1984). Normalmente, a época de colheita para estas variedades de limão concentra-se da segunda quinzena do mês de abril até a primeira quinzena do mês de agosto (Pio et al., 2005).

Entre as variedades mais cultivadas no mundo destaca-se a Eureka, Femminello, Genova, Lisboa, Siciliano, Monachello, Vilafranca, Interdonato, Verna (Sinclair 1984; Saunt 1990 apud Pio et. al., 2005). No Brasil as variedades que vem sendo mais cultivadas são o Eureka, Femminello, Genova e Lisboa (Pio et. al., 2005). Estas variedades apresentam como características:

- (i) *Eureka* – atualmente a variedade mais cultivada no Brasil. Comparada com a variedade Lisboa, apresenta plantas com menor porte, menos enfolhadas e com poucos espinhos, os frutos em sua maior parte são distribuídos na parte externa da planta;
- (ii) *Femminello* – esta variedade apresenta como principal característica plantas com porte vigoroso, produtivas e com varios fluxos de florescimento, o fruto apresenta tamanho médio e casca grossa;
- (iii) *Lisboa* – apresenta plantas com porte médio a elevado, com muitos espinhos e folhagem densa, os frutos estão distribuídos na parte interna da copa da planta e compardo com os frutos da variedade Eureka, apresenta casca ligeiramente mais rugosa;
- (iv) *Genova* – apresenta plantas com porte menor que as variedades anteriores, com pouco espinho e folhagem abundante, o fruto é formato mais arredondado e textura macia.

No estado de São Paulo os plantios localizados nas regiões mais ao sul podem ser afetados por geadas, uma vez que os limões são muito sensíveis a temperaturas muito baixas. Por outro lado, os plantios localizados mais ao norte do estado apresentam plantas com maior vigor e menor longevidade, sendo mais atacados por pragas (Pio et al., 2005).

2.2 Histórico da mancha preta dos citros

A MPC dos citros é uma doença de relevante importância econômica para os países produtores de citros, destacando entre eles o Brasil, Argentina na região de Tucuman, importante produtora de limão, África do Sul, China e Austrália (Laranjeira et. al., 2005). O primeiro relato da doença ocorreu em 1895 na Austrália causando grandes perdas na produção de frutos de laranja doce (Sutton & Waterston, 1966). Em 1925 a doença foi relatada na África do Sul (Doidge, 1929). Posteriormente, a MPC foi relatada em vários outros países da África, Ásia e América do Sul, incluindo importantes produtores como China, Argentina, Uruguai e Brasil (Spósito, 2003). Em 2010 a doença foi relatada na Flórida nos Estados Unidos (Schubert et al., 2012)

No Brasil, foram nos estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo os primeiros relatos da doença (Laranjeira et. al., 2005). A doença está presente em todos os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Costa et. al., 2003; Andrade et. al., 2004; Baldassari et. al., 2004; Theodoro et. al., 2004 e Caixeta et. al., 2005) citados por Scaloppi (2010). Na região Norte está presente em Rondônia e no Amazonas (Gasparotto et al., 2004). Em 2012 a doença foi relatada no estado da Bahia na região Nordeste do Brasil (Silva et al., 2012).

2.3 Etiologia e epidemiologia da mancha preta dos citros

O agente causal da MPC, o fungo *Phyllosticta citricarpa* McAlpine, tem como forma sexuada o fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, que pertence ao filo ascomiceto (Kiely, 1949; Baayen et al., 2002). Esse fungo produz dois tipos de inóculos, na fase perfeita produz os ascósporos e na fase imperfeita produz os conídios (Kotzé, 1981; McOnie, 1964).

A detecção e confirmação da *G. citricarpa* como agente causal pode ser realizada por meio de técnicas convencionais de cultivo em meio de cultura e análise em microscópio. Entretanto, existe uma espécie endofítica de *Guignardia* que apresenta características morfológicas similares à espécie patogênica, podendo dificultar a diagnose correta da MPC. Desta forma, a diagnose realizada por métodos moleculares passa a ser a mais segura, uma vez que utiliza primers específicos para *G. citricarpa* (Baayen et al., 2002; Stringari et al.,

2009). Os primers utilizados para a caracterização de *G. citricarpa* são GCP1 / GCP2 (Stringari et al., 2009) ou os primers PB-N-ITS-Gc / NP-Br-ITS-Gc” (Peres et al., 2007). Já os primers PB-N-ITS-Gm / NP-BR-ITS-Gm são utilizados para a detecção da forma endofítica de *Guignardia* que em sua fase assexuada é denominada de *P. capitalensis* (Peres et al., 2007; Stammler et al., 2013).

Em sua fase perfeita, esse fungo apresenta pseudotécio de forma globosa com ascas, células em forma de saco, em formato de clava, arredondado e bitunicado na extremidade superior. Internamente nas ascas são formados os ascósporos, estes cobertos por uma massa gelatinosa. Quando estes ascósporos (esporos sexuados) estão maduros, são ejetados pelo estíolo, dispersando o fungo por meio do vento (McOnie, 1964; Sivanesan, 1984).

Em sua fase imperfeita, as estruturas de frutificação são representadas pelos picnídios, estrutura globosa, semifechada, apresentando um poro na sua parte superior, dentro do qual são produzidos conídios. Estes conídios apresentam formato ovoide a elíptico, emergem através do ostíolo, sendo envoltos por uma mucilagem, que em condições naturais apresenta coloração creme, estes dispersados a curtas distâncias por respingos (Baldassari et al., 2001; Feichtenberger et al., 1997)

Os esporos do fungo (ascósporos ou conídios) aderem sobre tecidos suscetíveis da planta, germinam e produzem apressórios, que posteriormente penetram através da cutícula, não necessitando de aberturas naturais nos tecidos para ocorrer à infecção (McOnie, 1967; Kotzé, 1981). Através desta hifa, formada na região entre a cutícula e a epiderme, o fungo fica dormente por um período de até 12 meses até a expressão dos sintomas em frutos cítricos. Esse longo período de incubação é uma característica da MPC (Kotzé, 1981). Segundo McOnie (1964), a maturação do fruto, com temperaturas acima de 21 °C e exposição à intensa radiação solar interrompe este período de dormência do fungo. Razão que muitas vezes justifica a expressão de sintomas de MPC somente ao término do inverno ou após a colheita dos frutos.

Os frutos cítricos são susceptíveis ao patógeno durante todo o período de maturação (Almeida, 2009, Aguiar et al., 2012). Uma vez a MPC estabelecida no pomar cítrico, não há consenso sobre qual forma de esporos do fungo (conídios e ascósporos), é mais importante para a dispersão da doença. Para as condições da África do Sul, segundo Kotzé (1981), os ascósporos são os principais propágulos do fungo. Entretanto, para as condições do Brasil, os conídios estão associados com o incremento da doença (Spósito et al., 2007, 2008, 2011).

2.4 Sintomatologia da mancha preta dos citros

O patógeno infecta e causa lesões em frutos, folhas e ramos das plantas cítricas. Para laranjeiras doces os sintomas são visíveis e problemáticos em frutos (Baayen et al., 2002), para o limoeiro, além dos frutos sintomáticos, as folhas apresentam sintomas de infecção com maior frequência que as demais variedades (Kotzé, 1988).

No Brasil, a doença apresenta seis tipos de sintomas, nomeados de acordo com a sua característica (Goes et al., 2000; FUNDECITRUS, 2008):

(i) *mancha dura* – este sintoma é o mais frequente da doença, geralmente é o primeiro a aparecer (Figura 1). As lesões aparecem quando os frutos iniciam a maturação. Em frutos maduros, aparece um halo verde ao redor da lesão que apresenta centro deprimido de cor marrom com pontuações escuras (estruturas onde os conídios são formados), já nos frutos mais verdes ocorre o inverso, um halo amarelo aparece circundando as lesões. Este tipo de sintoma também é constatado em folhas, podendo ocorrer nas duas faces da folha;

(ii) *falsa melanose* – este sintoma ocorre onde a doença está estabelecida há algum tempo e os frutos encontram-se com 4 a 5 meses após a queda das pétalas, aparecem pequenas lesões com numerosos pontos escuros ao seu redor. Pode ser confundido com a melanose dos citros causada pelo fungo *Diaporthe citri*, apesar da aparência, as texturas das lesões são diferentes, a MPC é de textura lisa e a melanose é áspera;

(iii) *mancha rendilhada* – apresenta lesões superficiais de coloração marrom e de textura lisa, sem bordas definidas que atingem grande parte do fruto. Estas lesões aparecem em frutos ainda verdes e a área lesionada fica amarela;

(iv) *mancha trincada* – ocorre em frutos ainda verdes, onde apresentam lesões superficiais, com manchas de aspecto oleoso e posteriormente próximo a maturação as lesões apresentam fendilamentos (trincas);

(v) *mancha sardenta* – são lesões pequenas levemente deprimidas e de coloração avermelhada, aparecem em frutos maduros, estas lesões podem coalescer aumentando seu tamanho ou permanecerem estáveis, pequenas e individuais;

(vi) *mancha virulenta* – este sintoma pode alcançar grandes áreas nos frutos, ocorrem normalmente no final da safra com os frutos maduros, as lesões aparecem devido à coalescência de lesões do tipo mancha sardenta e mancha dura, que dão origem a grandes lesões deprimidas de centro acinzentado e bordas salientes, apresentando coloração escura marrom ou vermelha, apresentando necrose na casca dos frutos.



Figura 1 – Sintomas de mancha dura em frutos de limão verdadeiro de área com alta pressão de inóculo de *Phyllosticta citricarpa* e sem controle da mancha preta dos citros.

A temperatura elevada, a intensa radiação solar, são fatores que favorecem a expressão dos sintomas da MPC (Feichtenberger, 1996). Quanto à manifestação dos diferentes tipos de sintomas observados, pode estar relacionado à susceptibilidade dos tecidos, às condições do clima e o tipo de inóculo que causou o sintoma. Plantas mais velhas, debilitadas e estressadas são mais sujeitas a expressão de sintomas do que as plantas saudáveis e vigorosas (Feichtenberger et al., 2005).

2.5 Manejo da mancha preta dos citros

Segundo Kimati & Bergamim Filho (1996), a adoção sistematizada e harmoniosa de diferentes medidas de controle da doença, visa suprimir ou desacelerar o ciclo das relações patógeno-hospedeiro.

O manejo da doença visa eliminar ou minimizar a produção das duas fontes de inóculo. Para atuar sobre os ascósporos, pode-se fazer o manejo da vegetação local (gramíneas e leguminosas) em ruas de plantio, com uso de roçadeiras ecológicas; utilizar decompositores de folhas como a uréia ou formulações prontas, aplicado por meio de aplicadores de herbicida; eliminar as folhas com uso de rastelos mecânicos conjugados com trinças ou reduzir a queda de folhas das plantas (Bellote, 2006; Almeida, 2009; Rôsetto, 2009; Scaloppi, 2010). Para o caso dos conídios, já que esses na sua maioria são formados em galhos secos recomenda-se um bom manejo nutricional das plantas, controle de doenças que causam a seca de ramos e poda de ramos ou galhos secos.

O emprego de pulverização com fungicidas é outra forma eficiente de controle da MPC (Scaloppi, 2010). Entre os fungicidas utilizados para o controle da doença, dois tipos são adotados, os protetores e os sistêmicos (Almeida, 2009).

A adoção de medidas integradas de manejo é necessária para obtenção de um bom nível de controle da doença (FUNDECITRUS, 2008).

2.5.1 Podas

Prática cultural adotada na fruticultura desde a antiguidade, com o objetivo de intervir no crescimento vegetativo e na produtividade das frutíferas, a poda consiste em remover uma quantidade variável de tecidos das plantas (Carvalho et al., 2005).

Entre os materiais utilizados para esta atividade, destacamos o uso de serras manuais, tesouras manuais ou pneumáticas ou serras motorizadas (Rôssetto, 2009). Dentre as diferentes modalidades de podas realizadas nas plantas, pode se destacar quatro tipos, como sendo as mais usadas nas plantas cítricas, sendo elas; poda de condução e formação; poda de redução de copa; poda de rejuvenescimento e poda de limpeza (Petto Netto, 1991; Carvalho et al., 2005).

De acordo com as modalidades citadas acima, pode se destacar a poda de limpeza como atividade de grande importância para o manejo da MPC, pois neste tipo de poda, todos os ramos secos, doentes, com danos ou injúrias causados por pragas, ou mal situados são eliminados, proporcionando uma melhor aeração da planta e melhorando as condições para os tratamentos fitossanitários (Petto Netto, 1991; Carvalho et al., 2005).

O tratamento de poda atua em conformidade com os princípios de erradicação, regulação e proteção, dos princípios gerais de controle de doenças estabelecidos por Whetzel (Kimati et al., 2011), visto que esta prática atua na redução de inoculo inicial, modifica o microclima local tornando-o não propício para o desenvolvimento do patógeno e estabelece uma barreira, com a eliminação de fontes de inoculo, entre as partes infectadas e suscetíveis da planta. Estes princípios são específicos para determinados grupos de doenças, mas proporcionam a redução da incidência geral de doenças nos próximos ciclos produtivos (Rôssetto, 2009; Laranjeira et al., 2005).

Segundo Rôssetto (2009), a poda vem se mostrando uma técnica promissora no controle de doenças dos citros. No caso da mancha preta, a poda deve ser efetuada preventivamente no período de seca, nos meses de junho, julho e agosto.

2.5.2 Manejo do mato da entrelinha com roçadeiras

Manejar a vegetação da entrelinha dos citros, em grande parte composta por plantas invasoras concorrentes com a cultura, é uma prática de manejo que auxilia na regulação de alguns aspectos físicos e químicos do ambiente que influi no controle de patógenos (Laranjeira et al., 2005). O manejo de plantas invasoras ocorre em aproximadamente oito meses por safra e apresenta baixo impacto na resposta produtiva da cultura, mas em longo prazo pode apresentar respostas positivas associadas com a conservação do solo e supressão de pragas e doenças (Rigolin & Tersì, 2005).

O uso de roçadeiras deve ser aplicado no manejo das plantas invasoras quando elas atingirem altura de 0,5 a 1,0 metro. Deve-se evitar repetir esta operação ao longo do ano, para evitar compactação e erosão do solo e dar tempo para formação de massa verde, que retorna ao solo como matéria orgânica reciclando minerais, e mantendo uma diversidade de espécies. As roçadas frequentes tendem a provocar o desaparecimento de espécies mais sensíveis a esta operação, principalmente as de folhas largas, favorecendo o desenvolvimento de gramíneas que competem mais com a cultura por água e nutrientes. Além disso, o mato formado na entrelinha contribui para manter a diversidade de inimigos naturais de pragas e doenças (Koller, 1994; Laranjeira et al., 2005; Rigolin & Tersì, 2005).

Seguindo esta estratégia de controle de plantas invasoras, e utilizando o modelo de roçadeiras denominadas “ecológicas”, que lançam a massa vegetal cortada sob a copa das plantas, é possível formar uma cobertura de massa vegetal sob a copa das plantas. A cobertura morta depositada sob a copa das plantas contribui para reduzir níveis de várias doenças, entre elas a MPC, em que os esporos sexuados (ascósporos) produzidos nas folhas caídas ao solo são de grande importância epidemiológica (Rôssetto, 2009). A cobertura morta sobre as folhas infectadas por estes esporos acelera a sua decomposição, diminuindo significativamente a produção e dispersão de ascósporos, minimizando os níveis da doença (Laranjeira et al., 2005).

2.5.3 Decomposição de materiais orgânicos

As transformações sofridas durante o processo de decomposição dos restos de plantas originam parte da matéria orgânica do solo, que é fonte de nutrientes para as plantas. A decomposição está diretamente relacionada a fatores como a quantidade de material orgânico vegetal, a fertilidade do solo e fatores climáticos (Brown & Dickey, 1970; Malavolta & Violante Neto, 1989).

A velocidade de decomposição de resíduos orgânicos é regulada pela relação carbono/nitrogênio (C/N), que são elementos que compõem estruturalmente os órgãos vegetais. Quanto maior for a concentração de compostos ricos em C, como exemplo a lignina, maior é a relação C/N do material, conseqüentemente mais lenta e difícil será a sua decomposição (Bertol et al., 2004). A decomposição de resíduos orgânicos pode ser determinada diretamente pela perda de peso ou por técnicas que utilizam elementos marcados, que ao final do processo demonstre uma nova biomassa formada (Bellote, 2006).

2.5.4 Controle químico

O controle de doenças pode ser realizado mediante uso de produtos químicos. Para a MPC, o controle químico iniciou-se na década de 50, na Austrália e África do Sul, com o uso de fungicidas. Naquela época os principais fungicidas utilizados no controle da MPC eram os cúpricos (Calavan, 1960). Com o passar das décadas novos grupos foram surgindo. Na década de 60 foram introduzidos os fungicidas ditiocarbamatos. Na década de 70 surgiram os benzimidazóis e, houve uma redução de 4 a 5 aplicações de ditiocarbamatos, para uma aplicação de benzimidazol com bom controle da doença (Kotzé, 1981). Porém, na década de 80 foram constatados isolados de *P. citricarpa* com resistência aos benzimidazóis na África do Sul (Herbert & Grench, 1985). Na década de 90 surgiram as estrobilurinas que também apresentavam bons níveis de controle da MPC (Schutte et al., 1996; Tollig et al., 1996).

Na citricultura brasileira, os fungicidas que proporcionam um bom controle de MPC e são registrados no Ministério da Agricultura e Abastecimento, são os de ação sistêmica (benzimidazóis e estrobilurinas) e os de ação protetora (cúpricos e ditiocarbamatos) (BRASIL, 2013b). As pulverizações com fungicidas iniciam-se após o florescimento, quando as pétalas das flores começam a cair e se inicia o desenvolvimento do fruto. Os talhões devem ser pulverizados, independente da intensidade de doença. O número de aplicações pode variar de acordo com histórico local da doença, das condições ambientais, da suscetibilidade da variedade e do destino da fruta (FUNDECITRUS, 2008; Scaloppi, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Detecção de *Phyllosticta citricarpa* em folhas de limão verdadeiro e utilização de mudas como armadilha para monitoramento de inóculo no campo

3.1.1 Descrição da área e delineamento experimental

Os experimentos de detecção de *P. citricarpa* em folhas de limão verdadeiro foram conduzidos no laboratório e casa de vegetação do Fundecitrus, Araraquara, SP, Brasil. O monitoramento de inóculo no campo, utilizando mudas como armadilha, foi conduzido em pomar comercial de limão verdadeiro 'Eureka' (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), enxertado em laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), plantado em janeiro de 1998, com espaçamento de 8,5 m x 4,5 m, irrigado pelo sistema de tubos gotejadores, localizado no município de Barretos, região Norte do estado de São Paulo, Brasil.

3.1.2 Preparo da suspensão de conídios de *Phyllosticta citricarpa*

O isolado GC 33/05 de *P. citricarpa* foi cultivado em meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA) por 21 dias a 25° C no laboratório do Fundecitrus. Após este período, os conídios foram removidos da colônia crescida do fungo, mediante a adição de 10 mL de água esterilizada, seguido de raspagem superficial com alça de Drigalsky. A suspensão obtida foi ajustada para as concentrações de 10^1 a 10^5 conídios.mL⁻¹, aferidas em câmara de Neubauer.

3.1.3 Inoculação das diferentes concentrações de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em folhas de limão verdadeiro

Fragmentos de folhas de limão verdadeiro, proveniente de mudas da variedade Eureka, mantidas em vasos com idade de 18 meses, foram cortados com tamanho de 4 cm² (2 x 2 cm), e inoculados com diferentes concentrações de inóculo (10^1 a 10^5 conídios.mL⁻¹) de *P. citricarpa*. Os fragmentos de folha foram acondicionados em placas de Petri e em seguida inoculados com 100 µL de uma das suspensões de inóculo preparadas, utilizando-se pipetas, formando uma gota sobre o fragmento de folha. Estes fragmentos foram mantidos em câmara úmida por um período de 24 horas, em seguida analisados utilizando a técnica da PCR, visando estabelecer a concentração mínima de inóculo necessário para detecção do patógeno em folhas. O teste foi realizado em 5 repetições para cada concentração de inóculo, sendo cada fragmento de folha uma repetição. O mesmo procedimento foi realizado em folhas aderidas em mudas de limão verdadeiro com idade de 18 meses. Para manutenção da gota sobre a folha, borracha adesiva quadrada de 2,5 x 2,5 cm com um orifício no centro de 1 cm de diâmetro foi colada sobre a folha e a suspensão foi adicionada no orifício. Em seguida o

orifício foi coberto para formar uma câmara úmida. Após 24 horas, a borracha foi removida e um fragmento de folha de 2 x 2 cm foi extraído no local da inoculação para a extração de DNA e análise por PCR. O teste foi realizado em cinco repetições para cada concentração de inoculo, sendo cada folha uma repetição e uma folha por muda.

3.1.4 Utilização de mudas como armadilhas para monitoramento de inoculo de *P. citricarpa*, no campo

Mudas de limão verdadeiro foram mantidas no campo sob a copa das plantas, por um período de 10 dias e, após este período as mudas foram substituídas por outras (Figura 2). Cinco folhas de cinco mudas que permaneceram no campo em cada um dos períodos de 10 dias foram coletadas e a presença do inóculo analisada por PCR, como forma de monitorar o inóculo da MPC e definir o momento ideal para realização das pulverizações. A primeira exposição das mudas de limão ao inoculo sob a copa das plantas foi realizada outubro de 2011 quando iniciou o período chuvoso na área. Este processo de exposição foi repetido em intervalos de 10 dias até o mês de março de 2012, totalizando 20 períodos de exposição.



Figura 2 – Exposição de mudas de limão verdadeiro mantidas no campo como armadilha para monitorar esporos de *P. citricarpa*, sob a copa de plantas de limão verdadeiro em Barretos, SP.

3.1.5 Análise da presença de *P. citricarpa* através da técnica da PCR

As folhas de limão verdadeiro inoculadas com esporos de *P. citricarpa*, em laboratório e casa de vegetação, com diferentes concentrações de inóculo e folhas das mudas utilizadas como armadilha, acondicionadas sob a copa de plantas adultas de limão verdadeiro no campo, foram analisadas utilizando a mesma metodologia de extração e detecção pela técnica da PCR no laboratório do Fundecitrus em Araraquara/SP.

3.1.5.1 Preparo da amostra e extração de DNA

Para extração de DNA, as amostras de folhas com aproximadamente 0,5 g de material vegetal foram picadas e acondicionadas em sacos plásticos com rede plástica em seu interior, em seguida este material foi macerado em homogeneizador Homex (Bioreba, Suíça) de acordo com protocolo de extração com CTAB (Murray & Thompson, 1980), adaptado por Teixeira et.al (2005, 2008). Para cada amostra foi adicionado 3 mL de solução tampão para extração de DNA com 0,02% de beta-mercaptoetanol. O macerado foi transferido para tubos plásticos de 2 mL de capacidade, em seguida levado ao banho Maria a 65°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 17.800 g por 5 minutos, terminado o processo de centrifugação foram recuperados 0,9 mL do sobrenadante em novo tubo adicionando 0,9 mL da mistura clorofórmio: álcool isoamil (volume/volume), em seguida homogeneizado o conteúdo, através da inversão dos tubos plásticos. Em seguida, foram centrifugadas a 17.800 g por 5 minutos, resgatados 800 µL do sobrenadante, adicionando-se 0,6 do volume de isopropanol (480 µL). As amostras ficaram em repouso por 30 minutos a 4° C negativos, em seguida foram centrifugadas por 20 minutos a 17.800 g, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de álcool 70% ao pellet sendo novamente centrifugado a 17.800 g por 10 minutos. Esta operação foi repetida por duas vezes. Após centrifugação com etanol 70%, as amostras ficaram secando por 6 minutos em evaporador rotativo a vácuo, a uma temperatura de 38° C. Após o processo de secagem das amostras, o DNA obtido foi hidratado com 50 µL de água.

3.1.5.2 Detecção de *P. citricarpa* através da PCR

Para detecção de *P. citricarpa* através da PCR, foi utilizado 2 µL do DNA extraído no processo anterior (item 3.1.5.1). O mix para reação foi preparado para um volume de 20 µL, contendo em sua composição, para uma amostra, tampão da PCR (20 mM Tris-HCL (pH 8,0), 50 nM KCl), 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 10 µM do primer GCP1 (AAGTGTGAGTGTCGAAGGTGG), 10 µM do primer GCP 2 (GACGACTCGCTTTTCTACGGC) (Stringari et al., 2009), 0,8 U de Taq DNA polimerase (5U/µL), completando com água o volume de 20 µL.

A amostra pronta foi amplificada em termociclador (Eppendorf Master Cycler Gradient) utilizando o programa GCP, com 1 ciclo a 94°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 68°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto. Ao final deste processo as amostras foram guardadas a 8° C até a eletroforese.

Para a análise dos produtos obtidos na amplificação da PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão de Tris-acetato EDTA. A coloração do DNA foi feita com uso de brometo de etídeo e visualizado em transluminador com luz ultravioleta. Na reação foi utilizado um controle negativo, com água, e controle positivo com DNA do fungo.

3.2 Efeitos de diferentes estratégias de manejo sobre o controle da mancha preta dos citros em pomar comercial de limão verdadeiro.

3.2.1 Descrição da área e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em pomar comercial de limão variedade “Eureka” (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), enxertado em laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), plantado em janeiro de 1998 (14 anos de idade), com espaçamento de 8,5 m x 4,5 m, irrigado pelo sistema de tubos gotejadores, localizado no município de Barretos, região Norte do estado de São Paulo, Brasil.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com três repetições cada tratamento, no esquema de parcelas subdivididas. A área experimental foi dividida em duas partes, sendo uma com manejo do mato com roçadeira convencional e a outra com roçadeira ecológica. Cada parcela (tipo de poda) tanto na roçada convencional quanto na ecológica foi composta por três linhas de plantio. Dentro de cada parcela, 10 plantas por linha em 3 linhas representaram as sub-parcelas (produtos aplicados no solo). A parcela útil dentro de cada sub-parcela foi composta pelas quatro plantas centrais da linha central. (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das parcelas e sub-parcelas na área experimental em pomar limão verdadeiro em Barretos, SP.

Bloco 1			Bloco 2			Bloco 3		
Poda 1	Poda 2	Poda 3	Poda 2	Poda 3	Poda 1	Poda 3	Poda 1	Poda 2
ROÇADEIRA CONVENCIONAL								
Água*			Uréia			Fegatex		
Uréia			Trichodermil			Água		
Fegatex			Água			Trichodermil		
Trichodermil			Fegatex			Uréia		
ROÇADEIRA ECOLÓGICA								
Água			Uréia			Fegatex		
Uréia			Trichodermil			Água		
Fegatex			Água			Trichodermil		
Trichodermil			Fegatex			Água		

*Aplicação de água, uréia (10 kg.ha⁻¹), cloreto benzalcônio (Fegatex, 2 L.ha⁻¹) ou *Trichoderma harzianum* (Trichodermil SC, 1,0 L.ha⁻¹) em barra de herbicida em outubro/2011. O tratamento com *Trichoderma* foi repetido em janeiro/2012.

3.2.2 Poda das plantas de limão verdadeiro

Foram realizados três tipos de podas, no experimento (Figura 3), sendo cada tipo considerado um tratamento. Poda tipo 1 (tratamento 1): poda convencional de topo e lateral para redução de copa; Poda tipo 2 (tratamento 2): poda convencional + poda de limpeza de ramos secos; Poda tipo 3 (tratamento 3): poda convencional + poda de limpeza de ramos secos + poda de remoção de ramos no topo da planta, permitindo a entrada de luz no interior da copa.

A poda convencional (poda tipo 1) foi realizada em todos os tratamentos utilizando um trator serra, marca MF, modelo 275, 4x4 com um equipamento de poda marca Ifló. A poda de limpeza de ramos secos foi realizada nos tratamentos 2 e 3 fazendo-se a retirada manual dos ramos no interior da copa das plantas com auxílio de serrotes. A poda de remoção de ramos internos no topo foi realizada apenas no tratamento 3 com o objetivo de abrir um local para entrada de luz solar no interior da copa da planta. Todas as podas foram realizadas de forma sequencial no mês de junho de 2011. Para os três tipos de podas, os ramos podados foram depositados entre as linhas de plantio e posteriormente foram destruídos com auxílio de roçadeira trincha.



Figura 3 – Diferentes tipos de poda em pomar limão verdadeiro em Barretos, SP. Tratamento 1 (à esquerda), Tratamento 2 (no meio) e Tratamento 3 (à direita).

3.2.3 Decompositores de folhas ou inibidores da liberação de ascósporos

Foram utilizados quatro tratamentos de decomposição de folhas ou inibição da liberação de ascósporos, sendo: T1) uréia (10 kg.ha^{-1}); T2) cloreto benzalcônio, produto comercial Fegatex (BR3 Agrobiotecnologia), na dose de (2 L.ha^{-1}); T3) fungo *Trichoderma harzianum* produto comercial Trichodermil SC (Itafort e Bioprodutos), (1 L.ha^{-1}); T4) controle (água), que foram aplicados com pulverizadores de barras para herbicidas em outubro de 2011 após as primeiras chuvas. O tratamento T3 recebeu uma segunda aplicação no mês de janeiro de 2012. Utilizou-se volume calda de 800 L.ha^{-1} para aplicação de todos os produtos, aplicando antes da roçagem do mato nas áreas. Para a avaliação do efeito da uréia

sobre a decomposição de folhas, antes e 30 dias após a aplicação dos tratamentos com uréia ou água, foram coletadas as folhas presentes na superfície de 1 m² (1 x 1 m) sob a copa das plantas de limão e determinada sua massa.

3.2.4 Manejo das plantas daninhas por meio de roçagem

O experimento contou com dois tipos de roçagem das plantas daninhas: com roçadeira convencional ou com roçadeira ecológica, que lançou a massa vegetal cortada sob a copa das plantas, com o objetivo de formar cobertura morta. Em todos os tratamentos, as roçadeiras foram tracionadas pelo trator, marca Massey Ferguson (MF), modelo 265, 4x4, com velocidade de trabalho de 3 km.h⁻¹. Para os dois tipos de roçagem foram utilizadas roçadeiras marca Marchesan, modelo RC 2E 3.400 ecológica e modelo RC 3.100 convencional, trabalhando a 540 rotações por minuto (rpm), na tomada de potencia (tdp) do trator.

A roçada foi realizada de acordo com o crescimento da vegetação natural do local, sendo realizada no dia 6 de janeiro de 2012. A massa verde e a massa seca por metro quadrado (m²) das plantas infestantes no momento da roçagem e a massa verde e a massa seca por m² deslocada sob a copa das plantas pela roçadeira ecológica, foram quantificadas.

3.2.5 Pulverizações

As pulverizações com fungicidas na parte aérea das plantas foram realizadas em toda a área experimental com pulverizador Jacto, modelo Valência 4000, tracionado por um trator MF 275 4x2. O conjunto trator-pulverizador foi calibrado para deslocar a uma velocidade de 3,0 km.h⁻¹. O pulverizador foi equipado com pontas de pulverização de cerâmica modelo KGF, com pressão de trabalho de 120 libras.pol⁻² proporcionando um tamanho médio de gotas de 220 micra, aplicando um volume de calda de 11 L.planta⁻¹ (3000 L.ha⁻¹) que corresponde a 90 mL.m⁻³ de copa.

A área recebeu pulverizações com fungicidas para o controle químico de MPC, onde os fungicidas utilizados foram: oxiclureto de cobre (Recop, formulação pó molhável, na dose de 3,6 kg/2000 L de água); estrobirulina: trifloxistrobina (Flint 500WG, 500 g/kg formulação: grânulos dispersos em água, na dose de 0,15 kg/2000 L de água); benzimidazol: carbendazim (Derosal 500 SC, 500 g/L, formulação suspensão concentrada, na dose de 2L/2000 L de água), utilizando em conjunto aos fungicidas óleo mineral emulsionável Agefix na dose de 5 L/2000 L de água. As pulverizações com fungicidas foram dispostas da seguinte forma: a 1^a de cobre no estádio de 2/3 das pétalas caídas dia 19 de agosto de 2011; a 2^a de cobre + 5 L de

óleo, 27 dias após a anterior (DAA); 3^a com trifloxistrobina + 5 L de óleo, 26 DAA; a 4^a com carbendazim + cobre + 5 L de óleo, 31 DAA; a 5^a com trifloxistrobina + 5 L de óleo, 33 DAA; a 6^a com trifloxistrobina + cobre + 5L de óleo, 35 DAA; a 7^a com trifloxistrobina + cobre + 5L de óleo, 30 DAA.

3.2.6 Avaliações

No mês de abril de 2012, quando os frutos atingiram sua maturação final, foram avaliadas a severidade (%) através da escala proposta por Spósito et. al. (2004) (Figura 4) e a incidência de MPC em 400 frutos por tratamento dentro de cada sub-parcela em quatro plantas na linha central, sendo 100 frutos por planta escolhidos aleatoriamente dos dois lados das plantas. Nestas mesmas plantas foram avaliadas 50 folhas escolhidas aleatoriamente, quantificando-se o número de lesões de MPC por folha e porcentagem (%) de folhas com lesões de MPC.

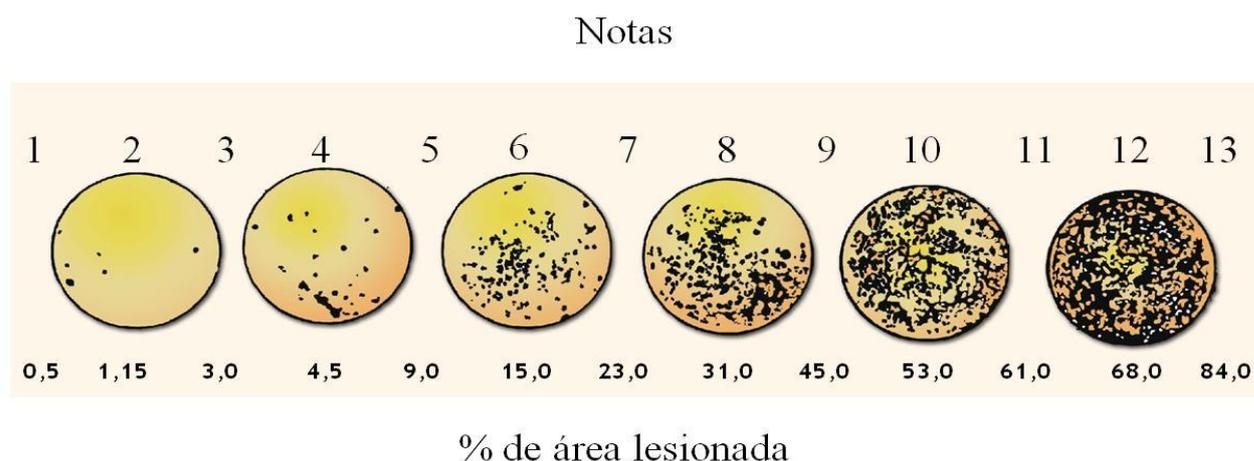


Figura 4 – Escala diagramática utilizada para avaliação da severidade do sintoma da mancha preta dos citros, adaptada por Spósito et. al. (2004).

Após a avaliação visual dos frutos no campo, foram coletados 22 frutos por tratamento dentro de cada sub-parcela, e enviado para o Laboratório de Sanidade Vegetal “Dra Victoria Rossetti” do APTA Regional em Sorocaba/SP, para teste de indução da expressão de sintomas com ethephon (Ethrel), seguindo a metodologia de Baldassari et al. (2007).

A colheita foi realizada no mês de abril, onde avaliou-se a produção total em quilogramas de frutos por planta. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e representados separadamente.

No mês de janeiro de 2012 foi avaliada a produção de massa verde da vegetação intercalar local. A primeira avaliação dessa massa verde foi realizada antes da roçagem, por

meio da pesagem da massa de 1 m^2 de área da entrelinha. A segunda avaliação foi feita logo após a roçagem, onde foi coletada a massa vegetal cortada e deslocada para a área sob a copa das plantas, pesando-se a massa de 1 m^2 de área próxima ao tronco das plantas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de *P. citricarpa* em folhas de limão verdadeiro e utilização de mudas como armadilhas para monitoramento de inoculo no campo.

A técnica da PCR convencional foi eficiente para detecção de *P. citricarpa* nas folhas de limão verdadeiro inoculadas com diferentes concentrações de inóculo (10^1 a 10^5 conídios.mL⁻¹) em laboratório (Figura 5). Os resultados foram positivos para as maiores concentrações de conídios.mL⁻¹, ou seja, para as folhas onde foram utilizadas concentrações iguais ou superiores a 3×10^4 conídios.mL⁻¹ ($100 \mu\text{L} = 3000$ conídios), o resultado apontou a presença do fungo (Figura 5).

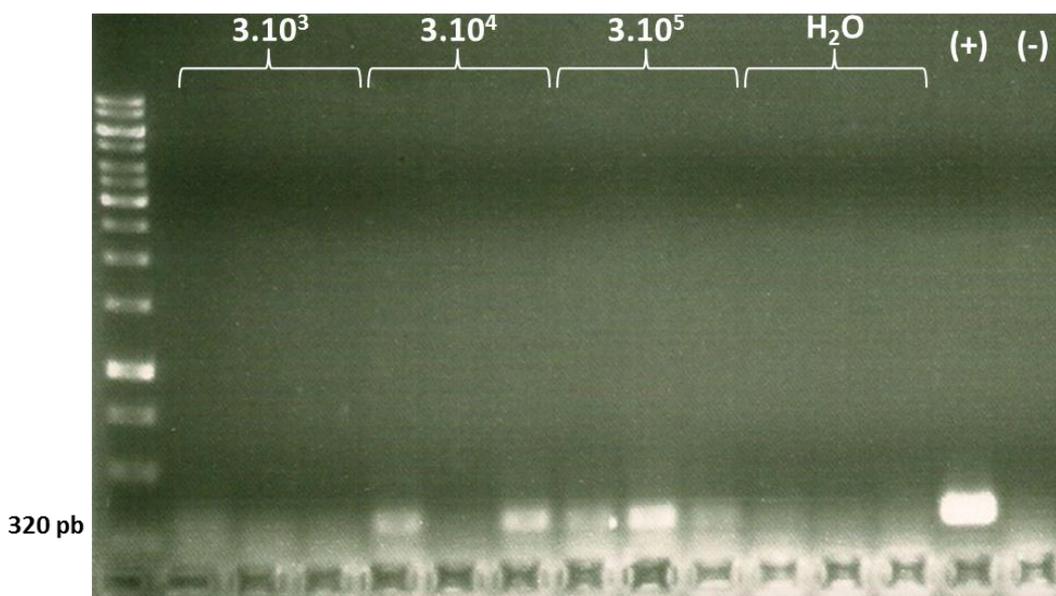


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose da PCR, utilizando o par de primers GCP1/GCP2 de *P.citricarpa*, das amostras de folhas de limão verdadeiro inoculadas com o fungo em diferentes concentrações de conídios. Bandas positivas para *P. citricarpa* apresentaram tamanho de 320 pb.

Para as concentrações iguais ou inferiores a de 3×10^3 conídios.mL⁻¹ ($100 \mu\text{L} = 300$ conídios) não foi possível detectar a presença do fungo, mesmo ciente que em menores concentrações, o fungo estava presente nas amostras. Assim, a detecção de *P. citricarpa* com o uso da PCR convencional somente será possível se a amostra contiver quantidades de inóculo acima de 300 conídios. Trabalhos futuros poderão ser realizados a fim de avaliar este procedimento com a técnica da PCR quantitativa e, assim, poder quantificar o inoculo nas diferentes épocas do ano e aumentar a sensibilidade de detecção.

Nas mudas utilizadas para monitoramento de inóculo de *P. citricarpa* no campo somente entre o 12º e 14º períodos de exposição (7 a 31 de janeiro de 2012) foi possível detectar o fungo pela técnica da PCR (Figura 6).

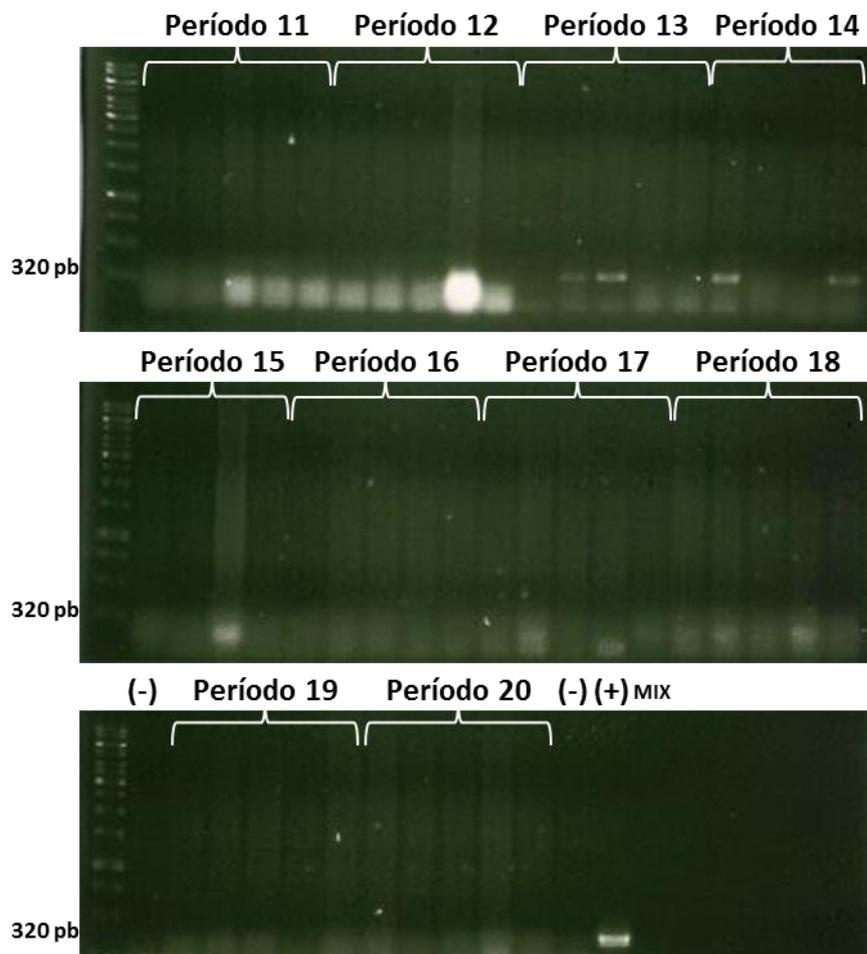


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose da PCR, utilizando o par de primers GCP1/GCP2 de *P. citricarpa*, das amostras de folhas de limão verdadeiro mantidas no campo como armadilha em diferentes períodos de exposição sob a copa de plantas de limão verdadeiro em Barretos, SP. Bandas positivas para *P. citricarpa* apresentaram tamanho de 320 pb.

Desta forma, foi possível observar que as maiores concentrações de esporos foram detectadas em janeiro de 2012, aproximadamente 90 dias após o início do período chuvoso que ocorreu em outubro de 2011 (Tabela 2). As amostras positivas foram observadas nos períodos com os maiores regimes de chuvas, ou seja, as mudas da amostra 12 ficaram expostas a 118 mm de chuvas ocorridos em 8 dos 11 dias, já as mudas da amostra 13 ficaram expostas a 174 mm de chuvas ocorridos em 10 dos 11 dias e as mudas da amostra 14 ficaram expostas a 105 mm de chuvas em 5 dos 11 dias (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos diferentes períodos de exposição das mudas armadilhas no campo, total de chuvas (mm) observada no período, número de dias com chuvas no período e resultado da PCR realizada com as folhas das mudas armadilhas mantidas em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011 e 2012.

	Período de exposição	Total de chuva do período (mm)	Dias com chuva no período	Resultado da PCR ^a
1	22/10 à 27/10	19	2	Negativo
2	29/10 à 08/11	6	2	Negativo
3	05/11 à 16/11	75	3	Negativo
4	12/11 à 22/11	115	4	Negativo
5	19/11 à 29/11	56	2	Negativo
6	26/11 à 06/12	46	4	Negativo
7	03/12 à 13/12	103	5	Negativo
8	10/12 à 20/12	70	4	Negativo
9	17/12 à 27/12	48	4	Negativo
10	23/12 à 02/01	87	7	Negativo
11	30/12 à 09/01	85	3	Negativo
12	07/01 à 17/01	118	8	Positivo
13	14/01 à 24/01	174	10	Positivo
14	21/01 à 31/01	105	5	Positivo
15	28/01 à 7/02	12	2	Negativo
16	04/02 à 14/02	103	5	Negativo
17	11/02 à 21/02	71	6	Negativo
18	18/02 à 28/02	40	3	Negativo
19	25/02 à 06/03	23	2	Negativo
20	03/03 à 13/03	2	1	Negativo

^a Negativo se refere a não formação de banda de 320 pb para *Phyllosticta citricarpa* como resultado da eletroforese em gel de agarose da PCR nas cinco amostras. Positivo se refere a formação de banda em pelo menos uma das cinco amostras de folhas. Nos períodos 12, 13 e 14 houve a formação de banda para 1, 2 e 2 amostras, respectivamente.

Os resultados da PCR das folhas de mudas armadilhas sob a copa das plantas no campo mostraram que no período de janeiro houve uma maior concentração de esporos do fungo, uma vez que no presente trabalho somente amostras com concentrações acima de 300 esporos foram detectados (Figura 5). Esses dados corroboram com os obtidos por Bellote (2006), onde utilizando armadilhas caça-esporos, os autores observaram maiores índices de detecção de ascósporos nos meses de novembro a janeiro, relatando que a maior liberação de ascósporos ocorreu em períodos secos após períodos de maiores precipitações pluviométricas nestes meses. Entretanto, as armadilhas caça-esporos não detectam os conídios produzidos na copa das plantas. Com a técnica de mudas armadilhas proposta aqui, ambas as fontes de inoculo foram consideradas, uma vez que as mudas estavam recebendo os ascósporos que

vinham das folhas caídas em decomposição e os conídios disseminados dos ramos e frutos presentes na copa das plantas. A maior lavagem de ramos e frutos pela água das chuvas no mês de janeiro provavelmente contribuiu para um aumento do depósito de conídios sobre as mudas armadilhas, uma vez que as plantas de limão apresentam grande quantidade de ramos secos.

Durante os diferentes períodos de incubação das mudas armadilhas no campo iniciados em outubro de 2011, podemos destacar também os períodos 4 e 7 de exposição onde foram registradas precipitações superiores a 100 mm, mas a PCR foi negativa (Tabela 2). Esta alternância de períodos secos e úmidos pode ter contribuído para a formação de ascósporos que somados à produção de conídios nos ramos e frutos atingiram os níveis de detecção por PCR apenas nos períodos 12 a 14. Desta forma, podemos concluir que o período de maior produção de inóculo no campo ocorreu no mês de janeiro, em períodos com maior regime de chuvas e maior quantidade de dias chuvosos. Entretanto, devido à baixa sensibilidade da técnica, não se pode descartar a possibilidade de presença do fungo em menores concentrações nas folhas das mudas em outros períodos de exposição. Trabalhos futuros poderão ser realizados utilizando a PCR em tempo real, que é mais sensível, a fim de quantificar a quantidade de inóculo em cada período e correlacioná-la com os dados climáticos. Somente assim, será possível fazer recomendações de pulverizações em pomares cítricos baseando-se na quantidade de inóculo do patógeno.

4.2 Efeito de diferentes estratégias de manejo sobre o controle da mancha preta dos citros em pomar comercial de limão verdadeiro.

Os resultados obtidos para os três tipos de poda na roçada convencional encontram-se na Figura 7. Para a maioria das variáveis analisadas não foram observadas diferenças entre os três tipos de poda utilizados, exceto para a variável incidência em frutos avaliada no campo, que foi menor nas podas do tipo 1 (convencional) e 2 (convencional + poda de limpeza) (Figura 7C). Entretanto, vale ressaltar que, após a indução da expressão de sintomas com ethephon, não houve diferenças significativas para os três tipos de podas (Figura 7D).

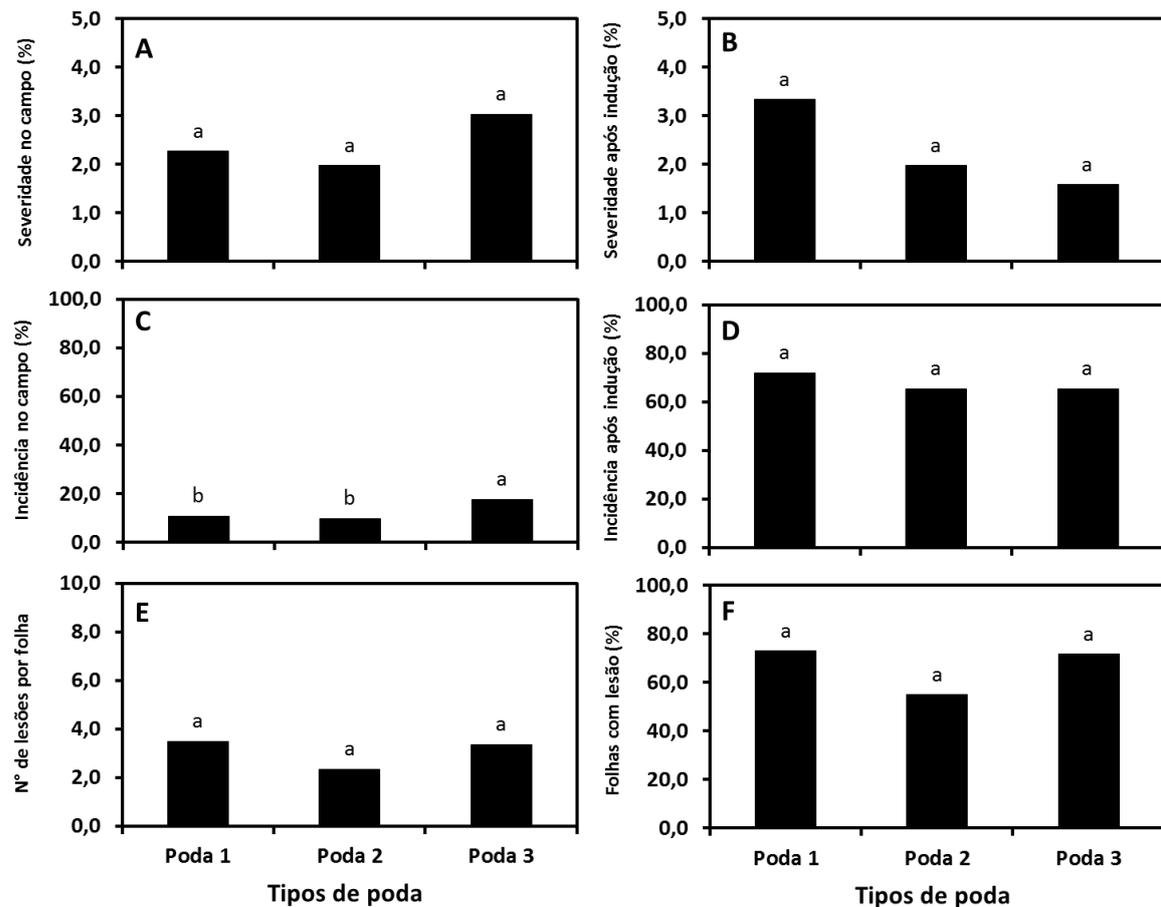


Figura 7 – Severidade e incidência da mancha preta dos citros em frutos no campo (A e C) e após indução de expressão de sintomas com ethephon (B e D), número de lesões por folhas (E) e porcentagem de folhas com lesões da doença (F), após diferentes tipos de poda para roçada convencional em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011/2012. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A produtividade das plantas, nos tratamentos com os três tipos de poda, dentro da roçada convencional, também não diferiram entre si (Figura 8).

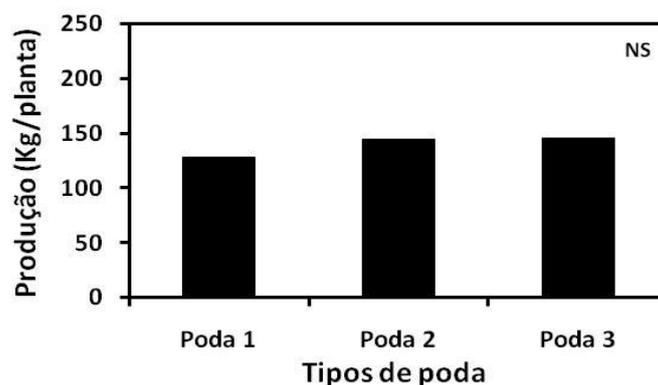


Figura 8 – Produção, em kg.planta^{-1} , para os diferentes tipos de poda na área com roçada convencional em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011/2012. NS= diferença não significativa entre as médias analisadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na área com a roçada ecológica apenas o tratamento com a poda tipo 1 reduziu a severidade da doença em frutos no campo, diferindo significativamente das podas 2 e 3 Figura 9A. Entretanto, esta diferença não foi observada após a indução de expressão de sintomas com ethephon. Para as demais variáveis analisadas, não houve diferença entre os tipos de podas (Figura 9).

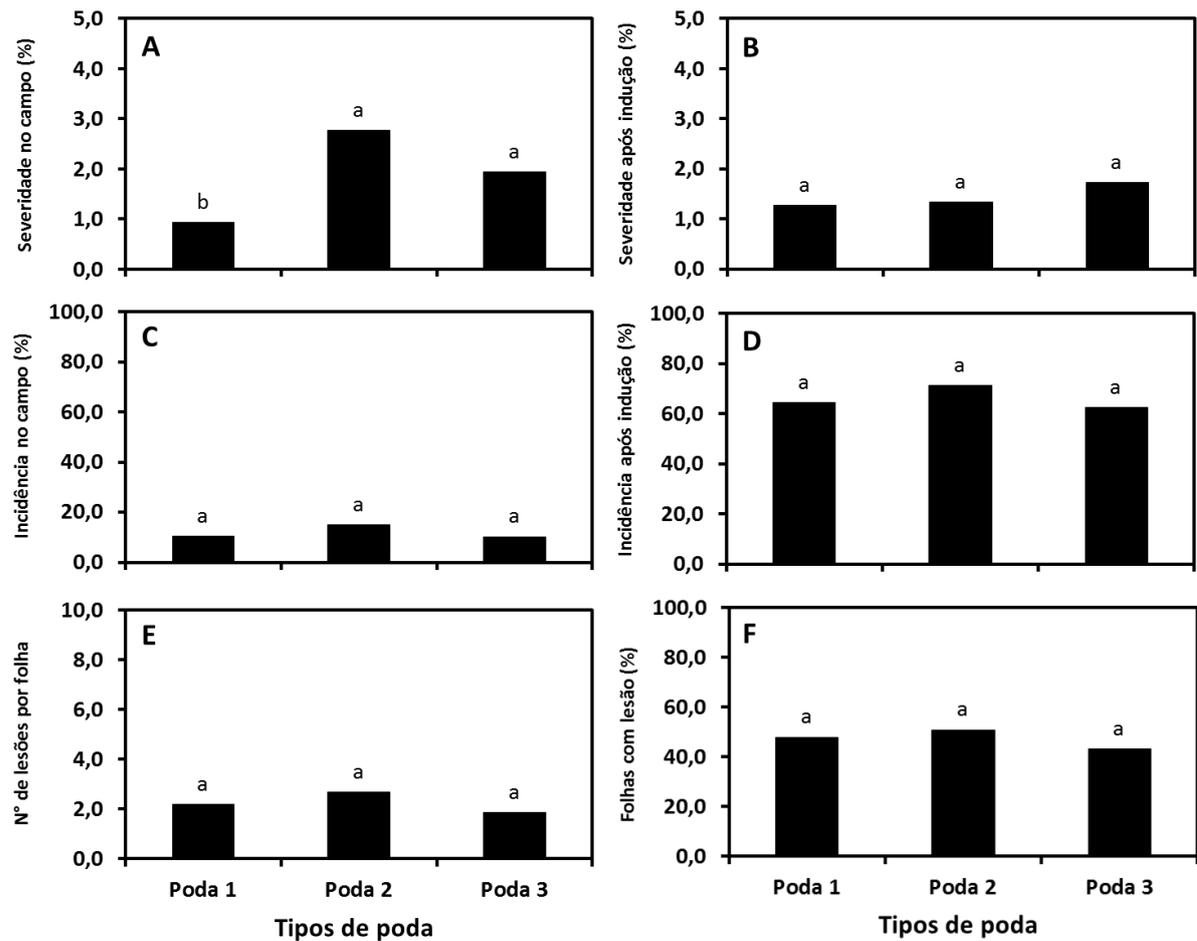


Figura 9 – Severidade e incidência da mancha preta dos citros em frutos no campo (A e C) e após indução de expressão de sintomas com ethephon (B e D), número de lesões por folhas (E) e porcentagem de folhas com lesões da doença (F), após diferentes tipos de poda para roçada ecológica em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011/2012. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A produtividade das plantas, para os tipos de poda, dentro da roçada ecológica, apresentou valores muito próximos entre si, notando que na poda 1 houve uma produção pouco maior que as podas 2 e 3 (Figura 10).

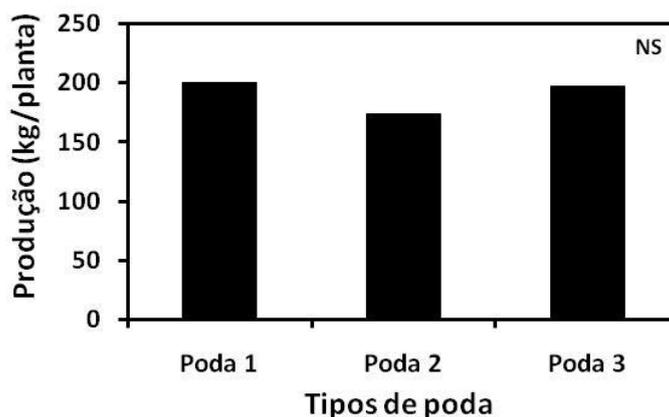


Figura 10 – Produção, em kg/planta, para os diferentes tipos de poda na área com roçada ecológica em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011/2012. NS= diferença não significativa entre as médias analisadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando os dois tipos de roçada, convencional e ecológica, dentro de cada tipo de poda, 1, 2 e 3, foi possível observar que a roçadeira ecológica reduziu a severidade de frutos no campo em relação a roçadeira convencional na poda tipo 1 (Figura 11A). Para os dados de incidência de frutos com sintomas no campo, a roçadeira ecológica foi mais eficiente que a convencional para a poda 3 (Figura 11F) e o contrário foi obtido para a incidência na poda tipo 2 (Figura 11E).

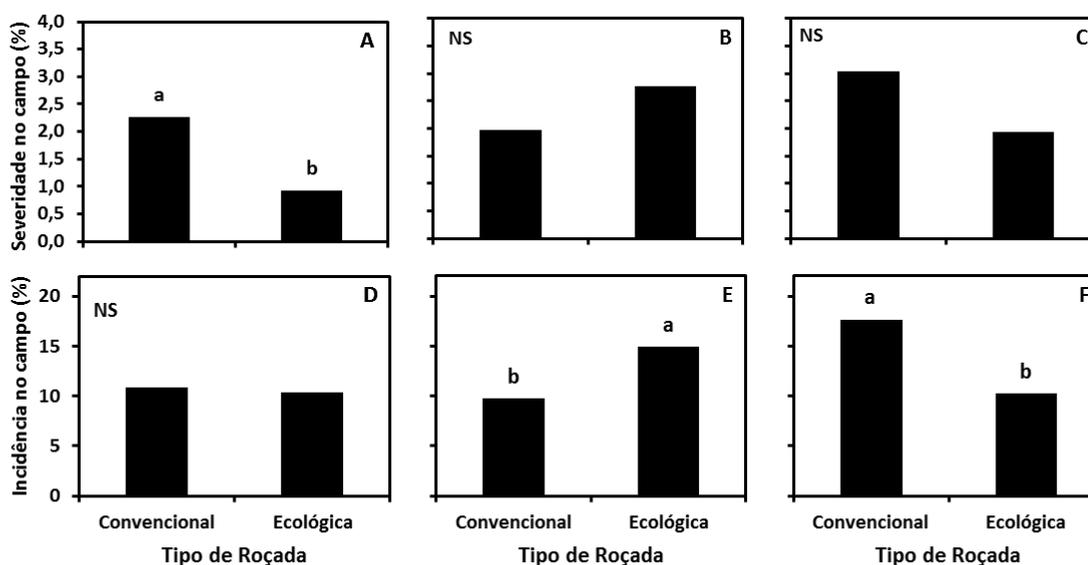


Figura 11 – Severidade e incidência de mancha preta dos citros em frutos no campo para os tratamentos com diferentes tipos de podas, nas áreas roçadas com roçadeira convencional ou ecológica em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011/2012. Poda 1 (A e D), poda 2 (B e E) e poda 3 (C e F). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS= diferença não significativa entre as médias.

Para os dados de severidade e incidência em frutos após indução da expressão de sintomas da doença com ethephon, nota-se que assim como ocorreu no campo, a roçada ecológica foi mais eficiente que a convencional em reduzir a severidade da MPC no tratamento com poda do tipo 1 (Figura 12A). Para as demais podas, não foram observadas diferenças entre os tipos de roçada (Figura 12).

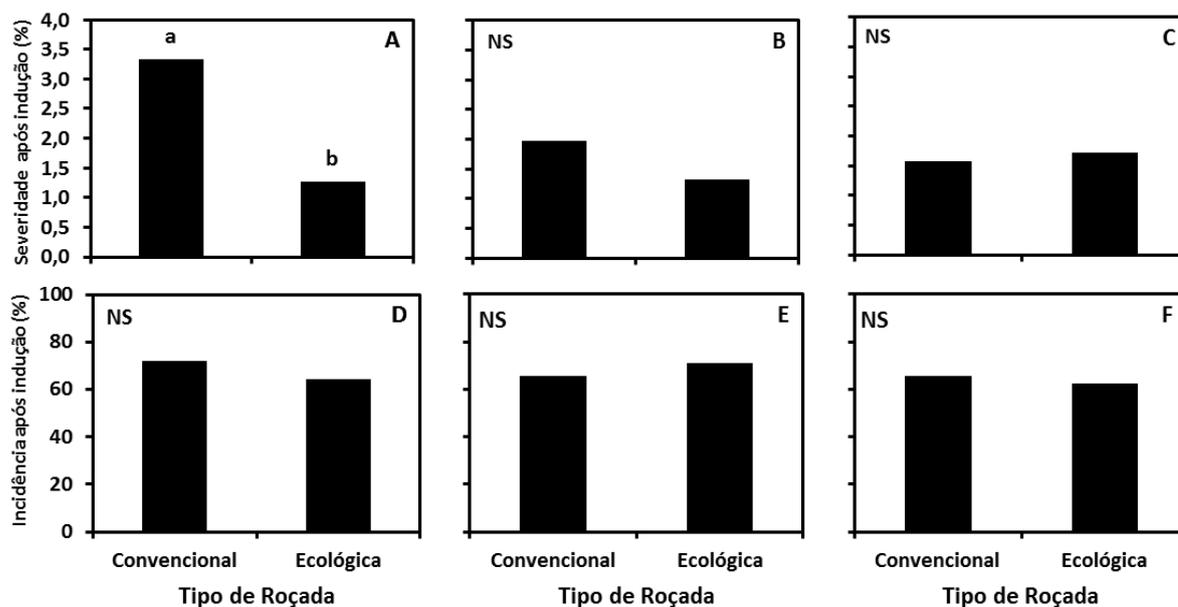


Figura 12 – Severidade e incidência de mancha preta dos citros em frutos após indução da expressão de sintomas com ethephon para os tratamentos com diferentes tipos de podas, nas áreas roçadas com roçadeira convencional ou ecológica em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011/2012. Poda 1 (A e D), poda 2 (B e E) e poda 3 (C e F). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS= diferença não significativa entre as médias.

Analisando o número de lesões por folhas e a porcentagem de folhas com lesões, nos tratamentos, nota-se que a roçada ecológica na podas do tipo 1 e 3, diferiram significativamente da roçada convencional, apresentando menor porcentagem de folhas com lesões e menor número de lesões por folhas (Figura 13). Os dados seguem a mesma tendência apresentada anteriormente para a severidade da doença em frutos no campo, que também apresentaram menores áreas lesionadas de frutos na roçada ecológica.

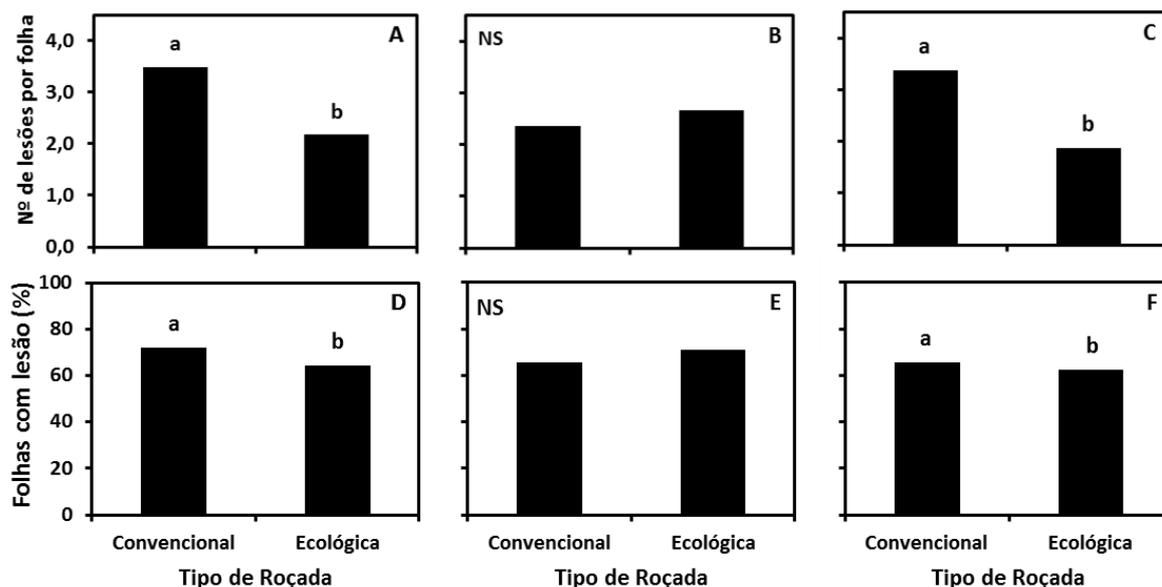


Figura 13 – Número de lesões por folha e porcentagem de folhas com lesão de mancha preta dos citros nos tratamentos com diferentes tipos de podas, nas áreas roçadas com roçadeira convencional ou ecológica em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011/2012. Poda 1 (A e D), poda 2 (B e E) e poda 3 (C e F) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS= diferença não significativa entre as médias.

Comparando os tipos de roçada (ecológica x convencional), nota-se maior produtividade das plantas, nas áreas tratadas com roçadeira ecológica nas podas tipo 1 e 3 (Figura 14A e 14C). Para a poda tipo 2, a diferença observada na produção das plantas nas duas modalidades de roçada não foi significativa (Figura 14B).

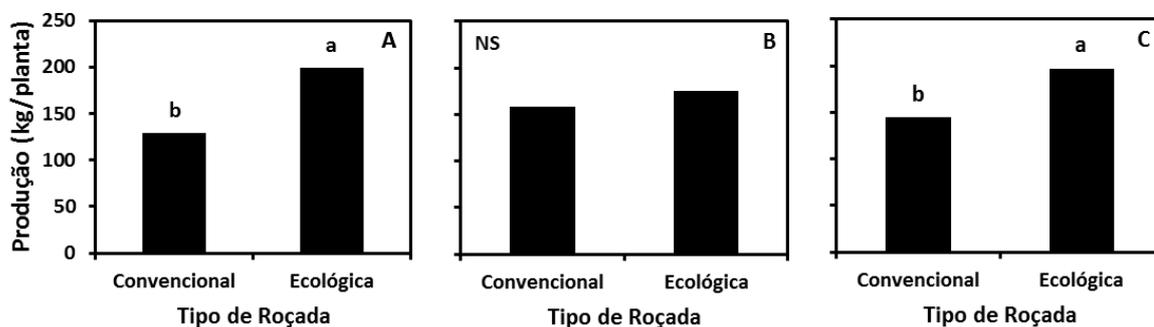


Figura 14 - Produção, em kg.planta^{-1} , para diferentes tipos de podas nas áreas com roçadeira convencional ou ecológica em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011/2012. Poda 1 (A), poda 2 (B) e poda 3 (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS= diferença não significativa entre as médias.

Na literatura, diferentes trabalhos têm demonstrado a eficiência do uso das roçadeiras ecológicas que proporcionam uma barreira física que dificulta a dispersão dos ascósporos do fungo *G. citricarpa*, desta forma diminuindo a dispersão do patógeno. No Brasil, reduções significativas na severidade e incidência da MPC foram obtidas para a roçadeira ecológica quando comparada com a roçadeira convencional, que projeta menores quantidades de massa vegetal sob a copa das plantas (Bellote, 2006; Rôsetto, 2009). Nestes trabalhos o uso de cultivos intercalares se mostrou eficientes na produção de massa e formação de barreira física para os ascósporos. Resultados similares foram obtidos na África do Sul, onde a sobreposição de material vegetal sobre folhas de citros caídas também contribuíram para reduzir a intensidade da doença (Schutte & Kotzé, 1997). Além da roçadeira ecológica, Scalopi (2010) verificou que uso de rastelo mecânico e trincha em conjunto com controle químico da doença, também é eficiente para o manejo da MPC, auxiliando na redução da incidência e severidade da doença.

Considerando-se que o tratamento nutricional foi semelhante para todas as áreas do experimento e não foi realizada análise de solo após utilização de roçadeira e decompositores ou inibidores de liberação de ascósporos, pode-se atribuir este aumento de produtividade na área manejada com roçadeira ecológica ao incremento da matéria orgânica sob a copa das plantas. Com o passar do tempo essa massa vegetal lançada pela roçadeira ecológica vai sendo incorporada ao solo pelos organismos e posteriormente se transforma em matéria orgânica, que é a principal fonte de nutrientes como o nitrogênio, o enxofre, o fósforo e proporciona o aumento da capacidade de troca de cátions (CTC) do solo (Corá, et al., 2005).

Em nosso trabalho, a massa verde presente na entrelinha da área experimental antes da roçada em janeiro variou de 2490 a 3050 g de fitomassa.m⁻² de área. Valores similares aos encontrados por Rôsetto (2009) em pomar de laranja doce em dezembro. Entretanto, a massa verde do mato que foi depositada sob a copa das plantas de limão com a roçada ecológica variou de 1050 a 1150 g de fitomassa.m⁻² de área (Figura 15), enquanto no trabalho de Rôsetto (2009) a massa depositada foi próxima a massa presente antes da roçada. Como as plantas de limão são relativamente grandes, a área ocupada pela copa da árvore que receberá a massa verde normalmente é maior que a área ocupada pelas plantas infestantes na entrelinha que formam essa massa verde, condição esta, diferente das observadas em pomar de laranja doce.

Vale ressaltar que as chuvas iniciaram em outubro e a roçada ecológica na área em estudo foi realizada em janeiro. Provavelmente, melhores resultados poderiam ser alcançados

se as roçadas tivessem sido realizadas antes, pois a liberação de ascósporos foi iniciada com o início das chuvas e presença de períodos secos e úmidos ocorrendo alternadamente. Entretanto, devido à grande quantidade de folhas de limão caídas no solo, seria necessária uma maior quantidade de massa da entrelinha para cobri-las. Essa quantidade dificilmente será obtida com vegetação espontânea roçada ecologicamente antes do período chuvoso. Para o aumento dessa massa na entrelinha, uma opção seria o plantio de culturas intercalares, mas em pomares de limão essa prática pode ser dificultada devido à necessidade de realização das podas com posterior trituração dos ramos na entrelinha, operação esta que, indiretamente trituraria as plantas infestantes que estariam produzindo a massa na entrelinha dos pomares.



Figura 15 - Vista geral da massa vegetal de ocorrência espontânea em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’, antes da roçada (à esquerda) e material vegetal depositado sob a copa das plantas após realizar roçada ecológica (à direita), em Barretos, SP em 2012

Dentre os produtos utilizados para decomposição de folhas caídas ou inibição da liberação de ascósporos no presente trabalho, nenhum deles diferiu significativamente do tratamento onde foi utilizada a água como controle para as diferentes variáveis analisadas de intensidade de doença das plantas (Tabela 3).

Tabela 3 – Severidade (% área lesionada de frutos), incidência (% frutos com sintomas), número de lesões por folhas e porcentagem de folhas com lesões, após aplicação de produtos visando à decomposição de folhas ou inibição de esporulação em pomar de limão verdadeiro ‘Eureka’ em Barretos, SP em 2011/2012.

Tratamentos ¹	Severidade em frutos (%)	Incidência de frutos (%)	Nº de lesões por folhas	Folhas com Lesões (%)
Água	2,34 ^{NS}	13,59 ^{NS}	2,85 ^{NS}	60,31 ^{NS}
Uréia	2,18	11,04	2,42	53,84
Cloreto benzalcônio	2,23	13,06	2,78	58,26
<i>Trichoderma</i>	1,85	11,38	2,57	55,21

*NS = não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹Aplicação de água, uréia (10kg.ha⁻¹), cloreto benzalcônio (Fegatex, 2L.ha⁻¹) ou *Trichoderma harzianum* (Trichodermil SC, 1,0L.ha⁻¹) em barra de herbicida em outubro/2011. O tratamento com *Trichoderma* foi repetido em janeiro/2012.

Apesar de não diferir significativamente da água, vale ressaltar que, os tratamentos com ureia e *Trichoderma* apresentaram os menores valores para todas as variáveis de severidade e incidência da doença em frutos e folhas de limão. A massa das folhas coletadas sob a copa das plantas de limão antes e após a aplicação de uréia apresentou grandes variações, sendo que 30 dias após a aplicação, a massa foi reduzida de 7 a 36% nas diferentes áreas, não sendo observada uma diferença entre as áreas com diferentes roçadas (dados não mostrados). No trabalho realizado por Bellote (2006), a ureia foi eficiente na redução da severidade da doença em frutos de limão. Portanto, a época ou o número de aplicações de cada produto podem estar envolvidos na eficiência dos mesmos nos diferentes pomares. Aqui neste trabalho foram realizadas apenas uma aplicação de uréia e cloreto benzalcônio em outubro e duas aplicações de *Trichoderma* em outubro e janeiro.

A queda de folhas em limão é bem superior quando comparada com laranja e, este fator pode ter comprometido a eficiência dos produtos aplicados sobre elas em função da quantidade de folhas acumuladas no solo no momento de cada aplicação (Figura 16).



Figura 16 - Massa de folhas caídas ao solo em pomar comercial de limão verdadeiro ‘Eureka’ após realizar os tratamentos de poda, antes da aplicação dos decompositores ou inibidores de esporulação (à esquerda) e trinta dias após a aplicação dos decompositores ou inibidores de esporulação (à direita), em Barretos, SP em 2011/2012.

Em pomares de limão verdadeiro alguns fatores favorecem a produção de inóculo nas plantas, sendo eles, a grande quantidade de ramos secos formada na copa, a expressiva queda de folhas no solo, a produção de sintomas em folhas e frutos e as várias floradas ao longo do ano, que propiciam a formação de frutos de diferentes idades na planta. Todos esses fatores normalmente ocorrem de forma simultânea em pomares adultos, onde houve acúmulo de inóculo ao longo dos anos, tornando a MPC uma doença muito agressiva e de manejo complexo nessas áreas.

5 CONCLUSÕES

1. A técnica da PCR é eficaz para detecção de *Phyllosticta citricarpa* em folhas de limão verdadeiro contendo mais de 300 esporos;
2. A metodologia de monitoramento de inóculo de *Phyllosticta citricarpa* no campo com utilização de mudas de limão verdadeiro como armadilhas e PCR convencional, foi eficaz;
3. As podas de ramos secos e abertura de topo das plantas foram eficientes em reduzir a intensidade da mancha preta dos citros nos frutos e nas folhas de plantas de limão verdadeiro, sem interferir na produção das plantas;
4. A roçadeira ecológica foi mais eficiente em comparação com a convencional na redução da severidade e incidência da mancha preta dos citros;
5. A utilização de uréia, cloreto benzalcônio em uma aplicação e o *Trichoderma harzianum* em duas aplicações não foram eficientes em reduzir a intensidade da mancha preta dos citros em pomar de limão verdadeiro, para as condições deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, R.L., Scaloppi, E.M.T., Goes, A., Spósito, M.B. 2012. Período de incubação de *Guignardia citricarpa* em diferentes estágios fenológicos de frutos de laranja valência. **Tropical Plant Pathology** 37(2):155-158.

Almeida, T.F. 2009. Mancha preta dos citros: expressão dos sintomas em frutos pela inoculação com conídios e controle do agente causal (*Guignardia citricarpa*). 66 f. **Tese de Doutorado**. Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

Araújo, D. 2008. Interferência do volume de pulverização no controle da mancha preta (*Guignardia citricarpa* Kiely) em frutos de laranja valência. 94 f. **Dissertação de Mestrado**. Botucatu. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

Baldassari, R.B., Goes, A., Santos, J.M., Timossi, A.J. 2001. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica** 27(1):88-92.

Baayen, R.P., Bonants, P.J.M., Verkleij, G.P., Carroll, G.C., Van der Aa, M., Weerdt, M., Brouwershaven, G.C., Schutte, G.C., Maccheroni Jr., W., Glienke-Blanco, C., Azevedo, J.L. 2002. Nonpathogenic strain of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyten of woody plants, *Guignardia mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology** 92(5):464-477.

Bellote, J.A.M. 2006. Controle de mancha preta dos frutos cítricos mediante manejo cultural. 57 f. **Dissertação de Mestrado**. Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

Bernardo, E.R.A. 2007. Controle de mancha preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico e convencional e do bolor verde em pós-colheita. 87 f. **Tese de Doutorado**. Botucatu. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

Bertol, I., Ciprandi, O., Kurtz, C., Baptista, A.S. 1998. Persistência dos resíduos de aveia e milho sobre a superfície do solo em semeadura direta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 22:705-712.

Bertol, I., Leite, D., Zoldan Jr., W.A. 2004. Decomposição do resíduo de milho e variáveis relacionadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 28:369-375.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agricultura**. 2011. Disponível em: < http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Limão_Brasil_2011.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2013a.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrofit**. 2013. Disponível em: < http://www.agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 jun. 2013b.

Brown, P.L., Dickey, D.D. 1970. Losses of wheat straw residue under simulated field conditions. **Soil Science Society of America Proceeding**. 34:118-121.

Calavan, E.C. 1960. Black spot of citrus. **The California Citrograph** 46(11):21-24.

Corá, J.E., Silva, G.O., Martins Filho, M.V. 2005. Manejo do solo sob citros. In: Mattos Junior, D., De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. (Eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Funag. cap. 12. p. 345-368.

Cardoso, S.A.B. 1998. Modelagem de curvas de maturação do limão verdadeiro (*Citrus limon L. Burmann*) na região de Botucatu, SP. 91 f. **Tese de Doutorado**. Botucatu. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Carvalho, J.E.B., Neves, C.S.V. J., Menegucci, J.L.P., Silva, J.A.A. 2005. Práticas culturais. In: Mattos Junior, D., De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. (Eds). **Citros**. Campinas. Instituto Agrônomo. cap. 16. p. 471-474.

Coggins, C.A. 1984. A basic view of the complexities of lemon production. **Citrograf** 69:93-97.

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

Donadio, L.C., Figueiredo, J.O., Pio, R.M. 1995. **Variedades cítricas brasileiras**. Jaboticabal: Funep. 228 p.

Feichtenberger, E. 1996. Mancha preta dos citros. **Laranja & Cia** 17:79-92.

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

Feichtenberger, E., Müller, G.W., Guirado, N. 1997. Doenças do citros. In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 261-296. v.2.

Feichtenberger, E., Bassanezi, R.B., Spósito, M.B, Belasque Junior, J. 2005. Doenças do citros (*Citrus* spp.). In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 239-269. v.2.

FNP Consultoria & Comercio. 2013. Tomada de decisões em laranjais pede cautela. In: _____. **Agrianual 2013: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Informa Economics FNP. p. 249-282.

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. **Phytopathology** 103:281-292.

FUNDECITRUS. 2008. **Manual de pinta preta**. Araraquara: Fundo de Defesa da Citricultura. 11 p. (Manual Técnico).

Gasparotto, L., Goes, A., Pereira, J.C.R., Baldassari, R.B. 2004. Ocorrência da Mancha preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no estado do Amazonas. **Summa Phytopathologica** 30:126.

Goes, A., Feichtenberger, E. 1993. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllostica citricarpa* (Mc Alp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** 18:318.

Goes, A., Baldassari, R.B., Feichtnberger, E., Aguilar-Vildoso, C.I., Spósito, M.B. 2000. Cracked spot, a new symptom of citrus Black spot in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**. Orlando Fl. p. 1001-1002.

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

House, G.J., Stinner, R.E. 1987. Decomposition of plant residues in no-tillage agroecosystems: influence of litterbag mesh size and soil arthropods. **Pedologia** 30:351-360.

Herbert, J.A., Grench, N.M. 1985. A strain of *Guignardia citricarpa*, the black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease** 69:1007.

IEA. Instituto de Economia Agrícola. **O mercado de lima ácida 'Tahiti'**. 2013. Disponível em: < <http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=9661>>. Acesso em: 18 abril 2013.

Laranjeira, F.F., Feichtenberger, E., Bassanezi, R.B., Spósito, M.B. 2005. Manejo integrado de doenças dos citros. In: Mattos Junior, D., De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. (Eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Funag. cap. 21. p. 631-652.

Lyon, D.J. 1998. Sunflower residue wigth and ground cover loss during Summer fallow. **Journal of Soil and Water Conservation** 35:71-73.

Kiely, T.B. 1949. Black spot of citrus. **Agricultural Gazette** 1:17-19.

Kimati, H., Bergamim Filho, A. 1996. Princípios gerais de controle. In: Bergamim Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e controle**. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 693-716. v.1.

Kimati, H., Bergamim Filho, A. Amarim, L. 2011. Princípios gerais de controle. In: Bergamim Filho, A., Rezende, J.A.M., Amorim, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e controle**. São Paulo. Agronômica Ceres. p. 308-309. v.1.

Koller, O.C. 1994. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rigel. 446 p.

Kotzé, J.M. 1981. Epidemiology and control of citrus Black spot in South Africa. **Plant Disease** 65:945-950.

Kotzé, J.M. 1964. Studies on the black spot diseases of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely, with particular reference to its epiphytology and control at Letaba. Pretoria, 143 f. **Tese de Doutorado**. Pretoria. University of Pretoria, South Africa.

Kotzé, J.M. Fungal diseases in nurseries and orchards: Black spot. In: Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press. p. 10-12, 1988.

Malavolta, E., Violante Netto, A. 1989. **Nutrição mineral, calagem, gessagem e adubação dos citros**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 153 p.

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

Mendes, M.A.S., Freitas, V.M. 2005. **Espécies invasoras para a citricultura**. Brasília: EMBRAPA. (Comunicado Técnico 130). Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot130.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2011.

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

Neves, M.F., Lopes, F.F., Trombin, V.G., Amaro, A.A., Neves, E.M., Jank, M S. 2007. **Caminhos da citricultura**. 1 ed. São Paulo: Atlas. 110 p.

Neves, M.F., Trombini, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Markestrat 137 p.

Peres, N.A., Harakava, R., Carroll, G.C., Adaskaveg, J.E., Timmer, L. W. 2007. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. **Plant Disease** 91:525-531.

Petto Neto, A. 1991. Práticas culturais. In: Rodriguez, O., Viegas, F., Pompeu Júnior, J. **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill. p. 476-490.

Raetano, C.G. 1996. Condições operacionais de turboatomizadores na distribuição e deposição da pulverização em citros. 92 f. **Tese de Doutorado**. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Ramos, H.H., Yanai, K., Araújo, D., da Rocha, S.D.R., Spósito, M.B., Bassanezi, R.B. 2007. Estado da arte na tecnologia de aplicação em frutíferas – volume de aplicação e diâmetro de gotas. **Summa Phytopathologica** 33:110-112. Suplemento.

Rigolin, A.T., Tersi, F.E.A. 2005. Mecanização em Citros. In: Mattos Jr, D., De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Jr, J. (Eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo. cap.15. p. 429-447.

Rose, M.P., Figueiredo, J.O., Stuchi, E.S., Cardoso, S.A.B. 2005. Variedades copas. In: Mattos Junior, D., De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. (Eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Funag. cap. 3. p. 37-60.

Rossêto, M.P. 2009. Resistência varietal e manejo da mancha preta dos citros. 75 f. **Dissertação de Mestrado**. Campinas. Instituto Agrônômico de Campinas.

Scaloppi, E.M.T. 2010. Mancha preta dos citros: técnicas de manejo e queda precoce de frutos. 84 f. **Tese de Doutorado**. Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

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** 96:1225.

Schutte, G.C., Tolling, B., Mansfield, R.I., Kotzé, J.M. 1996. Effect of kresoxim-methyl and azoxystrobin for the control benzimidazole resistant strain of citrus black spot. **Proceedings International Society Citriculture** 1:345-349.

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

Sivanesan, A. 1984. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphus**. Germany. J. Cramer. 701 p.

Silva, S.X.B., Nunes, C.C.S., Santana, O.S., Guimarães, R.S., Santos Filho, H.P., Aguilar-Vildoso, C.I. 2012. Serviço de vigilância ativa da defesa agropecuária detectou nova ocorrência fitossanitária na citricultura baiana. **Seagri**. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/bahia_agricola_v9_n2/3_comunicacao04v9n2.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2013.

Smith, J.H., Douglas, C.L. 1968. Influence of residue nitrogen on wheat straw decomposition in the field. **Soil Science** 106:456-459.

Spósito, M.B. 2003. Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. 112 f. **Tese de Doutorado**. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Spósito, M.B. 2006. Mancha ou Pinta-Preta dos citros. In: Zambolim, L, Bassanezi, R.B. (Eds). **Doenças quarentenárias dos citros**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. cap 4. p. 93-108.

Spósito, M.B., Amorin, L., Ribeiro Junior, 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., Amorin, 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., Amorin, L., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Felipe, 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.

Stroo, H.F., Bristow, K.L., Eliot, L.F., Papendick, R.I., Campbell, G.S. 1989. Predicting rates of wheat residue decomposition. **Soil Science Society of America Proceeding** 53:91-99.

Stammler, G., Schute, G.C., Speakman, J., Miessner, S., Crous, P.W. 2010. *Phyllosticta* species on citrus: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochromus b gene sequences. **Crop Protection**. 48:6-12.

Stringari, D., Glienke, C., Christo, D., Maccherone Jr, W., Azevedo, J.L. 2009. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia magiferae* and new primers of the diagnosis of the citrus black spot. **Brazilian Archiver of Biology and Tecnology** 52(5):1063-1073.

Sutton, B.C., Waterston, J.M. 1966. *Guignardia citricarpa*. Kew: C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 85, CAB International, Wallingford, UK.

Tauk, S.M. 1988. Aspectos da microbiota fúngica no solo de cultura de milho (*Zea mays*), tratado com vinhaça no município de Rio Claro-SP. **Revista de Microbiologia** 19(3):282-289.

Teixeira, D.C., Ayres, A.J., Kitajima, E.W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., Bové, J. M. 2005. First report of a huanglongbing – like disease of citrus in São Paulo state, Brazil and association o new liberibacter species, “*candidatus liberibacter americanus*” with the disease. **Plant Disease** 89:107.

Teixeira, D.C., Wulff, N.A., Martins, E.C., Kitajima, E.W., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Eveillard, S., Saillard, C., Bové, J.M. 2008. A phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches´-Broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus *huanglongbing* symptoms in the São Paulo, Brazil. **Phytopathology** 98:977-984.

Tolling, B., Merwe, J.L., Van Der, Schutte, G.C. 1996. Bas 490 F: A new fungical strobirulin for the control of citrus black spot. **Proceedings International Society Citriculture**. p.369-371. v.1.