

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SENSIBILIDADE E MONITORAMENTO GENÉTICO DE
POPULAÇÕES DE *Phyllosticta citricarpa* A FUNGICIDAS
INIBIDORES DA QUINONA EXTERNA (QoI)**

Nadia Maria Poloni
Engenheira Agrônoma

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SENSIBILIDADE E MONITORAMENTO GENÉTICO DE
POPULAÇÕES DE *Phyllosticta citricarpa* A FUNGICIDAS
INIBIDORES DA QUINONA EXTERNA (QoI)**

Nadia Maria Poloni

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Coorientadoras: Dra. Kelly Simões

Dra. Fernanda Dias Pereira

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias -
UNESP, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutora em
Agronomia (Produção Vegetal)

2020

P778s Poloni, Nadia
Sensibilidade e monitoramento genético de populações de
Phyllosticta citricarpa a fungicidas inibidores da quinona
externa (Qol) / Nadia Poloni. -- Jaboticabal, 2020
75 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Antonio de Goes
Coorientadora: Kelly Simões

1. Citrus sinensis. 2. Mancha preta dos citros. 3.
Estrobilurinas. 4. Resistência a fungicidas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: SENSIBILIDADE E MONITORAMENTO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE *Phyllosticta citricarpa* A FUNGICIDAS INIBIDORES DA QUINONA EXTERNA (Qol)

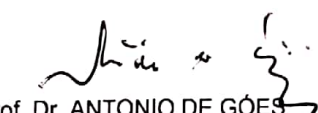
AUTORA: NADIA MARIA POLONI

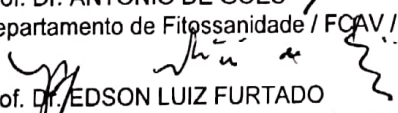
ORIENTADOR: ANTONIO DE GÓES

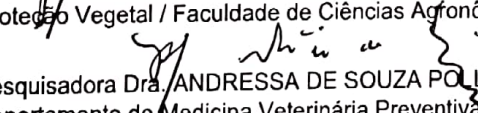
COORDINADORA: KELLY SIMÕES

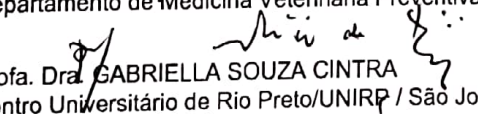
COORDINADORA: FERNANDA DIAS PEREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANTONIO DE GÓES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP


Pesquisadora Dra. ANDRESSA DE SOUZA POLLO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV/UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. GABRIELLA SOUZA CINTRA
Centro Universitário de Rio Preto/UNIRP / São José do Rio Preto/SP


Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO
Vice-Diretoria / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 10 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Nadia Maria Poloni – Brasileira, nascida em 09 de janeiro de 1990 na cidade de Poloni, SP. Filha de Rui Antonio Poloni e Nadir Aparecida da Silva Poloni. Ingressou em agosto de 2008 no curso de Agronomia na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia, Câmpus de Ilha Solteira/SP. Durante o período de graduação desenvolveu trabalhos na área de Fitopatologia sob orientação do Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini. Também foi bolsista PIBIC e monitora da disciplina de Fitopatologia Geral. Em agosto de 2013 obteve o título de Engenheira Agrônoma e em março de 2014 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Sistemas de Produção) na mesma instituição, na linha de pesquisa de Genética, Melhoramento Vegetal e Propagação de Plantas, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini. Concluiu o mestrado com a dissertação intitulada “Distribuição generalizada da resistência a fungicidas triazóis e evolução do gene *cyp51A* em populações de *Pyricularia oryzae* da brusone do trigo no Brasil”. Em março de 2016 foi aprovada para cursar o Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal/SP, na linha de pesquisa de Manejo e Controle de Pragas e Doenças, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes, com trabalho intitulado “Sensibilidade e monitoramento genético de populações de *Phyllosticta citricarpa* a fungicidas inibidores da quinona externa (QoI)”.

“Many times I've been alone
And many times I've cried
Anyway you've never known
The many ways I've tried
But still they lead me back
To the long winding road
(..)
Don't leave me waiting here
Lead me to your door”
The Beatles

“Toda nossa ciência comparada com a realidade é
primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa
que temos.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as portas abertas, por me guiar e abençoar por todos os caminhos que segui até agora. Pela força em todos os momentos de necessidade e pela esperança de dias melhores.

Aos meus pais Nadir e Rui, que sempre me apoiaram e fizeram de tudo para que eu pudesse estudar e estar aqui, por estarem sempre perto em todos os momentos da minha vida, sem medir esforços. Por me ensinarem que a vida é repleta de desafios a serem superados a cada dia, sem jamais desistir.

Às minhas irmãs Katia e Flavia, pelo amor, pela amizade, companheirismo, cumplicidade e apoio que me proporcionam em todos os momentos da minha vida.

Às minhas avós Marias (*in memoriams*), pelo apoio à minha formação e todo amor concedido, e que hoje se orgulhariam dessa conquista.

Ao João Fischer, meu companheiro e melhor amigo, que sempre esteve ao meu lado e estimulou meu desenvolvimento científico e pessoal, obrigada por todo amor, carinho, paciência, dedicação, compreensão e apoio em todos os momentos de dificuldade e também de alegria, tornando meus dias mais felizes e especiais. Obrigada pelo auxílio nos experimentos, e obrigada por me fazer feliz e fazer minha vida melhor a cada dia.

À Márcia, João, Nathália, Nayara Fischer, Juliano Malagezi, Guilherme Wittig e Jonas Felinto por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Às minhas sobrinhas Yasmin e Liz Fischer e à minha afilhada Helena Rybka Afonso, pelo amor incondicional e fonte de inspiração.

À toda minha família, pelo amor e carinho recebidos e pela felicidade que com ela compartilho.

Aos meus amigos de longa data, que mesmo à distância, sempre se fizeram presentes na minha vida e estarão sempre em meu coração. Obrigada pelo companheirismo, apoio e amizade incondicional.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal/SP, pela oportunidade de realizar o Doutorado. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador professor Dr. Antonio de Goes pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, amor à profissão, pelo apoio incondicional, amizade, confiança, seriedade de sempre, ideias, sugestões e agradável convívio.

À professora Dra. Rita Panizzi pelo empenho em transmitir os conhecimentos, convívio, amizade e contribuição para minha formação.

À coorientadora Dra. Fernanda, pela amizade, apoio em todos momentos, conselhos e auxílio ao longo da tese.

Aos amigos do laboratório e pós-graduação João Batista, Mariana Rodrigues, Helen Pereira, Gabriel Salgado, Larissa Nogueira, agradeço por toda amizade, carinho, convivência, conversas, apoio e bons momentos compartilhados.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia, agradeço a Rosângela, Luiz Carlos e Wanderley (Fordinho) pela convivência, atenção e apoio.

Ao professor Dr. Paulo Ceresini, que mesmo distante auxiliou no desenvolvimento do trabalho, cedendo gentilmente o seu laboratório na Unesp de Ilha Solteira. Também aos meus amigos de Ilha Solteira, em especial à Samara Campos e Priscila Casado, pela amizade, companhia, carinho, gentileza e conselho.

À pesquisadora e coorientadora Dra Kelly Simões, pela sua disponibilidade e auxílio nas análises. Muito obrigada pela paciência nos procedimentos e técnicas moleculares, pelo suporte durante toda a realização dos ensaios. Também te agradeço pela confiança, e por tudo que pude aprender durante meus dias na Basf, Estação Experimental de Santo Antônio da Posse.

À direção da Basf por permitir meu aprimoramento profissional; a todos os funcionários da empresa que sempre foram solícitos e gentis durante minha permanência, em especial à equipe do laboratório de Resistência, sob coordenação do Dr. Fernando Gava e Dra. Kelly Simões. Agradeço à Karen Assi, Fer Zaninette, Jackeline, Gabrielle, Daniel, muito obrigada pelos ensinamentos, ajuda, comprometimento, confiança, acolhida, convívio agradável e amizade.

À minha amiga Carolina Franco e ao Eduardo Bizari, por terem me acolhido, agradeço pela hospedagem, amizade, convívio, parceria e pelos momentos de

descontração que foram essenciais para superação dos momentos difíceis dessa etapa.

Aos Engenheiros Agrônomos Eder Giroto, da Cutrale e Nelcir Alves de Oliveira, da Coopercitrus, pela coleta e envio de amostras de frutos cítricos utilizados em nossos estudos.

A todos que em algum momento influenciaram minha vida e nunca me negaram ajuda.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Importância da citricultura	4
2.2 Mancha preta dos citros	5
2.3 Gênero <i>Phyllosticta</i> e etiologia de <i>Phyllosticta citricarpa</i>	8
2.4. Identificação de <i>Phyllosticta citricarpa</i> por marcador morfológico	9
2.5 Epidemiologia da mancha preta dos citros.....	10
2.6 Sintomatologia da mancha preta dos citros.....	11
2.7 Estratégias de manejo nos pomares	12
2.7.1 Controle genético	12
2.7.2 Controle cultural	13
2.7.3 Controle químico	14
2.8 Resistência a fungicidas do grupo químico das estrobilurinas	15
2.9 Sequenciamento de DNA.....	17
2.10 A história do íntron	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material biológico	20
3.2 Identificação de isolados de <i>Phyllosticta citricarpa</i> por marcador morfológico meio aveia-água.....	21
3.3 Avaliação da sensibilidade de isolados de <i>Phyllosticta citricarpa</i> a fungicidas QoI trifloxistrobina e piraclostrobina	21
3.4 Análises moleculares	23
3.4.1 Extração de DNA.....	23
3.4.2 Desenvolvimento dos primers	24
3.4.3 Reações de PCR.....	24
3.4.4 Pirosequenciamento para mutação F129L no gene <i>cyb b</i>	25

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Identificação de <i>Phyllosticta citricarpa</i> por marcador morfológico em meio aveia-ágar	27
4.2 Variação na sensibilidade de populações de <i>Phyllosticta citricarpa</i> aos fungicidas QoI trifloxistrobina e piraclostrobina	28
4.3 Análises moleculares	36
4.3.1 Pirosequenciamento para mutação F129L no gene <i>cyt b</i>	36
4.4 Sensibilidade e monitoramento genético.....	38
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS.....	43

**SENSIBILIDADE E MONITORAMENTO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE
Phyllosticta citricarpa A FUNGICIDAS INIBIDORES DA QUINONA EXTERNA
(QoI)**

RESUMO – A mancha preta dos citros (MPC), causada por *Phyllosticta citricarpa*, é uma doença quarentenária, e está presente em diversos países do mundo. Os frutos sintomáticos têm seu valor depreciado para o mercado de frutas frescas, e em pomares com elevada severidade mais de 85% dos frutos podem cair prematuramente. Não há variedades de laranjeiras doces resistentes, sendo o controle feito por meio de medidas culturais e por meio de fungicidas do grupo das estrobilurinas, constituindo-se da melhor alternativa, além de praticamente ser única. Nas diversas regiões produtoras do mundo, incluindo o Brasil, são realizadas diversas aplicações destes fungicidas há quase duas décadas. Neste estudo, foi caracterizada a sensibilidade de 50 isolados de *P. citricarpa* oriundos das mais importantes regiões citrícolas do Brasil, aos fungicidas trifloxistrobina e piraclostrobina, os mais utilizados para o controle da MPC. Os isolados foram avaliados a 0,0003; 0,003; 0,03; 0,3; 3,0; 30,0 e 300,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo empregado o método da microtitulação. Isolados com valores de EC_{50} considerados resistentes a uma ou mais estrobilurinas avaliadas foram submetidos à busca de mutações no gene *cyt b*. A pesquisa concentrou-se na investigação da mutação na região F129L, a qual é de ocorrência generalizada e confere resistência do fungo aos fungicidas do grupo das estrobilurinas, utilizando para isso sequenciamento de parte do gene *cyt b*. Fenótipos extremos de sensibilidade e resistência a ambos fungicidas estrobilurinas foram detectados nas diferentes populações do patógeno analisadas pela microtitulação. Na busca de mutações no gene *cyt b*, a mutação F129L não foi encontrada por pirosequenciamento. A ausência dessa mutação no gene da *cyt b* dos isolados considerados resistentes sugere que outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos. Os resultados obtidos com esse estudo podem servir de suporte para a tomada de decisões de manejo adequado para a citricultura brasileira; além disso, são importantes para futuros estudos sobre a evolução do patógeno com a pressão de seleção exercida pelos fungicidas.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*, mancha preta dos citros, estrobilurinas, resistência a fungicidas

SENSITIVITY AND GENETIC MONITORING OF *Phyllosticta citricarpa* POPULATIONS TO QUINONE OUTSIDE INHIBITORS (QoI) FUNGICIDES

ABSTRACT - The black spot of citrus (MPC), caused by *Phyllosticta citricarpa*, is a quarantine disease, and is present in several countries of the world. Symptomatic fruits have their value depreciated for the fresh fruit market, and in orchards with high severity more than 85% of the fruits may fall prematurely. There are no resistant sweet orange varieties, and the control is done by means of cultural measures and by means of strobilurin fungicides, constituting the best alternative, besides being practically unique. In the various producing regions of the world, including Brazil, several applications of these fungicides have been carried out for almost two decades. In this study, the sensitivity of 50 isolates of *P. citricarpa* from the most important citrus regions in Brazil to the fungicides trifloxystrobin and pyraclostrobin, the most used for the control of MPC, was characterized. The isolates were evaluated at 0.0003; 0.003; 0.03; 0.3; 3.0; 30.0 and 300.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, using the microtiter method. Isolates with EC_{50} values considered resistant to one or more strobilurins evaluated were subjected to the search for mutations in the *cyt b* gene. Extreme phenotypes of sensitivity and resistance to both strobilurin fungicides were detected in the different populations of the pathogen analyzed by microtiter. In the search for mutations in the *cyt b* gene, the F129L mutation was not found by pyrosequencing. The absence of this mutation in the *cyt b* gene of isolates considered resistant suggests that other mechanisms of resistance may be involved. The results obtained with this study can serve as a support for making appropriate management decisions for Brazilian citrus; in addition, they are important for future studies on the evolution of the pathogen with the selection pressure exerted by fungicides.

Keywords: *Citrus sinensis*, citrus black spot, strobilurins, fungicide resistance

1. INTRODUÇÃO

Os citros são produzidos em todos os continentes do mundo, com destaque para as Américas e Ásia, onde se encontram os maiores produtores como Brasil, Estados Unidos da América, e China (Agrianual, 2019). No Brasil, as maiores produções estão concentradas no cinturão citrícola dos Estados de São Paulo e no Triângulo Mineiro, em Minas Gerais.

No Brasil, os citros são afetados por diversos problemas de ordem fitossanitária, com destaque para *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Ca Li americanus*, agentes causais de huanglongbing, HLB ou greening, uma doença devastadora em diversas partes do mundo, e também no Brasil (Miranda et al., 2011), e *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine), agente causal da mancha preta dos citros (MPC) (Silva Júnior et al., 2016).

A MPC é uma doença quarentenária, presente em vários continentes, que atinge principalmente os frutos, causando depreciação e queda, quando não controlada adequadamente (CABI/EPPO, 2016). Esta doença foi descrita no Brasil em 1980, e está presente em diversas regiões produtoras (Silva Júnior et al., 2016). Todas as espécies de citros de importância econômica são suscetíveis ao patógeno. O controle do agente causal é realizado principalmente com o uso de fungicidas do grupo das estrobilurinas, também conhecidos como inibidores extracelulares da quinona externa (QoI) (Silva Júnior et al., 2016).

Em citros, o uso de fungicidas QoIs foi implementado a partir de 1997 (Stammler et al., 2013), e atualmente constitui na ferramenta mais eficiente no controle de *P. citricarpa* (CABI/EPPO, 2016). No Brasil, devido à necessidade do controle deste patógeno, assim como de outros fungos fitopatogênicos associados à cultura dos citros, são realizadas pelo menos cinco aplicações anuais, na maioria das vezes de forma sequencial. Para o caso de áreas cujos frutos são destinados ao mercado *in natura*, o número de aplicações destes fungicidas poderá ser significativamente mais elevado (Silva Júnior et al., 2016).

Os fungicidas QoI resultam em eficiente controle da doença no campo, porém o uso desse grupo de fungicidas sistêmicos resulta no risco de seleção de indivíduos

resistentes devido, principalmente, ao seu modo de ação ‘uni-sítio’ (Ma et al., 2003), e também pela elevada exposição oriundo do uso recorrente e de forma sequencial. Aos fungos sensíveis, seu efeito manifesta-se com a obstrução da respiração mitocondrial. Embora eficientes para o controle de numerosos gêneros de fungos, este modo de ação único mostra-se vulnerável pelos riscos de resistência dos patógenos. Uma alternativa para prolongar o tempo de eficiência dos fungicidas em nível de campo, é o uso de formulações comerciais contendo diferentes grupos químicos, que é altamente recomendada. Exemplos dessa mistura disponíveis no mercado são as marcas comerciais constituídas por fungicidas QoI e os inibidores da biossíntese de ergosterol ou inibidores da desmetilação (DMI), como os triazóis, e carboxamidas, inibidores da enzima succinato desidrogenase - SDHI (Fundecitrus, 2019). Entretanto, devido às limitações das combinações dos ingredientes ativos nas formulações comerciais, e também pelo custo, torna-se mais indicado o emprego das formulações contendo exclusivamente os fungicidas QoI, porém acrescido de fungicida protetor.

A resistência dos fungos aos fungicidas pode ser considerada como uma “redução hereditária adquirida, na sensibilidade de um fungo a um agente antifúngico específico (ou fungicida)” (Frac, 2014). Diversos fatores devem ser levados em consideração quando se avalia o risco de seleção das populações resistentes a fungicidas, sendo os principais deles relacionados ao patógeno alvo e ao produto a ser utilizado para o controle do patógeno. O modo de ação (uni-sítio ou multi-sítio) é a principal característica relacionada ao risco de seleção de fungos resistentes ao fungicida. As características relacionadas ao patógeno incluem a variabilidade genética, o tempo de geração e adaptabilidade dos isolados resistentes em relação à população sensível (Leadbeater, 2012).

Os relatos de resistência ao grupo químico dos QoI indicam que a resistência de fungos ocorre, na maioria das vezes, por meio de mutações pontuais no gene do citocromo b (*cyt b*). Seguida à mutação, o aminoácido trocado pode imprimir diferenças na eficiência de ligação entre as moléculas do fungicida, caracterizando uma perda diferencial da sensibilidade em maior ou menor grau. As mutações, que podem ocorrer no *cyt b*, podem conferir resistência completa aos ingredientes ativos

quando ocorrem na posição G143A, ou parcial, quando nas posições F129L e G137R (Brent e Hollomon, 2007b).

Dessa maneira, um estudo que visa avaliar o comportamento de populações de *P. citricarpa* aos fungicidas QoI, assim como prospectar possíveis alterações genéticas decorrentes possivelmente da pressão seletiva faz-se de vital importância. Captar e interpretar tais comportamentos e possíveis alterações poderão prover informações fundamentais à racionalização do manejo da doença e evitar perdas de produção e de produtividade dos pomares, além de contribuir à longevidade e eficiência das moléculas químicas.

Em vista do elevado nível de exposição de *P. citricarpa* decorrente do uso intensivo de fungicidas QoI nos citros, no Brasil, e visando uma atualização das estratégias de seu manejo, este trabalho tem como objetivos caracterizar as populações de 50 isolados de *Phyllosticta citricarpa* quanto a sensibilidade aos fungicidas piraclostrobina e trifloxistrobina, utilizados para o controle da MPC no Brasil, e em etapa subsequente investigar a presença de mutações no gene *cyt b* em isolados resistentes utilizando para isso o sequenciamento de um fragmento do gene *cyt b*. A pesquisa concentrou-se na investigação da mutação na região F129L, a qual é de ocorrência generalizada e confere resistência do fungo aos fungicidas do grupo das estrobilurinas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da citricultura

Os citros compreendem um complexo de plantas pertencentes não apenas ao gênero *Citrus*, mas também a outros gêneros afins, como *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia*, que produzem frutos semelhantes à laranja ou ao limão (Passos et al., 2005). Estima-se que o gênero *Citrus* e seus correlatos surgiram há cerca de 20 a 30 milhões de anos e tiveram como centro de origem e diversidade as regiões tropicais e subtropicais do continente Asiático, de onde foram levados para outros continentes (Webber, 1967). No Brasil, as primeiras plantas cítricas foram introduzidas pelos portugueses, que trouxeram as mudas da Espanha, logo no início da colonização (Neves e Jank, 2006).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, a produção mundial de todas as frutas cítricas em 2016 foi de 124 milhões de toneladas, cobrindo uma área de aproximadamente 7,5 milhões de hectares (FAO, 2016).

De acordo com a Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento (UNCTAD), a produção de citros apresentou um crescimento significativo a partir do início do século 21, principalmente pelo aumento nas áreas de cultivo, melhorias no transporte e embalagem, aumento da renda e preferência do consumidor por alimentos saudáveis (FAO, 2016). Em 2019/20, a produção mundial de laranjas foi estimada em 47,5 milhões de toneladas, liderada pelo Brasil, China, União Europeia, Estados Unidos e México como os maiores produtores (USDA, 2020).

A citricultura brasileira, em particular, é reconhecida por mostrar-se um setor organizado e competitivo, o que resulta em grandes benefícios socioeconômicos ao País. O Brasil destaca-se na produção mundial de citros, sendo líder na exportação de suco de laranja. A safra de laranja 2019/20 do parque citrícola de São Paulo e Triângulo e Sudoeste Mineiro foi estimada em 386,79 milhões de caixas de 40,8 kg, ou seja, 35,3% acima da anterior e 21% superior à média dos últimos dez anos (Fundecitrus, 2019). A citricultura brasileira é responsável por mais de 80% das

exportações mundiais de suco de laranja, e por mais de 30% da produção mundial da fruta (Santos, 2019).

A contribuição social da cadeia produtiva do setor citrícola do Brasil é muito relevante, sendo responsável pela geração de milhares de empregos diretos e indiretos. Este setor, em 2019, foi responsável pela geração de cerca de 5% dos empregos totais no Brasil, contribuindo significativamente do ponto de vista social e econômico. Quase a totalidade do suco de laranja produzido no país é exportada, cuja contribuição à economia é de extrema relevância, de cerca de 1,5 bilhões de dólares anuais (Santos, 2019).

Os maiores importadores de suco de laranja são a União Europeia e os Estados Unidos da América, representando entre 65 e 70% para o primeiro, e 20 a 25% para o segundo grupo de importação (Brasil Agro, 2019).

No Brasil, especialmente em São Paulo e no Triângulo Mineiro, predominam o cultivo de laranjas doces, tangerinas, limas ácidas e limões (Fundecitrus, 2019). As laranjas doces correspondem a cerca de 55% da área cultivada, com cerca de 395,7 mil hectares (Fundecitrus, 2019).

2.2 Mancha preta dos citros

O complexo agroindustrial citrícola brasileiro vem sendo ameaçado por vários problemas fitossanitários, especialmente as doenças. Dentre as muitas doenças que afetam as plantas cítricas no país, mais de cinquenta delas são atribuídas a fungos, com destaque para a mancha preta ou pinta preta (Feichtenberger e Spósito, 2004). Além das doenças causadas por fungos, as de origem bacterianas, como o cancro cítrico e HLB ou greening, ocupam também local de destaque (Bassanezi et al., 2017).

A mancha preta dos citros (MPC) afeta a casca dos frutos cítricos, causando sua depreciação, e quando em níveis severos causa queda, resultando em diminuição significativa de produtividade. Esta doença, quando não satisfatoriamente controlada e em áreas de elevado nível de inóculo, pode causar prejuízos de mais de 80% da produção (Aguilar-Vildoso et al., 2002). Os maiores níveis de severidade de sintomas e de perdas ocorrem em laranjeiras doces, principalmente as de

madureza tardia, que provoca em média queda de 47% de frutos, assim como em limões verdadeiros pela sua alta suscetibilidade (Silva Júnior et al., 2016).

No mercado de frutas *in natura*, os frutos sintomáticos têm seu preço depreciado, embora as partes internas dos frutos mostrem-se inalterados. Quando para exportação, devido ao caráter quarentenário da doença, os frutos devem ser produzidos em áreas livres da doença, ou sobre rígido manejo para a obtenção de frutos sadios (Silva Júnior et al., 2016).

A MPC é uma doença quarentenária A1 para os países da União Europeia, os mais importantes importadores, e Estados Unidos da América, cujo nível de tolerância é zero (Scaloppi, 2006). O custo de controle da doença é elevado, o qual, quando para exportação, é necessário à adoção de cuidados mais refinados, tanto na pré-colheita, como nas fases subsequentes, incluindo testes de indução de sintomas para certificação fitossanitária (Baldassari et al., 2007).

A MPC é causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely), descrita pela primeira vez na Austrália, em 1895 (Sutton e Waterston, 1966). Posteriormente, em 1929, a doença foi relatada na África do Sul (Doidge, 1929) e depois em diversos países da Ásia, África, Américas e Oceania (Kotzé, 1988). Atualmente, com exceção da Europa, a doença encontra-se relatada em quase todos os continentes, nas regiões tropicais e subtropicais onde são produzidos citros (CABI/EPPO, 2012). Para o caso do continente europeu, mediante estudos envolvendo análises de folhas de laranjeiras e limões, coletadas na Itália, Malta e Portugal, foi apontada a presença do fungo em tais tecidos (Guarnaccia et al., 2017). Entretanto, em estudos complementares por meio de testes de patogenicidade dos isolados de *P. citricarpa* obtidos, estes não induziram sintomas da doença, mostrando-se não patogênicos. Tais resultados e suas consequências mostram desdobramentos incertos e controversos (EFSA PLH, 2014).

No Brasil, a MPC está presente nos Estados das regiões Sudeste (Robbs et al., 1980; Robbs, 1990; Goes e Feichtenberger, 1993; Costa et al., 2003; Baldassari, et al., 2004), Sul (Goes e Feichtenberger, 1993; Andrade, et al., 2004; Caixeta et al., 2005; Nunes et al., 2006), e em parte dos Estados das regiões Centro-Oeste (Agrodefesa, 2016), Norte (Gasparotto, et al., 2004; Vieira Júnior et al., 2010) e Nordeste (Silva Júnior et al., 2016). Efetivamente, no Estado de São Paulo a doença

foi detectada em níveis alarmantes a partir de 1992, em limões e laranjas de maturação tardia, nos municípios de Conchal e Engenheiro Coelho (Goes e Feichtenberger, 1993). Posteriormente, e mesmo nos tempos atuais, a doença ocorre endemicamente em todas as regiões produtoras do Estado, porém sendo estrategicamente bem controlada (Silva Júnior et al., 2016; Fonseca, 2017).

Com exceção da laranja azeda (*Citrus aurantium*) e seus híbridos, praticamente todas as variedades de laranja doce (*C. sinensis*), limões verdadeiros (*C. limon*), pomelos (*C. paradisi*), algumas variedades de tangerinas (*C. reticulata*) como Ponkan, Cravo e do Rio, limeiras doce, como a Lima da Pérsia (*C. limettioides*) e tangores (*C. sinensis* x *C. reticulata*), especialmente o Murcott, são suscetíveis à doença. Até o momento não foram observados sintomas da doença em frutos de lima ácida Tahiti (*C. aurantifolia*) (Fundecitrus, 2005), embora o patógeno encontre-se endofiticamente nos tecidos foliares (Baldassari et al., 2008).

No estado de São Paulo, os maiores problemas da MPC são observados nas regiões Leste, Centro e Norte. De maneira geral, a doença pode se estabelecer em todas as regiões brasileiras, porém os níveis mais elevados dos sintomas são observados em pomares mais velhos, com manejo cultural inapropriado, com deficiência nutricional acentuada, com muitas plantas doentes e precário manejo fitossanitário. Aparentemente, e com pouca exceção, a doença está presente em todas as regiões produtoras de citros no Brasil (Silva Júnior et al., 2016).

2.3 Gênero *Phyllosticta* e etiologia de *Phyllosticta citricarpa*

Phyllosticta corresponde à fase anamórfica de um importante gênero de fungos associados ao reino vegetal, apresentando ampla abrangência geográfica e comportamento ecológico (Baayen et al., 2002; Glienke et al., 2011; Wikee et al., 2011). Fungos desse gênero podem apresentar comportamento saprofítico, endofítico e também patogênico, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais. Dentre os fungos deste gênero incluem-se, além de *P. citricarpa*, as espécies *P. capitalensis*, *P. citrichinaensis*, *P. citribraziliensis*, *P. citrimaxima*, *P. paracitricarpa*, *P. paracapitalensis* e *P. citriasiana* (Wulandari et al., 2009; Glienke et al., 2011; Wang et al., 2011; Wikee et al., 2013; Guarnaccia et al., 2017). O conhecimento atual sobre a distribuição dessas espécies de *Phyllosticta* revela que

a maioria delas está presente na Ásia, onde os citros se originaram (Wu et al., 2018).

Phyllosticta citricarpa está inserida no Reino Fungi, Sub-reino Dycaria, Filo Ascomycota, Classe Dothiomycetes, Ordem Botryosphaeriales e família Phyllostictaceae. Foi descrita pela primeira vez em 1889 por McApline, recebendo a denominação de *Phoma citricarpa* McApline. A fase telomórfica ou sexuada (*Guignardia citricarpa*) foi descrita em 1948, por Kiely (Kiely, 1948). A fase anamórfica foi reclassificada em 1973 a partir da qual recebeu a designação atual *P. citricarpa* (Baayen et al., 2002; Wikee et al., 2011). As fases sexual e assexual são frequentemente encontradas no campo, respectivamente em folhas caídas, e nos órgãos aéreos como folhas, frutos e ramos secos (Silva Júnior et al., 2016). Sob condições de laboratório, pela natureza heterotática do patógeno, é rara ou quase impossível a obtenção da fase sexual (Timossi et al., 2003).

Por muitos anos, espécies de *Phyllosticta* foram nomeadas em sua fase sexual como *Guignardia* spp. porém, com a nova nomenclatura de fungos aprovada em 2011 (“Melbourne Code”), a nomenclatura binomial para fungos foi abolida, dando-se prioridade ao nome da forma (sexuada ou assexuada) com a qual o fungo foi inicialmente descrito. No caso do agente causal de MPC, como a forma assexuada do fungo foi descrita antes da forma sexuada, a designação *P. citricarpa* torna-se cientificamente correta, e deve ser exclusivamente adotada (Silva Júnior et al., 2016). Porém, nos dias atuais encontram-se divergências quanto às designações a serem adotadas.

O gênero *Phyllosticta* já foi relatado em diferentes espécies de citros e também em outros hospedeiros, mas nem sempre esteve associado aos sintomas da mancha preta dos citros. Inicialmente, duas espécies foram relatadas em plantas de citros, sendo a *P. citricarpa*, causadora da mancha preta, e a *P. capitalensis*, uma espécie endofítica. Baayen e colaboradores demonstraram por meio de estudos moleculares e cultivo *in vitro* que a cepa saprotrófica era, na verdade, outra espécie conhecida como *Guignardia mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), geralmente endofítica de plantas lenhosas (Baayen et al., 2002; Bonants e Carroll, 2003). Porém, com o uso das técnicas de sequenciamento de DNA, a partir da década de 2000 as espécies foram claramente distinguidas, facilitando sua classificação

taxonômica. Acresce-se, ainda, que *P. capitalensis* é apatogênica aos citros e é de natureza homotática (Silva Júnior et al., 2016).

2.4 Identificação de *Phyllosticta citricarpa* por marcador morfológico

As duas variantes de *Phyllosticta* que ocorrem em citros, a patogênica e a endofítica (McOnie, 1964a; Kotzé, 1981), apresentam diferenças fisiológicas e genéticas, apresentando padrões distintos quanto à morfologia da colônia, velocidade de crescimento no meio de cultivo e formação de halo em torno da colônia em meio de cultivo aveia-água (AA) (Silva Júnior et al., 2016). Por exemplo, em culturas de *P. citricarpa* em meio de cultura aveia-água, após sete dias de incubação em ambiente apropriado observa-se colônias com bordas apresentando halo tipicamente amarelado, sendo este inexistente em colônias de *P. capitalensis*, nas mesmas condições. Dessa forma, a identificação torna-se viável e, de forma prática, possibilita-se a distinção entre as formas patogênicas e endofíticas (Baayen et al., 2002; Baldassari, et al., 2008; Wickert e Goes, 2009).

Mediante a avaliação das características morfológicas da colônia de isolados de *Phyllosticta* spp. em meio batata-dextrose-água (BDA) também pode-se discriminar, de forma simples, rápida e com fidelidade, isolados supostamente patogênicos dos não patogênicos (Silva-Pinhati et al., 2009). No caso dos isolados de *P. citricarpa*, a colônia típica tem coloração escura, cinza a negra, de aspecto granuloso com margens lobosas e micélio submerso. Seu crescimento é mais lento que o de *P. capitalensis* em meio de cultivo BDA, atingindo 7 cm de diâmetro em 20 dias a 28°C (Baayen et al., 2002; Baldassari et al., 2007; Silva Júnior et al., 2016). Já as colônias de *P. capitalensis* têm uma conformação mais esponjosa, crescimento micelial compacto, às vezes com presença de invaginações, e as bordas das colônias são tipicamente arredondadas (Baldassari e Goes, 2006; Baldassari et al., 2008; Silva-Pinhati et al., 2009).

A detecção do patógeno deve ser feita pela associação das características morfológicas da colônia e do patógeno e das características genéticas (Silva Júnior et al., 2016). A triagem fazendo uso das características culturais ou morfológicas para separar *P. citricarpa* de *P. capitalensis* é uma importante etapa, mas não substitui a análise genética aplicável à distinção.

2.5 Epidemiologia da mancha preta dos citros

De acordo com McOnie (1964b), em sua fase sexual o fungo causal da MPC produz pseudotécios e ascósporos somente em folhas em decomposição no solo, não sendo produzidos em lesões de frutos e em folhas ainda aderidas às plantas. Tais pseudotécios são estruturas com diâmetro entre 100 e 175 μm , globosos, podendo estar isolados ou agregados (Sutton e Waterston, 1966). Dentro dos pseudotécios são formadas as ascas onde são formados oito ascósporos (Kotzé, 1988).

Na fase assexual, o fungo produz picnídios em lesões contidas em frutos, ramos e folhas (Sivanesan, 1984), ou em folhas cítricas caídas sob a copa das plantas (McOnie, 1964b). Nos ramos secos são também produzidos enorme quantidade de picnídios e conídios. Quando os picnídios estão maduros, em seu ostíolo emergem os conídios envolvidos por uma substância mucilaginosa clara denominada cirro (Silva Júnior et al., 2016).

No Brasil, as infecções dos frutos originam-se a partir dos dois tipos de esporos, ao contrário do que se observa em outros países, como África do Sul, onde a maior parte das infecções origina-se dos ascósporos (Kiely, 1948; McOnie, 1964b; Kotzé, 1996; Schutte et al., 1997; Silva Júnior et al., 2016).

No Brasil, como em outros países, pela natureza biológica do Filo Ascomycota, os ascósporos estão intimamente associados ao estabelecimento da doença em áreas indenens. Posteriormente, com o desenvolvimento da doença nestas áreas, os ascósporos são dispersos interplantas. Uma vez a doença presente, os conídios, por sua vez, são os responsáveis pelo incremento dos sintomas intraplantas (Spósito et al., 2004).

A disseminação de fora para dentro da propriedade é feita através de restos vegetais, principalmente folhas, por mudas contaminadas e pelo vento que disseminam os ascósporos. Dentro da propriedade a disseminação ocorre por meio dos dois tipos de esporos produzidos pelo fungo: os conídios que são dispersos a curtas distâncias pela ação da água, e os ascósporos que são dispersos pelo vento a médias distâncias (Coopercitrus, 2014).

O início do ciclo da doença se dá pela sobrevivência dos ascósporos nas folhas em decomposição, sendo posteriormente disseminados pelo vento infectando

diferentes órgãos da planta, como frutos e folhas. Assim, a fase sexual é a responsável pelo ciclo primário da doença, enquanto os conídios representam as etapas do ciclo secundário da doença (Silva Júnior et al., 2016). Desta forma, pode-se afirmar que os ascósporos são responsáveis pelo início da epidemia, enquanto os conídios respondem pelo desenvolvimento da doença na planta (Kiely, 1948; Aguilar-Vildoso et al., 2002). Em particular para o Estado de São Paulo, devido ao reduzido número de variedades cultivadas e à sua elevada suscetibilidade a *P. citricarpa*, existência de floradas simultâneas das plantas, aliados com um clima favorável, as condições para o desenvolvimento da doença são altamente favoráveis (Feichtenberger, 1996). A presença de frutos de diferentes tamanhos e idade, juntamente com a ocorrência de chuvas frequentes nos períodos de suscetibilidade, acarretam no aumento da doença com grandes variações anuais (Silva-Pinhati et al., 2009).

2.6 Sintomatologia da mancha preta dos citros

O patógeno *P. citricarpa* é específico de citros (Baayen, et al., 2002), causando lesões em ramos, folhas, frutos, pecíolos e pedúnculos (Kotzé, 1981). Entretanto, nos frutos os sintomas mostram-se mais evidentes em função da presença de lesões na casca, depreciando-os comercialmente e restringindo as exportações para países onde a mesma é classificada como quarentenária. A mancha preta não modifica a qualidade interna dos frutos (Fagan e Goes, 2000), e dessa feita podem ser utilizados no processamento industrial para a produção de suco (Timmer et al., 2000). Apenas os frutos muito afetados são considerados impróprios para o comércio *in natura*, sendo direcionados para o processamento industrial na produção de suco (Silva Júnior et al., 2016).

A literatura internacional cita quatro diferentes sintomas associados à MPC em frutos cítricos: mancha dura, falsa melanose, mancha sardenta e mancha virulenta (Timmer et al., 2000). No Brasil, são citados mais dois tipos de sintomas: mancha rendilhada e mancha trincada. Em áreas com elevada quantidade de inóculo, mais de um desses tipos de sintomas podem ser observados simultaneamente em um único fruto (Silva Júnior et al., 2016).

Os sintomas da MPC em geral são observados em maior frequência na fase inicial de maturação dos frutos. Posteriormente, quando nas fases mais adiantadas de maturação e, sob elevada temperatura, estresse hídrico e plantas debilitadas, os sintomas aparecem com maior severidade. Também, quando na presença de pragas como ácaros e cochonilhas, especialmente *Parlatoria ziziphus* e *P. pergandii*, pode haver agravamento no nível de queda dos frutos (Almeida, 2009).

2.7 Estratégias de manejo nos pomares

2.7.1 Controle genético

No mundo, em que pese à importância da citricultura, os pomares cítricos encontram-se alicerçados em poucas variedades. No Brasil, em especial, o parque citrícola, no que tange às laranjas doces, mais de 90% da área produzida corresponde a apenas cinco copas. Este fato deve-se à inexistência de materiais genéticos agronomicamente competitivos, ou devido a inconvenientes industriais. Pese-se a isto a natureza genética dos citros, com base muito estreita, e o ciclo longo para gerar novos materiais genéticos que atendam às demandas domésticas (Soares Filho et al., 2013; Bastos et al., 2014). No que concerne a MPC, todas as variedades de laranjas doces produzidas, assim como as demais espécies de importância econômicas, são todas suscetíveis a *P. citricarpa* (Rossetto et al., 2011).

A citricultura brasileira é fortemente embasada em copas de laranja ‘Pera’ (*Citrus sinensis*) e limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limon*) como porta-enxerto (Soares Filho et al., 2013). Este fato tem contribuído para sua vulnerabilidade, especial no que se refere a fatores fitossanitários. A obtenção de um maior número de variedades, seja para a indústria seja para o mercado de fruta fresca, tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento, pois a ampliação da base genética é importante para a sustentabilidade de toda cadeia produtiva (Machado et al., 2011).

No Brasil, assim como em diversas partes do mundo, especialmente nos Estados Unidos da América e Espanha, encontra-se em andamento várias pesquisas visando o desenvolvimento de materiais genéticos prioritariamente resistentes a *Ca. Li asiaticus*, e, por extensão, aos demais desafios fitossanitários, como por exemplo *P. citricarpa* (Silva Júnior et al., 2016).

No caso do Brasil, há indicações de materiais geneticamente transformados com potencial de resistência ao fungo da mancha preta (Schinor et al., 2002; Sousa e Goes, 2010; Rossetto, 2009), sem, contudo existir indicações da sua disponibilidade comercial (Silva Júnior et al., 2016). Apenas a limeira ácida ‘Tahiti’ é relatada como uma variedade de valor comercial resistente à pinta preta. O fungo pode até ser encontrado assintomaticamente nos tecidos foliares, mas não nos frutos destituindo dessa forma o seu potencial como fonte de inóculo quando da sua exportação (Silva Júnior et al., 2016).

Na Espanha, plantas de laranja doce foram transformadas geneticamente e passaram a apresentar resistência a diferentes pragas e patógenos, incluindo *P. citricarpa* (Kava-Cordeiro et al., 2012). Estudos desta natureza estão em andamento no estado de São Paulo para a avaliação da resistência de diferentes materiais de laranjeiras doces transformados com a supressão do gene da limoneno sintase (*CitMTSE1*) (Silva Júnior et al., 2016).

2.7.2 Controle cultural

Algumas práticas culturais têm sido utilizadas com o intuito de evitar ou minimizar a sobrevivência e a disseminação das duas fontes de inóculo produzidas pelo agente causal da MPC. Dentre tais medidas incluem-se o uso de roçadeiras ecológicas, cuja massa vegetal roçada é arremessada em direção à base das plantas, e dessa forma recobrando as folhas de citros caídas no solo, antecipação de colheita visando antecipação da sua possível queda e redução de inóculo, poda de ramos e galhos secos, manejo da irrigação, e uso de quebra-ventos (Silva Júnior et al., 2016).

Visando exclusivamente a redução da produção de ascósporos, algumas outras práticas complementares às anteriores contribuem no controle da doença, como o cultivo de gramíneas e leguminosas nas entrelinhas de plantio, uso de decompositores contendo bases nitrogenadas, especialmente a uréia, eliminação física das folhas com o uso de “flammer” (queimador à gás) ou rastelos mecânicos conjugados com trinchas e; ações práticas que minimizem a queda de folhas das plantas (Almeida, 2009).

No caso específico dos conídios, as principais práticas na sua supressão e minimização da produção constituem-se em bom manejo nutricional das plantas, controle de doenças que levam ao secamento de ramos e galhos, como a rubelose (*Erytricum salmonicolor*), minimizar e/ou evitar a quebra de galhos e ramos (Goes e Almeida, 2007), e poda de galhos secos (Almeida, 2009).

2.7.3 Controle químico

O controle químico de MPC é o método de manejo mais eficiente e economicamente viável para garantir alta produtividade e qualidade de produção. Apesar de seu alto custo de controle, para áreas de elevado nível de inóculo, para cada R\$1,00 investido em produto e pulverizações o citricultor deixa de perder de R\$5,00 a R\$25,00 dado aos riscos de perdas oriundas da queda dos frutos (Fundecitrus, 2019).

Os fungicidas registrados e de eficiência comprovada no controle da MPC restringem-se a produtos protetores, à base de cobre ou ditiocarbamatos, e os produtos sistêmicos, como os benzimidazóis e os translaminares, conhecidos como inibidores da quinona externa (Qol), como as estrobilurinas (Feichtenberger et al., 2005; Rodrigues et al., 2007). No entanto, no mercado brasileiro encontram-se registrados para o controle de MPC apenas os fungicidas cúpricos e os Qols (Fundecitrus, 2019).

As estrobilurinas surgiram no mercado mundial partir de 1990, constituindo em um novo alento no controle de várias doenças fúngicas, notadamente dos patógenos de difícil controle ou que se mostravam insensíveis aos fungicidas convencionalmente utilizados. Os primeiros testes com fungicidas do grupo das estrobilurinas visando o controle de *P. citricarpa* foram realizados na África do Sul (Tollig et al., 1996), com resultados altamente promissores. Posteriormente, vários ensaios foram igualmente realizados na Argentina (Fogliata et al., 2004) e Brasil (Goes e Wit, 1999; Felipe et al., 2004), sendo evidenciado resultados igualmente eficientes para o controle do patógeno causal.

Fungicidas do grupo das estrobilurinas são mesostêmicos, uma classificação advinda da união de dois conceitos: sistemicidade translaminar e epistemicidade. A ação translaminar ocorre quando o fungicida é aplicado em uma das superfícies da

folha e é translocado para a outra superfície. Já, o fungicida episistêmico apresenta distribuição nas camadas de cera das folhas através de sua fase de vapor. Se a pressão de vapor da substância é suficientemente alta, a migração pode iniciar a partir da deposição na superfície da folha através da vaporização e transporte na forma de vapor (Phytus, 2014). Outra definição refere-se à atividade translaminar, a qual ocorre mobilidade entre as faces foliares (Bartlett et al., 2002).

As estrobilurinas apresentam propriedades físico-químicas muito diferentes entre si, o que consequentemente lhes confere uma ampla variedade de comportamentos biocinéticos, tanto no interior dos tecidos da planta, quanto na superfície externa (Bartlett et al., 2002). Dessa forma, quanto à mobilidade nos tecidos as estrobilurinas azoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina apresentam maior, média e menor mobilidade, respectivamente (Bartlett et al., 2002).

De acordo com Vincelli (2002), o fungicida azoxistrobina move-se translaminarmente, bem como sistemicamente no sistema vascular da planta, enquanto cresoxim-metílico e trifloxistrobina movem-se translaminarmente, mas não sistemicamente. Esses dois últimos fungicidas, entretanto, parecem se mover como um gás na camada de ar estável adjacente à superfície da folha, chamada de camada limite. À medida que se movem na fase de vapor, eles prontamente se ligam novamente à cutícula. Fungicidas como o cresoxim-metílico e a trifloxistrobina, que não são verdadeiramente sistêmicos, mas se redistribuem por meio desses outros mecanismos, têm sido chamados de "mesostêmicos", "quase-sistêmicos" ou "sistêmicos de superfície".

A piraclostrobina é classificada como um produto sistêmico de superfície e tem sistemicidade considerada mediana (Santos, 2016).

Em termos práticos, os movimentos sistêmico, quando ocorre, e o translaminar ajudam a compensar a cobertura incompleta da pulverização. A redistribuição na fase de vapor também pode ajudar a compensar a cobertura deficiente da planta, mas apenas até certo ponto. Esses processos podem ser especialmente importantes em plantações com copas densas ou difíceis de pulverizar (cucurbitáceas, por exemplo). Vários dias podem ser necessários para que a proteção adequada seja alcançada por meio do movimento translaminar. Assim, os produtores podem não atingir o controle ideal da doença se um fungicida

QoI for aplicado com cobertura incompleta dentro de 24 horas do período de infecção (Vincelli, 2002).

Outra consequência prática da dinâmica do movimento translaminar diz respeito ao controle curativo de doenças. Os fungicidas QoI são excelentes como fungicidas preventivos, porque todos eles matam com eficácia os esporos em germinação. No entanto, vários deles apresentam baixo desempenho contra certas doenças quando usados de forma curativa, ou seja, após a infecção. Portanto, o melhor uso dos fungicidas QoI dá-se quando aplicados, anteriormente, às infecções (Vincelli, 2002).

Os fungicidas QoI, apesar do alto custo, tem sido a estratégia mais utilizada e que tem propiciado os melhores resultados no manejo de MPC. Dependendo do histórico da doença nos pomares, e do destino final da fruta o número de pulverizações pode ser elevado (Silva Júnior et al., 2016), às vezes chegando a cerca de oito aplicações de QoI para variedades tardias cujos frutos sejam destinados ao comércio *in natura* (A. de Goes, dezembro de 2019, informações pessoais). Num passado recente, de cerca de vinte anos, com baixo nível de inóculo, o controle satisfatório da doença era obtido mediante o emprego de apenas duas aplicações de fungicidas do grupo dos benzimidazóis, ou mediante este mesmo número de aplicações com os QoI (A. de Goes, dezembro de 2019, informações pessoais).

Os fungicidas QoI, juntamente com os cúpricos, de ação protetora, têm sido os mais utilizados no controle da MPC, no Brasil (Silva Júnior et al., 2016). Desta feita, ainda que os resultados de controle de MPC têm sido satisfatórios, na maioria das propriedades há certos inconvenientes, de aspectos de saúde e de natureza prática. No primeiro caso é fundamental atentar para o limite máximo de registro (LMR) autorizado para uso dentro do Programa de Produção Integrada dos Citros (PIC), estabelecido pelo MAPA (Silva Júnior et al., 2016) e pelos órgãos de controle como clientes e consumidores, e no segundo caso os riscos biológicos da “praga”, dada à possibilidade do desenvolvimento de resistência à molécula química utilizada.

No Brasil, nas fases entre o florescimento e colheita as plantas cítricas mostram-se vulneráveis a diversos problemas fúngicos como a podridão floral dos

citros, causada por duas ou mais espécies de *Colletotrichum* (*C. abscissum*, *C. gloeosporioides*) (Lima et al., 2011; Carboni, 2018), verrugose (*Elsinoe* spp.), e a melanose (*Diaporthe citri* Wolf) (Rodrigues et al., 2007). Para essas doenças o controle é inteiramente dependente do uso de fungicidas, com destaque para os Qol associados aos inibidores da desmetilação (DMI), como os triazóis, no controle da podridão floral, e dos cúpricos para os casos de verrugose e melanose (Silva Júnior et al, 2015). Para o caso específico da podridão floral dos citros, em determinadas regiões produtoras, especialmente quando sob chuvas frequentes e de alta intensidade ou intermitentemente no período de florescimento, a combinação Qol e DMI é usada com elevada frequência para assegurar o controle da doença. E, por consequência dessa elevada exposição, fungos como *P. citricarpa* presente nestes pomares podem maximizar as chances de seleção de estirpes resistentes aos fungicidas Qol.

2.8 Resistência a fungicidas do grupo químico das estrobilurinas

As estrobilurinas são fungicidas inibidores da quinona externa, ou também conhecidos como inibidores da quinona oxidase, ou fungicidas Qol, e se caracterizam por agir na respiração dos fungos, atuando no sítio Qo (Parreira, et al., 2009).

As moléculas se ligam ao sítio Qo, na cadeia de transporte de elétrons da respiração mitocondrial, bloqueando o transporte de elétrons no complexo enzimático citocromo *bc1* e, dessa forma, interrompem a produção de ATP pelas células, o que eventualmente leva à morte do organismo (Bartlett et al., 2002; Gisi et al., 2000) Por ter como único modo bioquímico de ação (uni-sítio) a inibição da respiração mitocondrial no sítio Qo, os fungicidas Qol são considerados de alto risco para o desenvolvimento de resistência em fungos (Rodrigues et al., 2007).

A resistência a fungicidas é definida como uma alteração herdável e estável de um fungo em resposta a sua exposição prolongada a um determinado princípio ativo, resultando na redução da sua sensibilidade àquele ingrediente químico, ou aos conexos, de mesmo grupo químico (Brent e Hollomon, 2007a). Esta resistência, que pode ocorrer naturalmente sob condições de campo, pode também ser induzida de forma artificial, em laboratório (Brent e Hollomon, 2007a).

A resistência aos QoI está normalmente associada à substituição de uma glicina por uma alanina na posição 143 do gene mitocondrial do citocromo *b* (*cyt b*), que está relacionada a altos níveis de resistência e, conseqüentemente, a menor eficiência no controle da doença (Gisi et al., 2000). Com base nessa mutação, a resposta fisiológica, com conseqüente resistência, pode ser qualitativa podendo dar origem a duas classes quanto à sensibilidade, sensíveis e resistentes. Uma vez desenvolvida, esta população resistente tende a ser estável, mesmo se o fungicida for usado de forma menos intensa, exercendo menor pressão seleção. Este tipo de resistência é regulada por um gene principal, e uma mutação pontual, que causa mudança em um único aminoácido da proteína alvo, pode resultar em alto nível de resistência, caso da mutação G143A (Brent; Hollomon, 2007b). Outras mutações podem ocorrer no gene *cyt b*, como F129L (substituição de fenilalanina por leucina) e G137R (substituição de glicina por arginina), ambas relacionadas a baixos níveis de resistência ou resistência quantitativa, com pequeno ou nenhum efeito na eficiência do fungicida para o controle da doença (Gisi et al., 2000).

2.9 Sequenciamento de DNA

Diversas mutações descritas na literatura foram associadas à resistência a estrobilurinas (Gisi et al., 2002), e foram detectadas no gene *cyt b* de vários fungos fitopatogênicos resistentes ao fungicida (Fernández-Ortuño, et al., 2010). Existem pelo menos 15 mutações já conhecidas, todas na sequência do gene mitocondrial citocromo *b* (*cyt b*), que conferem resistência aos fungicidas QoI (Degliesposti et al., 1993). Dessas, três foram detectadas na sequência do gene *cyt b* em fitopatógenos: G143A, F129L e G137 (FRAC, 2014).

Utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético do *cyt b* é possível detectar se as mutações responsáveis pela resistência aos QoI estão presentes nos indivíduos resistentes, pela comparação com uma amostra padrão do fungo (selvagem), que possivelmente sofreu poucas mutações por ter sido pouco exposto às sucessivas aplicações de fungicidas. Na técnica de sequenciamento, o material que foi amplificado previamente no PCR, é submetido a aparelhos que têm a capacidade de identificar, de forma sequencial, os nucleotídeos presentes em uma molécula de DNA que compõem o fragmento em análise

(Brandão, 2009). Isto permite identificar a alteração de uma única base que pode levar a uma mutação com consequente perda de função da proteína a ser codificada.

Método Sanger

Regiões de DNA com até 900 pares de base de comprimento são rotineiramente sequenciados pelo chamado método Sanger de sequenciamento ou método de terminação da cadeia (Obenrader, 2003). O método Sanger foi desenvolvido pelo bioquímico britânico Fred Sanger e seus colaboradores, em 1975 (Sanger e Coulson, 1975). Nele, o DNA alvo é copiado muitas vezes, produzindo fragmentos de comprimentos diferentes. Nucleotídeos “terminadores de cadeia” fluorescentes marcam os finais dos fragmentos e permitem que a sequência seja determinada (Manfredini, 2015).

Pirosequenciamento

Este método, desenvolvido por pesquisadores do Royal Institute of Technology de Estocolmo, Suécia em 1996 (Ronaghi et al., 1996), é um dos novos processos de sequenciamento que surgiram nos últimos anos, conhecidos com NGS, em inglês Next Generation Sequencing. Este método é baseado no princípio da síntese de sequências, baseando-se na detecção de pirofosfatos liberados na incorporação de nucleotídeos.

As leituras realizadas por pirosequenciamento são relativamente menores que as obtidas pelo método de Sanger (~700 bp). A leitura da sequência nesse sistema é realizada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, esse pirofosfato é convertido para ATP, pela ATP sulfúrilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz capturado por uma câmera CCD (charge-coupled device) acoplada ao sistema (Carvalho e Silva, 2010). O pirosequenciamento é considerado um método mais eficiente que o método de Sanger se considerar que a cobertura da sequência é muito maior, sendo uma determinada base lida várias vezes. Entretanto, o método tem como inconveniente a necessidade de utilizar um número elevado de reagentes (Pinto e Kremer, 2016).

2.10 A história do íntron

Em estudo do material genético do citocromo *b* constatou-se que a existência de um íntron logo após o códon 143 pode prevenir a ocorrência da mutação G143A em alguns fungos, mutação essa de maior impacto na sensibilidade aos Qols (Grasso et al., 2006; Stammler et al., 2013). Nesses casos, a substituição do nucleotídeo nesta posição impediria a remoção do íntron, sendo letal para o fungo (Grasso et al., 2006). No estudo de Stammler (2013), a análise da sequência do gene *cyt b* revelou uma sequência de íntron diretamente após o códon 143 de isolados de *P. citricarpa*, e nenhum íntron em isolados de *P. citriasiana* e *P. capitalensis* oriundos de citros. Ainda que estes resultados de pesquisas tenham revelados uma nova e interessante fronteira para o conhecimento deste fungo aos Qols, a quantidade das amostras utilizadas no estudo foi muito pequena, havendo assim divergência quanto à possibilidade da universalização da resposta.

Embora as respostas biológicas evidenciadas por Stammler et al. (2013) tenham sido mantidas de forma inalterada para fungos portadores do citado íntron, como nos casos de *Puccinia* spp. e *Alternaria solani* (Grasso et al., 2006, *Pyrenophora teres* (Sierotzki et al., 2007), *Botrytis cinerea* (Banno et al., 2009), *Guignardia bidwellii* (Miessner et al., 2011), e *Monilia fructicola* (Miessner et al., 2010; Hily et al., 2011), cuja a resistência aos fungicidas Qol conferidos pela substituição do G143A ainda não foi relatada, existem exceções descritas para por exemplo em *Botrytis cinerea* e *B. pseudocinerea*, um com, e outro sem o íntron mencionado (Banno et al., 2009; Jiang et al., 2009; Leroux et al., 2010; Yin et al., 2012). Uma explicação para este caso, nestas espécies, é atribuída à heterogeneidade das mesmas (Stammler et al., 2013).

Em leveduras, já foi relatado o resgate de mecanismos que poderiam restabelecer a aptidão respiratória de um mutante resistente com íntron após a posição do códon 143. Os três mecanismos hipotéticos foram deleção do íntron, superexpressão de genes que codificam portadores de íons metálicos das mitocôndrias, ou uma segunda mutação mitocondrial para restaurar o splicing exon/intron (Vallières et al., 2011). Tais mecanismos de resgate não são testados em campo, mas indicam que a inibição da mutação G143A não é absoluta. Esses

mecanismos de desvio identificados em leveduras podem potencialmente surgir em fungos patogênicos (Vallières et al., 2011).

Alguns patógenos como *Alternaria solani*, *Pyrenophora teres* e *Phakopsora pachyrhizi* também apresentam o íntron logo após o códon 143 e desenvolveram a mutação F129L e / ou G137R, que tem se mostrado menos efetiva com relação ao nível de resistência (Sierotzki et al., 2007; Miessner et al., 2011; Stammler, 2012, Klosowski et al., 2016).

Devido à estrutura do íntron do gene *cyt b* de *P. citricarpa*, existe uma baixa probabilidade da mutação G143A que confere um alto nível de resistência (Stammler et al., 2013). Tal possibilidade advém do fato da longa exposição deste patógeno aos fungicidas QoI, os quais vêm sendo utilizados na citricultura desde o final da década de 90 (Bartlett et al., 2002). No Brasil, o controle da MPC com os fungicidas QoI foi iniciado a partir do ano 2000, e tornando uma ferramenta praticamente exclusiva a partir de 2012, quando da proibição do uso de benzimidazóis na citricultura brasileira (A. de Goes, dezembro de 2019).

O monitoramento da resistência pode auxiliar no desenvolvimento e introdução de novos fungicidas, pois fornece informações sobre os riscos de resistência e estabelece uma base de dados de sensibilidade do produto. Acrescenta-se ainda que, se detectado o problema de resistência, as informações geradas são imprescindíveis no manejo, evitando gastos inúteis com fungicidas que não controlam, perdas consideráveis na produção e descrédito das empresas fabricantes dos produtos (Kimati, 1987). Além disso, evitaria problemas à saúde e ao meio ambiente (Wightwick, et al., 2010). Até o momento, não há estudos de monitoramento da sensibilidade de *Phyllosticta citricarpa* a fungicidas do grupo das estrobilurinas no Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Foram utilizados neste trabalho isolados de *P. citricarpa* pertencentes à micoteca do laboratório de Fitopatologia, FCAV/UNESP, todos oriundos de isolamentos realizados no período de 1999 a 2006 (Tabela 1).

A obtenção dos isolados de *P. citricarpa* deu-se a partir de frutos sintomáticos coletados em pomares infestados. Para tal, os frutos sintomáticos, de diversos pomares cítricos, foram levados para o Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Ciências da Produção Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para o isolamento. Foram utilizadas amostras de frutos de citros, especialmente laranjeiras doces, de 16 municípios de quatro Estados da Federação (Tabela 1).

Tabela 1. Origem dos isolados de *Phyllosticta citricarpa* (ano de coleta, nome da amostra, local, hospedeiro), tempo de exposição a fungicidas (em anos), níveis de severidade dos sintomas e número de isolados avaliados.

Ano de coleta	Nome da amostra	Local	Hospedeiro	Exp. (anos) ^a	Sever. ^b	Nº de isolados
1999	1999	Itaboraí, RJ	Tangerina do Rio	0	Alta	1
2004	2004	Itaboraí, RJ	ND	1	Alta	3
2005	2005	Itaboraí, RJ; Estiva Gerbi, SP	Valência, Folha Murça, Lima Ácida Tahiti, Natal	2	Alta	3
2006	2006	Conchal, SP;	Lima Ácida Tahiti, Natal, Pera Rio	5	Alta	2
2017	BB	Bebedouro, SP	Pera Rio	6	Média	3
2018	BO	Bofete, SP	Baianinha, Valência	6	Baixa	3
	CG	Comendador Gomes, MG	Natal	6	Baixa	2
	Guaraci	Guaraci, SP	Natal	6	Baixa	1

Jales	Jales, SP	Pera Rio, Cravo	6	Média	3
LA	Luiz Antônio, SP	Rubi	6	Alta	4
MG	Mogi Guaçu, SP	Valência	6	Alta	4
RE	Reginópolis, SP	Pera Rio	3	Alta	3
RI	Rincão, SP	Valência, Natal	6	Alta	5
S. S Cai	São Sebastião do Caí, RS	Valência	3	Média	2
SCRP	Santa Cruz do Rio Pardo, SP	Pera Rio Valência	4	Baixa	3
TA	Tambaú, SP	Valência	6	Alta	7
Vit BR	Vitória Brasil, SP	Pera Rio, Natal	4	Média	1
Total	..	..	..	..	50

^a – Exposição a Qol por ano; ND = não disponível

^b – Severidade - a gravidade dos sintomas no campo, avaliada com base na sua frequência e distribuição, em que Baixo = menos de 1% de plantas exibindo frutos com sintomas do tipo mancha dura, com baixa frequência, com dificuldade para encontrar frutos sintomáticos; Moderado = menos de 20% das plantas exibindo frutos sintomáticos; presença de sintomas dos tipos mancha dura e de falsa melanose, com moderada dificuldade para encontrar frutos sintomáticos; Alta = mais de 20% das plantas exibindo frutos com média a alta frequência dos sintomas dos tipos mancha dura, mancha sardenta, mancha virulenta e de falsa melanose, com grande facilidade para encontrar frutos sintomáticos.

Para o isolamento do patógeno, os frutos foram superficialmente desinfestados em solução de hipoclorito de sódio, enxaguados em água corrente e secos em condições de ambiente de laboratório. Posteriormente, a partir de lesões típicas de MPC foram retirados fragmentos de tecidos lesionados das zonas de transição doentes/sadios, seguido da sua desinfestação por 1 minuto em álcool etílico 70%, 3 minutos em hipoclorito de sódio 0,5%; e 1 minuto em água destilada esterilizada, seguida da secagem sobre papel absorvente esterilizado. Posteriormente, os fragmentos foram depositados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) contido em placas de Petri, seguido de incubação em BOD a 25°C ±4°C por cinco dias. A seguir, colônias que exibiam características culturais e morfológicas similares às de *P. citricarpa* foram repicadas para subsequente purificação. As culturas puras dos fungos foram armazenadas em tubos de ensaio contendo meio

BDA, e em seguida recobertas com óleo mineral estéril para paralisação do metabolismo.

Na etapa de isolamento dos fungos, foram obtidos 200 isolados, os quais passaram pela triagem em meio aveia-ágar e também foram selecionados de maneira que a amostragem ficasse ampla e com representatividade das principais regiões citrícolas.

3.2 Identificação de isolados de *Phyllosticta citricarpa* por marcador morfológico meio aveia-ágar

Todos os 50 isolados obtidos de frutos cítricos sintomáticos foram submetidos ao teste do meio de cultura aveia-ágar (AA) (60 g de farinha de aveia, 12 g de ágar, 1000 mL de água destilada esterilizada), utilizado para distinguir isolados patogênicos e endofíticos (Baayen et al., 2002; Baldassari et al., 2008; Wickert e Goes, 2009). Tal teste foi também adotado para os isolados obtidos no período de 1999 a 2006. Para tal, discos de colônias oriundos das culturas puras foram justapostos em placas de Petri contendo cerca de 20 mL de meio AA, seguido de incubação em estufas BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 12/12 h, por 7 a 10 dias.

3.3 Avaliação da sensibilidade de isolados de *Phyllosticta citricarpa* a fungicidas QoI, trifloxistrobina e piraclostrobina

Os procedimentos para a determinação da sensibilidade aos fungicidas QoI foram adaptados de metodologias descritas para *Botrytis cinerea*, recomendadas pelo Comitê de Ação de Resistência a Fungicidas (Fungicide Resistance Action Committee – FRAC) (Stammler e Speakman, 2006; Stammler, 2009). O citado protocolo preceitua o critério relativo à determinação da porcentagem de inibição da germinação de conídios (Stammler, 2009).

A metodologia de avaliação da sensibilidade dos isolados de *P. citricarpa* aos fungicidas QoI deu-se mediante ensaios de microtitulação em microplacas modelo Kasvi K12-06 com 96 poços, cada um representando uma repetição, nas concentrações 0; 0,0003; 0,003, 0,03; 0,3; 3,0; 30,0 e 300,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos fungicidas trifloxistrobina (Flint® trifloxistrobina 500 g kg^{-1} , Bayer) e piraclostrobina (Comet®, piraclostrobina, 250 g L^{-1} , Basf). O teste de microtitulação foi realizado com os 50

isolados (Tabela 1). Os fungicidas foram diluídos separadamente em água deionizada estéril para produção de uma solução estoque a $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da solução/suspensão estoque procederam-se diluições seriadas para obtenção das concentrações desejadas. Posteriormente, alíquotas contendo os fungicidas foram depositadas em cada um dos poços da placa contendo meio batata-dextrose (BD), conforme Stammler e Speakman (2006). Em seguida, realizou-se a inoculação dos conídios na concentração de 1×10^4 conídios mL^{-1} . A suspensão conidial foi obtida mediante a deposição de meio BD (20 g L^{-1} batata-dextrose em 1000 mL de água destilada estéril) sobre colônias de *P. citricarpa*, após 15 dias de crescimento em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e incubação em estufa BOD a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 12/12 h, seguido da raspagem superficial com espátula e filtração em camada dupla de gase.

O volume total da suspensão conidial dispensado em cada poço da placa foi de 100 μL , distribuídos como segue: branco (50 μL de meio BD com adição de 50 μL das distintas doses de fungicidas), e as demais amostras (50 μL de meio BD com adição das doses de fungicidas + 50 μL da suspensão de conídios). Foram realizadas quatro repetições de cada tratamento, representado por um poço da microplaca, pois a microplaca foi dividida em três setores, com quatro repetições cada.

Posteriormente, as microplacas foram acondicionadas em sacos plásticos, para evitar evaporação, identificadas, e incubadas, sem agitação, a 18°C no escuro. Após 14 dias de incubação o crescimento relativo dos isolados foi determinado com base na leitura de absorbância de luz medida a 405 nm no leitor de microplacas de microtitulação MultiskanTM FC Microplate Photometer, Thermo ScientificTM, EUA. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para cálculo da EC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento da colônia) de cada isolado para cada fungicida, utilizando o valor médio das quatro repetições por poço da microplaca.

O EC_{50} foi calculado com base na porcentagem de crescimento de cada isolado nas diferentes concentrações dos fungicidas quando comparados ao crescimento nas placas sem fungicidas (testemunha), após regressão das porcentagens (X) versus o $\log_{10}$ da concentração de fungicidas (Y) (Lopes et al., 2015).

3.4 Análises moleculares

Utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o posterior sequenciamento, é possível detectar-se as mutações responsáveis pela resistência do fungo às estrobilurinas.

Assim, sugere-se que a mutação no local alvo, mais especificamente a mutação F129L, a qual é de ocorrência generalizada, pode ser o mecanismo de resistência associado aos isolados insensíveis. A ocorrência do íntron na espécie *P. citricarpa* pode prevenir a mutação G143A e, dessa forma, buscou-se a segunda mutação de maior importância, a F129L, próxima do local alvo de atuação do fungicida.

3.4.1 Extração de DNA

Os isolados selecionados para análises moleculares foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-ágar, KASVI, Curitiba, PR, Brasil) suplementado com cloranfenicol e estreptomicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante quinze dias a 25°C . Após o período de incubação, mediante o emprego de espátula procedeu-se a raspagem das colônias para a remoção do micélio. A seguir, o micélio removido foi armazenado em tubos eppendorf de 2mL e mantido em freezer -20°C até seu uso.

A extração do DNA deu-se a partir de 50 isolados de *P. citricarpa*, sendo empregado kit Núcleo Spin® Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração das amostras de DNA foi determinada por fluorimetria com $2 \mu\text{L}$ da solução de DNA total extraído, utilizando o kit Qubit® versão 3.0 fluorometer dsDNA HS Assay (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA). Cada amostra de DNA foi quantificada duas vezes, sendo considerado o valor médio das duas quantificações por média aritmética simples.

3.4.2 Desenvolvimento dos primers

Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer 3 Plus para a amplificação das regiões contendo os códons 129, 137 e 143 do gene mitocondrial *cyt b* (Tabela 2).

Tabela 2. Nome e sequência dos primers (5'- 3') utilizados no sequenciamento.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência
GUIGCI 129 Fw1 Se San	5' – CCGCTAATTGGGTGGTAGTG - 3'
GUIGCI 129 Rv Se San	5' – TTACGGTCAACTTCCGTGTG - 3'
GUIGCI 137-143 Fw Se San2	5' – AGCAACGAGTAGACGGCAAT - 3'
GUIGCI 137-143 Rv Se San2	5' – TGACACCGAAAGTGTCGTTC - 3'

3.4.3 Reações de PCR

As reações de PCR foram conduzidas com o kit PiroMark PCR Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) obtendo um volume final de 25 µL contendo 2,0 µL de DNA, 3 µL de água ultrapura esterilizada (DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen), 12,5 µL de Pyromark PCR Master Mix, 2,5 µL de Coral Load, e 2,5 µL dos primers Fw e Rv de 1000 nM/ µl.

As amplificações foram realizadas em termociclador AB Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA), com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial de 95°C por 15 minutos; seguido de 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram purificados com o Kit PCR Clean-Up Gel Extraction (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos de PCR foram enviados e submetidos à reação de sequenciamento Sanger, de acordo com as especificações do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD) na Unicamp. O gene do citocromo *b* foi sequenciado em um único sentido, com o primer Fw, fita simples, utilizando-se a plataforma 3730XL da Applied Biosystems para realização do sequenciamento por eletroforese capilar.

3.4.4. Pirosequenciamento para mutação F129L no gene *cyt b*

Um ensaio de pirosequenciamento foi desenvolvido usando o software Pyrosequencing Assay Design (Qiagen, Hilden, Alemanha).

O pirosequenciamento consiste na realização de uma PCR inicial de amplificação da área de interesse com o uso de primers biotilizados e obtenção de um amplicon de 842 pares de base. Posteriormente, o amplicon é submetido a um

processo de separação em fita simples do DNA (PyroMark Vacuum Workstation Q24), seguido da PCR de pirosequenciamento.

Numa primeira etapa, o fragmento do gene *cyt b* que continha o alvo foi amplificado na reação de PCR utilizando o kit PiroMark PCR kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), com 12,5 µL de Pyromark PCR Master Mix, 2,5 µL de Coraload, 3 µL de água ultrapura, 2,0 µL de DNA, e 2,5 de cada primer: GUIGCI 129 Fw Pyro A (5' biotina - TCTTAATGATGGCAACAGCA - 3') e GUIGCI 129 Rv Pyro A (5' biotina - CCATATAGGGCTATGTTTATAACC - 3') (Tabela 3). As amplificações foram realizadas em termociclador AB Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial de 95°C por 15 minutos; seguido de 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos. Cada amostra foi testada em duplicata.

Para a subsequente reação de pirosequenciamento foram usados 20 µL do produto de PCR obtido. Foi preparado um mix contendo para cada reação 1 µL de Streptavidin Sepharose High Performance, 40 µL tampão de ligação PyroMark (PyroMark Binding Buffer) e 19 µL água ultrapura, adicionado em 60 µL do mix e 20 µL de produto de PCR, completando um volume final de 80 µL. A placa de PCR foi mantida sob agitação à temperatura ambiente (15-25 °C) durante 20 min a 1400 rpm.

A PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (Qiagen, Inc, Valencia, Estados Unidos) foi preparada conforme instruções do fabricante. O próximo passo destinou-se à preparação do DNA de cadeia simples e à hibridação do “primer” de sequenciamento. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o primer de sequenciamento GUICCI 129 Rv (5' - CCAGATGTACTATAACTCCT- 3') na concentração de 3.0 pmol/µl, os amplicons purificados de PCR e o tampão PyroMark Annealing, sendo adicionados 20 µL desse mix em cada poço da placa PyroMark Q24 Plate.

O pirosequenciamento foi realizado para determinação da sequência e quantificação de alelos usando o equipamento PyroMark Q24 (Qiagen, Inc, Valencia, Estados Unidos). Este método foi utilizado para investigação de resistência quantitativa da mutação F129L em dez amostras de *P. citricarpa*.

Tabela 3. Oligonucleotídeos sintetizados para reação de pirosequenciamento.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
GUIGCI 129 Fw Pyro A	5' biotina - TCTTAATGATGGCAACAGCA - 3'
GUIGCI 129 Rv Pyro A	5' biotina - CCATATAGGGCTATGTTTATAACC - 3'
GUIGCI 129 Rv	5' - CCAGATGTACTATAACTCCT- 3'

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação de *Phyllosticta citricarpa* por marcador morfológico em meio aveia-ágar

Com o objetivo de validar o marcador morfológico descrito por Baayen et al. (2002), todos os isolados obtidos a partir de tecidos de frutos cítricos contendo lesões típicas de MPC, do Brasil, foram testados. Segundo Baayen et al. (2002), linhagens de *P. citricarpa* podem ser diferenciadas das linhagens de *P. capitalensis* (teleomorfo: *Guignardia capitalensis*) pela formação de um halo amarelo ao redor das colônias fúngicas quando incubadas em meio aveia-ágar por aproximadamente 7 dias (Figura 1).

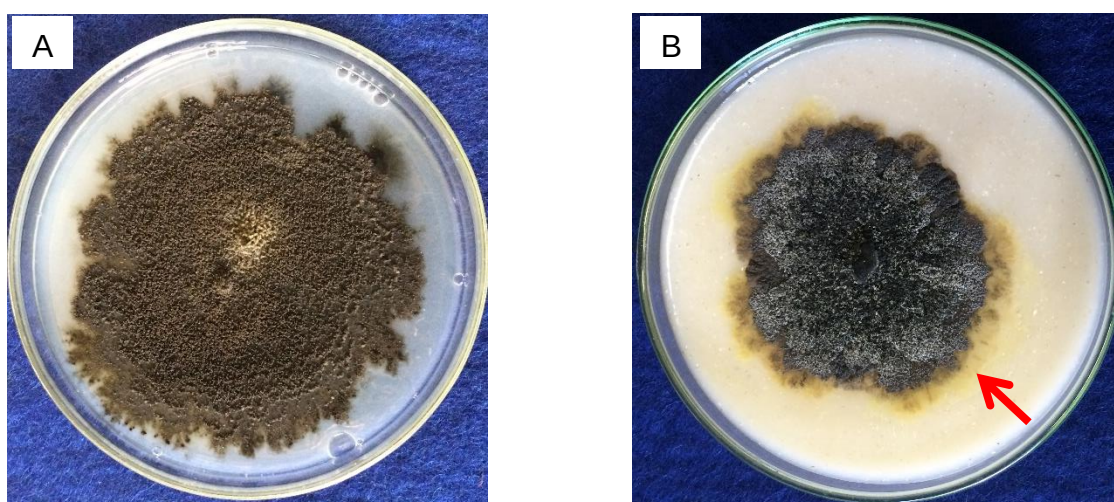


Figura 1. Linhagens identificadas pelo marcador morfológico meio aveia-ágar. Colônias incubadas em meio aveia-ágar a 25°C e fotoperíodo de 12/12h por 7 dias. (A) Colônia identificada como *Phyllosticta* spp. (B) Colônia identificada como *P. citricarpa*. A indicação com seta representa a presença do halo amarelo na borda da colônia.

Os isolados que não apresentaram a formação de halo, corroborando com os dados obtidos por Baayen et al, (2002), foram identificados como *P. capitalensis* e *Phyllosticta* spp., dessa forma não-patogênicos ou endofíticos. Da mesma forma, os isolados que apresentaram halo amarelo, característico de isolados patogênicos, foram classificados como *P. citricarpa* (Baayen et al., 2002; Baldassari et al., 2008, Stammler et al., 2013). Estudos conduzidos por Stringari (2009), com 365 linhagens

brasileiras, concluíram que o método de distinção de espécie descrito por Baayen et al. (2002) pode ser validado exclusivamente para as linhagens com resultados positivos para o halo, sendo estas corretamente identificadas como *P. citricarpa*.

Nas etapas subsequentes de testes por microtitulação e avaliações moleculares foram utilizados e avaliados somente os isolados do grupo patogênico. Todos os 50 isolados classificaram-se dentre os patogênicos (Tabela 1), e foram oriundos de uma coleção de 200 isolados obtidos na fase de isolamento. Além do caráter patogênico, tais isolados foram selecionados em razão dos antecedentes locais, retratando-se pomares de cinturão citrícola brasileiro onde a doença MPC ocorre em níveis elevados, e com alta severidade de sintomas.

4.2 Variação na sensibilidade de populações de *Phyllosticta citricarpa* aos fungicidas Qol, trifloxistrobina e piraclostrobina

Os isolados de *P. citricarpa* avaliados apresentaram variação dos níveis de sensibilidade aos fungicidas piraclostrobina e trifloxistrobina (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração efetiva de trifloxistrobina e piraclostrobina necessária para inibir em 50% (EC_{50}) o crescimento micelial de isolados de *Phyllosticta citricarpa*.

Isolado	Trifloxistrobina	Piraclostrobina
	EC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	EC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
99 Tang Rio	<0,0003	<0,0003
2004_124.1	<0,0003	<0,0003
2004_125.1	<0,0003	0,01
2004_322.2	0,208	2,733
2005_24.2	0,035	0,384
2005_42.2	2,077	0,805
2005_L2L1 C	0,003	0,014
2006_L2.21LAT	0,65	<0,0003
2006_21.2	0,178	0,444
BB_001	0,861	0,018
BB_003	108,22	17,673
BB_006	<0,0003	<0,0003
BO_005	158,48	2,27

BO_006	0,127	0,160
BO_007	29,827	<0,0003
CG_006	0,084	0,784
CG_007	<0,0003	<0,0003
Guaraci_3	>300	>300
Jales 10-5	0,573	>300
Jales 8	<0,0003	17,125
Jales 9(2)	0,749	0,005
LA_017	0,074	0,005
LA_018	5,9151	>300
LA_027	0,038	0,012
LA_028	<0,0003	<0,0003
MG_001	<0,0003	<0,0003
MG_013	0,668	<0,0003
MG_020	0,5647	1,552
MG_027	<0,0003	0,0004
RE_004	<0,0003	0,003
RE_007	0,650	0,036
RE_010	0,262	9,734
RI_004	<0,0003	0,01
RI_006	8,451	>300
RI_018	<0,0003	0,785
RI_021	<0,0003	<0,0003
RI_024	<0,0003	<0,0003
S S CAI 3	<0,0003	0,313
S S CAI 6	<0,0003	<0,0003
SCRIP_3	<0,0003	<0,0003
SCRIP_6	<0,0003	<0,0003
SCRIP_10	<0,0003	<0,0003
TA_004	0,6351	46,463
TA_028	<0,0003	<0,0003
TA_036	0,0048	0,541
TA_037	1,139	>300
TA_041	<0,0003	<0,0003
TA_046	<0,0003	>300

TA_049	>300	>300
Vit Br P Rio 1	<0,0003	0,013

Os valores de EC_{50} obtidos para os isolados de *P. citricarpa* pelo método de microplacas aos fungicidas estrobilurinas (Tabela 4) testados apresentaram valores abaixo da menor dose testada ($0,003 \mu\text{g mL}^{-1}$) ou acima da maior dose testada ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$), possibilitando discriminá-los em classes, segundo as categorias fenotípicas estabelecidas para *B. cinerea* por Amiri et al. (2014), com modificações (Tabela 5).

Tabela 5. Classes de concentrações de fungicidas inibidores da quinona externa (QoI), categorização fenotípica segundo os níveis de sensibilidade, e respectiva segmentação do número de isolados nas respectivas classes quando expostos a trifloxistrobina e piraclostrobina.

Classes ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Categoria de fenótipo de sensibilidade	Fungicidas	
		Número de isolados por classe	
		Trifloxistrobina	Piraclostrobina
< 0,0003	AS	23	17
0,0003 a 3	S	20	22
> 3 a 30	SR	3	3
> 30 a 300	AR	2	1
> 300	ER	2	7

AS = altamente sensível; S= sensível; SR = sensibilidade reduzida; AR = altamente resistente; ER = extremamente resistente

Segundo o critério utilizado neste estudo, e levando-se em conta a distribuição de frequência dos níveis fenotípicos dentre os isolados avaliados, constatou-se que houve predominância de isolados de *P. citricarpa* altamente sensíveis e sensíveis, que corresponderam a 86% e 78%, respectivamente, para trifloxistrobina e piraclostrobina. Entre os 50 isolados de *P. citricarpa* avaliados, 16% e 22% mostraram-se insensíveis a trifloxistrobina e piraclostrobina, respectivamente, apresentando valores de $EC_{50} > 3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Isolados Guaraci, TA, Jales RI e LA (Tabela 4) apresentaram pelo menos um isolado com valor de $EC_{50} > 300 \mu\text{g mL}^{-1}$, classificado como extremamente resistente (ER) a trifloxistrobina ou piraclostrobina (Tabela 4 e 5). Dentre as amostras avaliadas foi constatado que os isolados

Guaraci_3, e TA_049 mostraram-se simultaneamente insensíveis a ambos os fungicidas utilizados neste estudo (Tabela 4).

Isolados de *P. citricarpa* que apresentaram valores de $EC_{50} < 0,0003$ e $0,0003$ a 3 ; tanto para o fungicida trifloxistrobina, quanto para piraclostrobina, foram considerados como altamente sensíveis (AS) e sensíveis (S), respectivamente (Tabela 5). Entre os 50 isolados testados, 23 (46%) e 17 (34%) foram AS para trifloxistrobina e piraclostrobina, respectivamente. Já para a classe S, a frequência de isolados de *P. citricarpa* variou entre 20 (40%) e 22 (44%), respectivamente. Os demais isolados foram alocados nas classes de sensibilidade reduzida (SR), altamente resistente (AR) e extremamente resistente (ER), às quais englobaram a minoria dos isolados, com 3; 2 e 2 representantes, respectivamente, para trifloxistrobina e 3; 1 e 7 para piraclostrobina nesta ordem (Tabelas 4 e 5).

Os valores da EC_{50} obtidos para os isolados de *P. citricarpa* avaliados situaram-se em faixas variáveis, o que certamente está associado à variação natural e genotípica dos mesmos. Também foram observados padrões diferenciais de crescimento e morfologia das colônias, mesmo nas repetições, o que caracteriza a diversidade polimórfica do fungo, e certamente a sua variabilidade genética como evidenciado por Possiede e colaboradores (2009).

Fungicidas do grupo das estrobilurinas foram registrados para a cultura dos citros no final da década de 1990, sendo estrategicamente utilizados com mais frequência a partir de 2004 (Antonio de Goes, abril de 2020, informações pessoais). Nos anos subsequentes, o uso de tais fungicidas foi gradativamente crescente, tornando exclusivos para o controle de MPC a partir de 2012 (Fundecitrus, 2012).

Conforme dados obtidos neste estudo, foi constatado evidência acerca da relação entre respostas biológicas dos isolados de *P. citricarpa* analisados e seu respectivo comportamento aos níveis de exposição aos fungicidas QoI agronomicamente utilizados nos pomares cítricos amostrados. Por exemplo, foi evidenciado que os isolados de *P. citricarpa* originários de coleções micológicas formadas no período de 1999 a 2006 exibiram sensibilidade mais elevada aos fungicidas QoI, denotando fraca ou nenhuma pressão de seleção aos fungicidas utilizados. Dentre os isolados obtidos nesse período, somente dois deles apresentaram valores de EC_{50} mais elevados, de $2,077 \mu\text{g mL}^{-1}$ para trifloxistrobina

para o isolado 2005_42.2 e de 2,733 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para piraclostrobina para o isolado 2004_322.2. (Tabela 4).

Os dados relativos ao comportamento dos isolados de *P. citricarpa* aos fungicidas QoI, é de se presumir que a sensibilidade mais baixa adveio mais provavelmente do comportamento biológico intrínseco destes isolados, do que à sua adaptação aos fungicidas QoI utilizados. Por outro lado, a insensibilidade demonstrada por determinados certos variantes presume-se originar-se de insensibilidade congênita a determinadas moléculas químicas, fruto possivelmente de seu status evolucionário. Há, por exemplo, registros na literatura sobre a insensibilidade natural de *C. abscisum* (ex *C. acutatum*), agente causal da podridão floral dos citros aos fungicidas do grupo dos benzimidazóis (Goes e Kimati, 1987; Peres et al., 2002), e *C. gloeosporioides*, responsável por sintomas de antracnose em amêndoa e abacate, exibindo insensibilidade a benomyl (Shabi e Katan, 1983; Shabi et al., 1993). Evidências semelhantes são também apontadas na literatura para *Alternaria alternata* responsável pela requeima de pistache (Avenot e Michailides, 2015). Segundo estes autores foram constatados a pré-existência de isolados insensíveis aos fungicidas piraclostrobina e boscalid, mesmo em pomar onde não haviam sido utilizados tais fungicidas (Avenot e Michailides, 2015).

No presente estudo, constatou-se que os níveis de sensibilidade dos isolados de *P. citricarpa* aos fungicidas avaliados mostraram-se convergentes aqueles encontrados por Stammler e colaboradores (2013) que, em estudo semelhante, avaliaram a sensibilidade de 18 isolados de *P. citricarpa* oriundos do Brasil, Suazilândia, África do Sul, China e Vietnã aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina. Mediante metodologia da microtitulação, os autores verificaram que o EC_{50} verificado para os isolados avaliados variou de 0,003 a 0,004 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para piraclostrobina, e 0,005 a 0,011 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para azoxistrobina. Nossos resultados mostram-se também convergentes aos obtidos por Silva Júnior et al., (2016), os quais constataram que EC_{50} para piraclostrobina variou de 0,003 a 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Atualmente, valores de EC_{50} de 0,003 a 0,004 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados como padrão de sensibilidade para *P. citricarpa* (Stammler et al., 2013).

Em nosso estudo foi observado relação positiva entre a concentração de ingrediente ativo versus taxa de inibição do crescimento micelial de *P. citricarpa* para

ambos fungicidas Qol's avaliados. Estes resultados demonstram em termos práticos que o fungicida foi eficiente no controle.

As respostas fenotípicas de alguns isolados de *P. citricarpa* testados e as concentrações crescentes de ingrediente ativo dos fungicidas trifloxistrobina e piraclostrobina encontram-se apresentadas por meio da Figura 2. Para o fungicida trifloxistrobina, os isolados TA_046; BO_006 e RI_006 apresentaram valores de EC_{50} de <0,0003; 0,127; 8,4, respectivamente (Figuras 2a; 2c). Já para a piraclostrobina, os isolados CG_006; BO_006 e RI_006 apresentaram valores de EC_{50} de 0,784; 0,160; e >300, respectivamente (Figuras 2b; 2d).

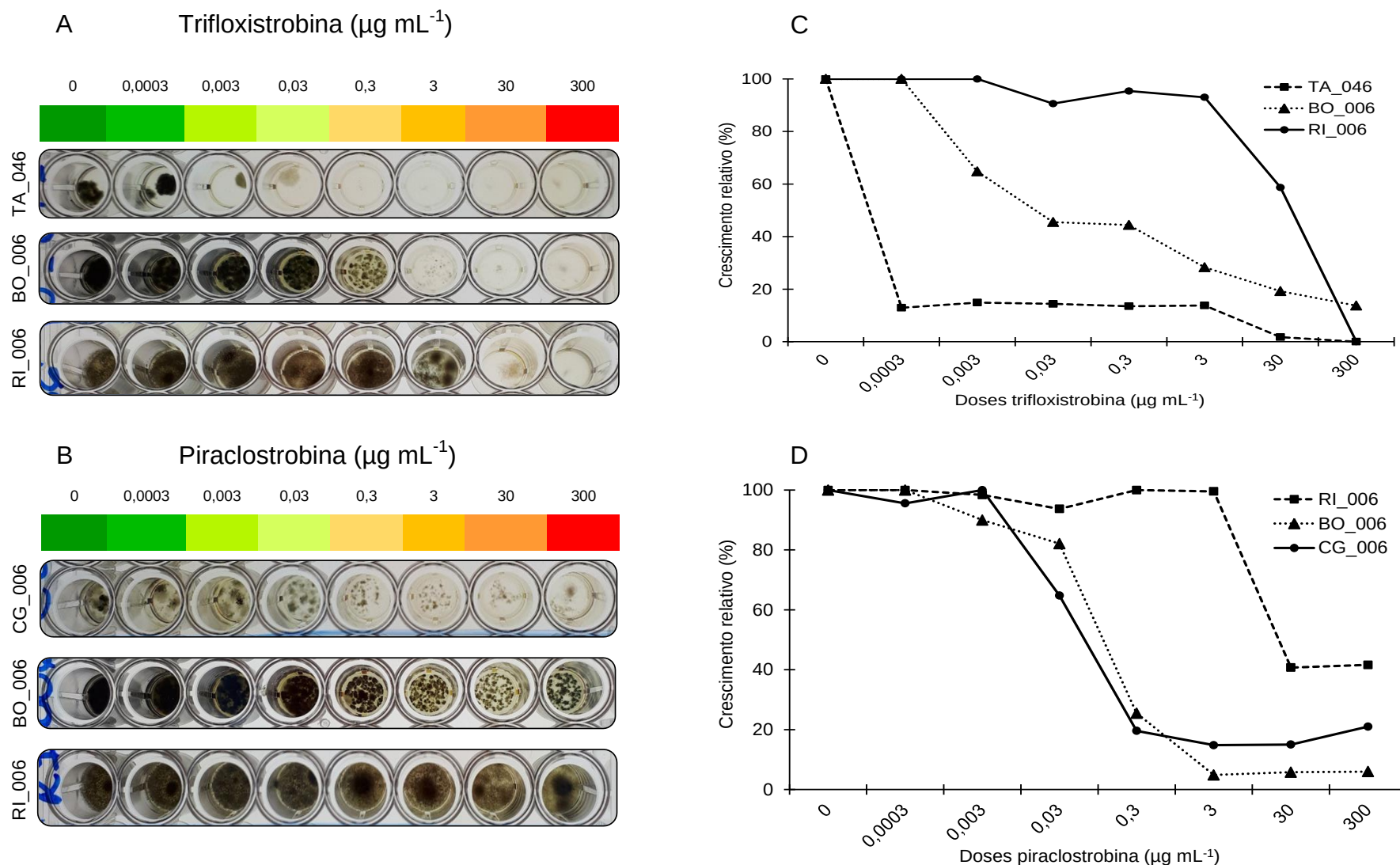


Figura 2. Variação da sensibilidade *in vitro* de isolados contrastantes de *Phyllosticta citricarpa* expostos a concentrações crescentes de trifloxistrobina (a) e piraclostrobina (b) em meio batata-dextrose (BD). Dados referentes ao crescimento relativo de colônias de *P. citricarpa* que apresentaram diferentes EC_{50} em resposta ao aumento das concentrações de trifloxistrobina (c) e piraclostrobina (d), determinados após 14 dias de incubação a 18° C no escuro. RI (Rincão), BO (Bofete), CG (Comendador Gomes), TA (Tambaú).

Tomando-se como referência os níveis de severidade de *P. citricarpa* nos pomares amostrados, e a frequência de isolados insensíveis ($EC_{50} > 3 \mu\text{g mL}^{-1}$) encontrados denota-se que não foi verificada relação entre a intensidade da doença e isolados insensíveis. Em pomares com baixa, média ou alta severidade da doença a prevalência de isolados insensíveis foi de 36% (Tabela 1).

Comparando-se o parâmetro de tempo de uso de fungicidas Qol nos pomares (Exposição) e periodicidade de redução de sensibilidade, isolados resistentes foram encontrados com maior frequência em pomares de aplicações sequenciais de Qol por mais de 5 anos (Tabela 1). Na prática, constatou-se relação entre pressão de seleção exercida possivelmente pela frequência de aplicações, e também pelas concentrações de ingredientes ativos utilizados, grau de cobertura obtido e persistência dos mesmos na cultura, e também ao tamanho da área tratada. De fato, os primeiros relatos de resistência de fungos aos fungicidas Qol surgiram dois anos após a sua introdução e uso comercial (Bartlett, et al., 2002; Gisi et al., 2002). O primeiro caso de resistência às estrobilurinas foi observado em oídio em cereal, e desde então se espalhou para outros patógenos em diversas espécies de plantas infectadas por diversas espécies de fungos, dentro de dois a quatro anos após sua introdução (Chin et al., 2001).

Este é o primeiro estudo no Brasil no qual se adotou o uso do método de microplaca para discriminação fenotípica de populações de *P. citricarpa* aos fungicidas Qol. O fungo é cultivado em meio de cultura contendo BD, líquido, em um poço da microplaca, a partir do qual o tamanho da colônia ou a atividade cinética microbiana são medidos por meio da absorbância de luz que resulta da variação da turbidez ou da intensidade de fluorescência em decorrência do ataque enzimático a um substrato específico (Broekaert et al., 1990; Pinto et al., 2010; Lourenço et al., 2011; Botelho et al., 2013; Casado et al., 2018). Como a avaliação da inibição do crescimento fúngico na presença de fungicidas se baseia no uso de tecnologia de leitura automatizada da absorbância de luz em dezenas de amostras simultaneamente, esse método é potencialmente mais rápido, acurado e eficiente quando comparado ao convencional, baseado na análise relativa da inibição do crescimento fúngico micelial “*in vitro*” (Leroux et al., 2007; Cools et al., 2010; Cools et al., 2012; Casado et al., 2018).

No Brasil, o controle de *P. citricarpa* é feito basicamente por meio dos fungicidas Qol. Normalmente, tais fungicidas devem ser utilizados juntamente com os fungicidas cúpricos, conforme recomendado pelos órgãos de pesquisas e extensão (Silva Júnior et al., 2016). Entretanto, por diversos motivos, incluindo custos, nem sempre tal combinação é feita em condições práticas, e isto aumenta a pressão de seleção e maximiza a possibilidade da seleção de estirpes de *P. citricarpa* menos sensíveis aos fungicidas seletivos, incluindo os Qols.

A seleção de mutantes resistentes na natureza dá-se em função principalmente do próprio patossistema (principalmente o potencial reprodutivo do patógeno e sua adaptabilidade ao meio ou “fitness”) e da pressão de seleção exercida sobre a população sensível (Bergamin Filho e Amorim, 2001). Para o caso de *P. citricarpa*, há diversos componentes que potencializam a pressão de seleção e maximizam a possibilidade da seleção de estirpes resistentes. Por exemplo, no Brasil, pela existência de condições favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência do fungo em condições naturais, há abundância das formas infectivas, resultando em elevado nível de inóculo, grande facilidade para a sua disseminação aérea, e disponibilidade de tecidos suscetíveis em grande quantidade e por longos períodos do ano. De certa forma, todos estes componentes mencionados são favoráveis para o crescimento da doença (Kiely, 1948; Kotzé, 1981; Schutte et al., 1997). Praticamente todas as condições conducentes apontadas ocorrem em praticamente todas as regiões produtoras de citros no Brasil (Silva Júnior et al., 2016).

No Brasil há registros na literatura sobre a resistência de patógenos dos citros a diversos fungicidas. No Estado de São Paulo, há relato de resistência de *P. citricarpa* aos benzimidazóis (Rodrigues, et al., 2007), e *Alternaria alternata*, causador da Mancha Marrom de Alternária em *Citrus reticulada* e seus híbridos, especialmente em tangor ‘Murcott’, tangerina ‘Dancy’, tangerina ‘Ponkan’, tangelos ‘Lee’, dentre outros às estrobilurinas (Chitolina et al., 2019). Também, Souza-Polo (2015) relatou a baixa sensibilidade à piraclostrobina e, principalmente, à trifloxistrobina, de parte da população de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* oriundas de pomares cítricos do Estado de São Paulo em população obtida e avaliada no período de 2005 e 2012. Possiede et al. (2009) verificaram que o crescimento micelial de isolados de *P. citricarpa* oriundos dos Estados do Paraná e São Paulo

não foram inibidos por azoxistrobina, mesmo a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. No mundo, há também relatos sobre o comportamento de outras espécies de fungos associadas aos citros as quais desenvolveram resistência aos fungicidas. Dentre tais relatos incluem-se *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento, às estrobilurinas (Ishii et al., 2009), *Elsinoe fawcettii*, agente da verrugose, aos benzimidazóis (Eiki, 1994) e *Penicillium digitatum*, agente causal do bolor verde a imidazol (Eckert, 1987).

Os resultados obtidos neste estudo apontam para a existência de isolados de *P. citricarpa* resistentes a piraclostrobina e trifloxistrobina, estando estes presentes nos pomares amostrados, porém ainda em baixa frequência. Em termos práticos, estes resultados constituem-se em indicações quanto à necessidade do acompanhamento, em escalas mais representativas, dos resultados de controle obtidos visando à mitigação dos riscos de perdas. As recomendações visando ao manejo da resistência, conforme preconizado por órgãos competentes (Frac, 2014) continuam sendo uma ferramenta fundamental para a preservação das moléculas existentes e à minimização das perdas potenciais causadas pelo patógeno, ou oriundo das limitações da eficiência dos fungicidas.

4.3 Análises moleculares

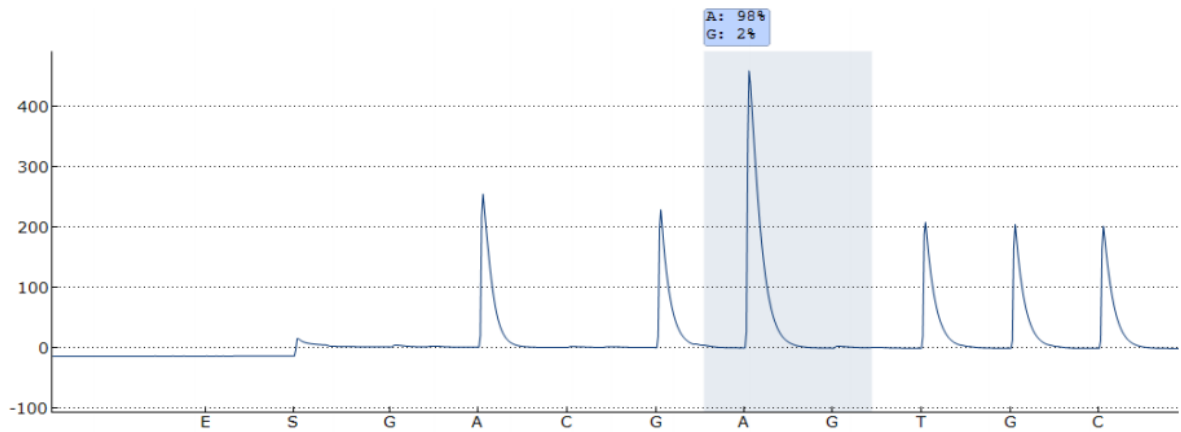
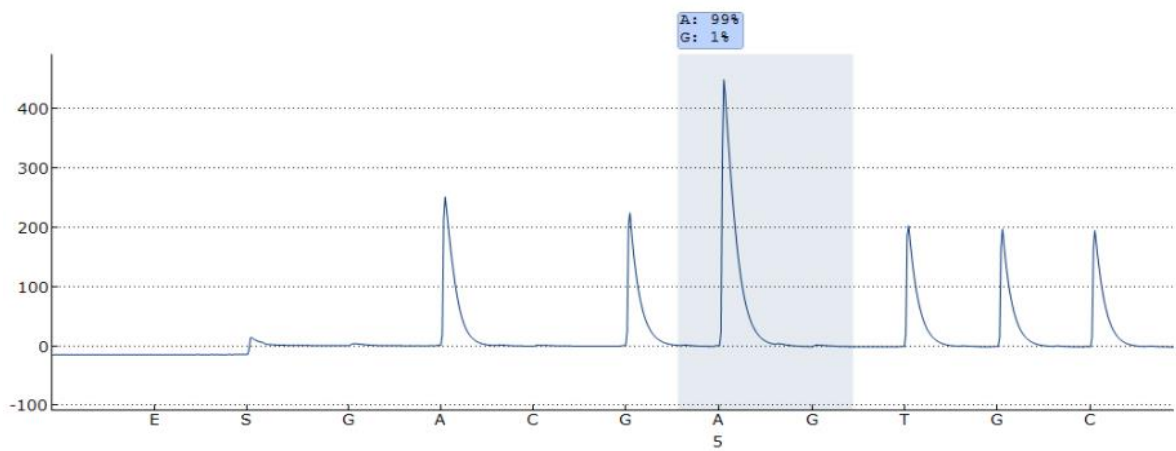
4.3.1. Pirosequenciamento para mutação F129L no gene *cyt b*

Nenhum dos dez isolados de *P. citricarpa* testados pela metodologia do sequenciamento apresentou a mutação F129L no gene *cyt b*. A proporção de bases alélicas A e G referente à análise genética do códon 129 TTC na fita reversa (reversa: AAG = sensível ou GAG = resistente), calculada pelo software nos pirogramas, variou entre 99% e 1%; 98% e 2% e 95% e 5%, respectivamente (Tabela 6). Dentre os isolados avaliados, a predominância deu-se para a proporção alélica de 99% e 1%, com seis isolados (Figura 3).

Tabela 6. Resultado do pirograma. O programa calculou a porcentagem das bases alélicas A e G.

Amostra	Trifloxistrobina EC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Piraclostrobina EC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fenótipo	A(%)	G(%)
RI_024	< 0,0003	< 0,0003	S	99	1
BB_003	108,22	17,673	R	99	1

MG_027	<0,0003	0,0004	S	98	2
MG_020	0,5647	1,552	S	98	2
LA_027	0,038	0,012	S	99	1
BO_006	>300	>300	R	95	5
SCRIP_6	< 0,0003	0,036	S	99	1
RE_007	0,001	>300	S	99	1
Guaraci 3	>300	>300	R	99	1
LA_018	5,9151	>300	R	98	2



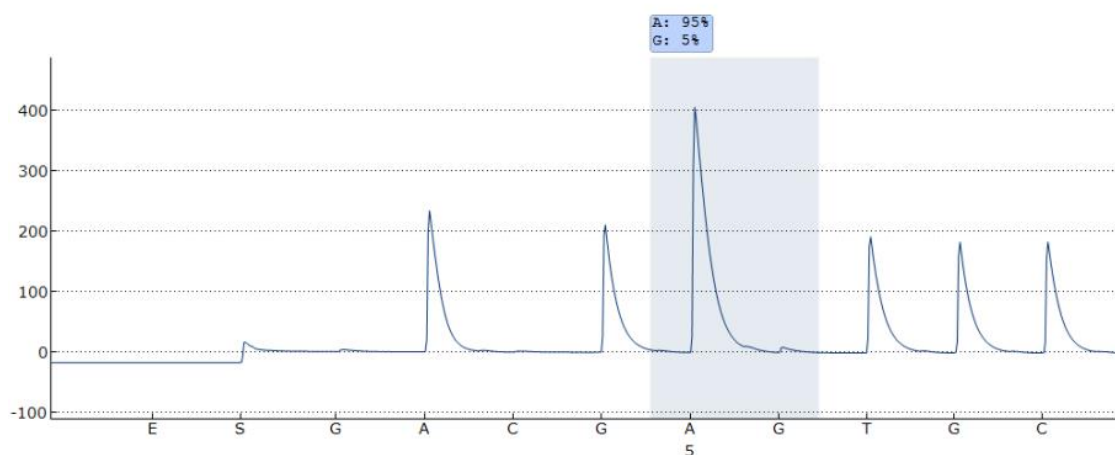


Figura 3. Pirogramas gerados pelo método do pirosequenciamento mostrando a ausência da mutação F129L no gene do citocromo *b* (*cyt b*) de isolados de *Phyllosticta citricarpa* oriundos de pomares cítricos do Brasil. O programa de avaliação quantitativa calculou a porcentagem das bases alélicas A e G. A enzima (E) e o substrato (S) contendo APS e luciferina foram adicionados antes da primeira adição de nucleotídeo.

O ensaio de pirosequenciamento desenvolvido mostrou-se como uma ferramenta eficiente para detecção quantitativa da mutação F129L em amostras de campo de *P. citricarpa*, porém essa mutação não foi encontrada. Este tipo de ensaio está sendo usado rotineiramente na indústria agroquímica para detectar mutações nos genes alvo dos fungicidas e fazer a triagem de resistência (Fountaine, 2011).

4.4 Sensibilidade e monitoramento genético

Diversos isolados de *P. citricarpa*, oriundos dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, avaliados neste estudo, mostraram-se insensíveis aos fungicidas Qol trifloxistrobina e piraclostrobina. No entanto, não foram encontradas mutações pontuais no gene *cyt b* associadas à resistência a estrobilurinas. Provavelmente, isso ocorre por conta de um número baixo de estirpes resistentes, ou em razão da inexistência, no momento, de mutações. Também não se pode descartar a possibilidade de que a baixa sensibilidade dos isolados seja governada por outro mecanismo até então desconhecido. Em algumas espécies de fungos existe a presença de proteínas que formam uma bomba de efluxo na membrana da célula que garante que o fungicida não se acumule dentro da mesma (Thind, 2012); esse é o caso, por exemplo, do fitopatógeno *Mycosphaerella*

graminicola, que possui uma bomba multitransportadora de substâncias que é importante para a resistência aos fungicidas e às toxinas de outros fungos (Roohparvar et al., 2007).

Os perfis comportamentais dos isolados de *P. citricarpa* gerados neste estudo demonstram a existência de uma alta diversidade fenotípica dos elementos da população, expressos pela ampla variação nos valores de EC_{50} . De modo geral, o conhecimento dos valores EC_{50} , ou de qualquer outra medida da sensibilidade do fungicida, não é suficiente para prever a evolução da resistência com os diferentes tratamentos (O'Hara et al., 2000). A adaptabilidade bioquímica deve ser combinada com a adaptabilidade patogênica antes que a resistência possa se tornar um problema, mas a experiência sugere que pode ocorrer de forma surpreendentemente rápida, dependendo da biologia dos organismos envolvidos (Hollomon, 2020).

O fungo *P. citricarpa* encontra-se na classe dos fitopatógenos com risco médio de desenvolvimento de resistência, conforme lista elaborada pelo FRAC (Comitê de Ação à Resistência a Fungicidas) (Frac, 2014). Este risco médio certamente advém em razão do elevado nível de inóculo produzido por *P. citricarpa*, quando sob condições favoráveis ao desenvolvimento dos sintomas, como se verifica na maioria das regiões produtoras de citros no Brasil, e às facilidades para sobrevivência, disseminação e infecção. Aparentemente, com exceção do fator resultante do uso de fungicidas QoI, de forma sucessiva e repetidamente nas safras agrícolas de citros, é de se admitir que a pressão seletiva exercida na população do patógeno ainda é baixa e insuficiente para estimular mudanças genéticas significativas.

Existem vários mecanismos genéticos e bioquímicos que podem levar ao surgimento de resistência dos fungos aos diversos grupos de fungicidas. Do ponto de vista genético ocorre alteração do sítio alvo devido à mutação no gene que o codifica, enquanto no contexto bioquímico pode ocorrer, redução da absorção ou aumento do efluxo do ingrediente ativo ou seus metabólitos secundários; detoxificação da molécula, falta de conversão para o composto ativo; compensação por meio do aumento da produção da enzima alvo; desenvolvimento de vias

metabólicas alternativas que não incluem o sítio alvo do fungicida, dentre outros (Leroux et al., 2002; Yamaguchi e Fujimura, 2005; Brent e Hollomon, 2007a).

Para o caso dos fungicidas Qol, a habilidade seletiva dos fungos é determinada por uma alteração do sítio bioquímico alvo, resultante de mutações, com consequente substituição de uma glicina por uma alanina no codon 143 do gene do *cyt b*. Este tipo de resistência advém de uma mutação pontual, sendo a alteração em um único aminoácido da proteína alvo. Tal alteração pode resultar em alto nível de resistência, caso da mutação G143A (Brent e Hollomon, 2007a). Há, entretanto, a possibilidade de mutações no mesmo gene *cyt b*, porém no codon 129, denominada como F129L, resultante da substituição de fenilalanina por leucina, e também no códon 137, designada G137R, quando da substituição de glicina por arginina. Ambas as situações de mutações implicam em uma resistência de baixo significado prático, pelo fato do baixo ou inexpressivo efeito na eficiência do fungicida para o controle da doença (Gisi et al., 2002).

A indução da respiração alternativa ocorre *in vitro* e foi relatada para várias espécies de fungos fitopatogênicos. A enzima oxidase alternativa AOX2 (Wood e Hollomon, 2003) participa desse mecanismo. Para o caso de *P. citricarpa*, estudos indicam que a adição de SHAM (ácido salicilhidroxâmico), necessário para anular a via da oxidase alternativa inibindo a enzima AOX, não afetou a atividade dos fungicidas Qol, demonstrando que o fungo não utiliza essa via de respiração alternativa (Hincapie et al., 2014).

O método de pirosequenciamento usado neste estudo mostrou-se eficiente para detectar mutação no gene *cyt b*, podendo se constituir em ferramenta importante para análises populacionais focadas em possível presença de mutação no códon 129.

Apesar da exposição prolongada aos fungicidas Qol, alguns fungos ainda não desenvolveram resistência conferida pela substituição G143A (Grasso et al., 2006; Miessner et al., 2011). Alguns autores descrevem que a existência de um íntron logo após o códon 143 no gene *cyt b* pode prevenir a ocorrência da mutação G143A (Grasso et al., 2006; Stammler et al., 2013). Neste estudo não foram identificadas mutações no citado códon, com indicações de que, conforme Stammler e

colaboradores (2013), a priori, os riscos de resistência de *P. citricarpa* aos fungicidas QoI parecem inexistentes ou baixos para os isolados avaliados.

Registros na literatura apontando baixo nível de sensibilidade de populações de *P. citricarpa* a fungicidas QoI foram feitos por vários investigadores. No Brasil, Souza Polo (2015) relatou a presença de isolados de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* oriundas de pomares cítricos do Estado de São Paulo, coletados em 2005 e 2012, exibindo baixa sensibilidade a piraclostrobina e, principalmente, à trifloxistrobina. Segundo a autora, foi verificado que os isolados apresentaram valor de EC_{50} de 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a piraclostrobina e EC_{50} de 421 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a trifloxistrobina. Resultados semelhantes foram também obtidos por Possiede e colaboradores (2009), os quais verificaram que azoxistrobina, mesmo a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não inibiu o crescimento micelial de isolados de *P. citricarpa* oriundos dos Estados do Paraná e São Paulo.

No Brasil, os fungicidas registrados para o controle de *P. citricarpa* são os correspondentes aos QoI, isoladamente ou em formulações comerciais associados aos fungicidas DMI e, carboxamidas, que atuam inibindo a enzima succinato desidrogenase (SDHI) (Fundecitrus, 2019; Agrofite, 2020).

O controle de MPC no Brasil, a partir de 2012 tem sido realizado com os fungicidas QoI, isoladamente ou em combinação com os cúpricos. Normalmente devido a ocorrência simultânea de MPC e do cancro cítrico, causada por *Xanthomonas axonopodis* subsp. *citri*, a citada combinação constitui-se em um protocolo muito comum e empregado mais recorrentemente.

Além de *P. citricarpa*, os fungicidas QoI são registrados para a cultura dos citros visando ao controle de outras doenças fúngicas de importância econômica como a podridão floral dos citros (PFC), causada por pelo menos duas espécies de *Colletotrichum* (Carboni, 2018; Fundecitrus, 2019; Agrofite, 2020), de tal forma que aumenta o nível de exposição entre patógenos e os fungicidas QoI.

O uso frequente e sequencial dos fungicidas QoI visando ao controle das doenças fúngicas associadas à cultura dos citros, ainda que necessário pela falta de opções, vulnerabiliza e reduz a longevidade da eficiência dos respectivos ingredientes ativos. A demonstração da existência de estirpes de *P. citricarpa* pouco sensíveis aos fungicidas QoI soma-se a outros estudos já publicados, onde encontra-se registrada a presença de fungos resistentes a estes fungicidas, como é

o caso de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, agente causal da mancha marrom de alternária (Mondal et al., 2005; Vega e Dewdney, 2014; Condé, 2018; Baraldi, 2019; Chitolina et al., 2019). Desta feita, e dada à fragilidade da eficiência deste grupo de fungicidas pela sua alta exposição, um monitoramento contínuo da sua viabilidade prática é absolutamente recomendável.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo trata-se da primeira investigação sobre a presença de mutações relacionadas à resistência aos fungicidas do tipo QoI em isolados brasileiros de *Phyllosticta citricarpa* de citros. Pelos resultados do teste de microtitulação com os fungicidas, há nas populações de *P. citricarpa* associadas aos citros estirpes que exibem baixa sensibilidade aos fungicidas QoI, trifloxistrobina e piraclostrobina.

Os primers construídos para a amplificação das regiões dos códons 129, 137 e 143 em *P. citricarpa* são inéditos e podem servir para o estudo em outros isolados.

Pelo pirosequenciamento para mutação F129L, em que foi possível observar parte do gene *cyt b* de isolados com baixa sensibilidade, não foi encontrada a mutação F129L.

A detecção de isolados com baixa sensibilidade aos fungicidas QoI é uma indicação de que o uso sequencial e contínuo de fungicidas deste grupo químico visando ao controle de *P. citricarpa* está contribuindo à seleção de linhagens do fungo resistente ou menos sensíveis a esta classe de fungicida, e o significado prático dos resultados obtidos neste estudo deve ser determinado *in locu*, sendo recomendável, inclusive, acompanhado por revisão e reposicionamento do controle de MPC.

A presença de isolados que não apresentaram a mutação F129L pode indicar que a resistência ainda esteja em sua fase de emergência, não significando, no entanto, que isso seja razão para o uso contínuo, e às vezes abusivo de fungicidas QoI.

Os resultados aqui apresentados podem servir de base para as estratégias de manejo da resistência aos fungicidas, que tem como objetivo retardar a emergência e propagação em populações do patógeno inócuos aos respectivos ingredientes ativos, e corrobora instruções próprias e fundamentais para a preservação da eficiência das moléculas disponíveis por meio, por exemplo, da combinação de fungicidas com modo de ação distinto.

6. REFERÊNCIAS

Agrianual 2019: anuário da agricultura brasileira (2019) São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, p. 248 – 254.

Agrodefesa – Agência Goiana de Defesa Agropecuária. 2016. **Sanidade Vegetal – Programa de Citros – Pinta Preta – Instrução Normativa nº 9 de 2015**. Disponível em: <<http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2016-07/instrucaonormativa-0915.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

Agrofit Brasil. Ministério da Agricultura; Pecuária e Abastecimento. AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 03. Fev. 2020

Aguilar-Vildoso CI, Ribeiro JGB, Feichtenberger E, Góes A, Spósito MB (2002) Manual técnico de procedimento da mancha preta dos citros. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 72p.

Almeida TF (2009) **Mancha preta dos citros: expressão dos sintomas em frutos pela inoculação com conídios e controle do agente causal (*Guignardia citricarpa*)**. 79 f. Tese. (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

Amiri A, Heath SM, Peres NA (2014) Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. **Plant Disease** 98:532-539.

Andrade T, Theodoro GF, Goes A, Baldassari RB (2004) Mancha preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado de Santa Catarina. **Summa Phytopathologica** 30:126.

Avenot HF, Michailides TJ (2015) Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil; cyprodinil; boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. **Crop Protection** 78:214–221.

Baayen RP, Bonants PJM, Verkleij GP, Carroll GC, Van der Aa M, Weerdt M, Brouwershaven GC, Schutte GC, Maccheroni Junior, W, Glienke-Blanco C, Azevedo JL (2002) Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia*

citricarpa, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology** 92:464-477.

Baldassari RB, Wickert E, Goes A (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.

Baldassari RB, Goes A (2006) Observações para o controle da Mancha Preta dos Citros (MPC). **Correio Agrícola** 01:22-25.

Baldassari RB, Reis RF, Goes A (2004) Relato de mancha preta dos citros em pomares do Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira** 30:126.

Baldassari RB, Brandimarte I, Andrade AG, Souza DCG, Moretto C, Goes, A (2007) Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja 'Pera-Rio'. **Revista Brasileira de Fruticultura** 29:269-275.

Banno S, Yamashita K, Fukumori F, Okada, K, Uekusa H, Takagaki M, Kimura M, Fujimura M (2009) Characterization of Qol resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene. **Plant Pathology** 58:120-129.

Baraldi ALM (2019) **Sensibilidade de *Alternaria alternata*; agente causal da mancha marrom de alternária a fungicidas do grupo químico das estrobilurinas**. 18 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) – Unesp, Jaboticabal.

Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Dobrzanski BP (2002) Review: the strobilurin fungicides. **Pest Management Science** 58:649-662.

Bassanezi RB, Miranda MP, Lopes SA, Behlau F, Silva Júnior GJ, Sala, I (2017) Influência de pragas e doenças na qualidade do suco de laranja. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/artigo-influencia-de-pragas-e-doencas-na-qualidade-do-suco-de-laranja/546>> Acesso em: 17 fev. 2020.

Bastos DC, Ferreira EA, Passos OS, Sá JF de, Ataíde EM, Calgaro M (2014) Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário** 35:36-45.

Brandão KLS (2009) Sequenciamento e alinhamento de DNA. Piracicaba [s.n]:32.

Bergamin Filho A, Amorim L (2001) Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: consequências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira** 26:119-127.

Bonants, P.; Carroll, G. (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**, 503:513.

Botelho TS, Lourenço FR, Jesus T, Pinto A (2013) Vancomycin microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Current Pharmaceutical Analysis** 9:172-176.

Brasil Agro. Safra de laranja atinge recorde de produtividade (2019) Disponível em:<<https://www.brasilagro.com.br/conteudo/safra-de-laranja-atinge-recorde-de-produtividade.html>> Acesso em 31 dez 2019.

Brent KJ, Hollomon DW (2007a) Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? 2. ed. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.

Brent KJ, Hollomon DW (2007b) Fungicide resistance: the assessment of risk. Brussels: Global Crop Protection Federation; 44p.

Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology** 69:55-60.

CABI/EPPO (2012). *Phyllosticta citricarpa*. (Distribution map). Distribution Maps of Plant Diseases. Wallingford; UK: CABI. Map 53. (Edition 7).

CABI/EPPO (2016) **Guignardia citricarpa** (citrus black spot). Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/26154>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

Caixeta MP, Coraza Nunes MJ, Vida JB, Nunes WN, Tessmann DJ, Zanuto CA, Muller GR (2005) Ocorrência da pinta preta dos citros (*Guignardia citricarpa*) no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira** 30:136.

Carboni RCD (2018) **Complexos de espécies de *Colletotrichum* associados aos citros e a outras frutíferas no Brasil** 48 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

Carvalho MCCG, Silva DCG (2010). Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, 40(3), 735-744.

Casado PS, Carvalho G, Ceresini PC, Castroagudín VL, Sabbag OG, Vicentini SNC, Maciel JLN (2018) Método eficiente, baseado em leitores de microplaca, para detecção de resistência a fungicidas triazóis (IDM) e estrobilurinas (IQe) em populações do patógeno da brusone do trigo. **Summa Phytopathologica** 44:236-244.

Chin KM, Chavaillaz D, Kaesbohrer M, Staub TH, Felsenstein FG (2001) Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* to strobilurins. **Crop Protection** 20:87-96.

Chitolina GM, Silva-Junior GJ, Feichtenberger E, Pereira RG, Amorim L (2019) First Report on Quinone Outside Inhibitor Resistance of *Alternaria alternata* causing Alternaria Brown Spot in Tangerines in São Paulo, Brazil. **Plant Health Progress** 20: 94.

Condé TO (2018) **Caracterização da Resistência de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina a estrobilurinas**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – UFLA, Lavras.

Cools HJ, Bayon C, Atkins S, Lucas JA, Fraaije BA (2012) Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. **Pest Management Science** 68:1034-1040.

Cools HJ, Parker JE, Kelly DE, Lucas JA, Fraaije BA, Kelly SL (2010) Heterologous expression of mutated eburicol 14 α -demethylase (CYP51) proteins of *Mycosphaerella graminicola* to assess effects on azole fungicide sensitivity and intrinsic protein function. **Applied Environment Microbiology** 76:2866-2872.

Coopercitrus. Departamento Técnico Agropecuário, 2014. Citros - Pinta Preta ou Mancha Preta Dos Citros (MPC). Disponível em: <
http://www.coopercitrus.com.br/?pag=artigos_agropecuaria&act=detalhes&artigo=44

&categoria=#:~:text=A%20dissemina%C3%A7%C3%A3o%20de%20fora%20para,qu e%20s%C3%A3o%20dispersos%20a%20curtas > Acesso em: 26 mar 2020.

Costa H, Ventura JA, Arleu RJ, Aguilar-Vildoso CI (2003) Ocorrência da pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira** 28:205.

Degliesposti M, Devries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer A (1993) Mitochondrial cytochrome-b evolution and structure of the protein. **Biochimica Et Biophysica Acta** 1143:243-271.

Doidge EM (1929) Some disease of citrus prevalent in South Africa. **Journal of Science** 26:320-325.

Eckert JW (1987) *Penicillium digitatum* biotypes with reduced sensitivity to imazalil. **Phytopathology** 77:1728.

EFSA PLH (EFSA Panel on Plant Health) (2014). Scientific Opinion on the risk of *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) for the EU territory with identification and evaluation of risk reduction options. **EFSA Journal**. 12:2: 243p.

Eiki H (1994) Emergence of benzimidazole resistant strains of *Elsinoe fawcetti* Jenkins in citrus orchards in Japan. **Annals of the Phytopathological Society of Japan** 60:501-506.

Fagan C, Goes A (2000) Efeito da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutos de laranjas 'Natal' e 'Valência'. **Summa Phytopathologica** 26:122.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016) Citrus fruit; fresh and processed: Statistical Bulletin. 77p. Disponível em: <<http://www.Fao.org/3/a-i8092e.pdf>> Acesso em: 26 mar 2020.

Feichtenberger E (1996) Mancha preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja** 17.

Feichtenberger E, Baldassari RB, Spósito MB, Belasque Junior J (2005) Doenças dos citros. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA. (EdS.) Manual de fitopatologia. São Paulo: Ceres, p.239-269.

Feichtenberger E, Spósito MB (2004) Doenças fúngicas dos citros: Manejo integrado. **Visão Agrícola** 2:44-47.

Felippe JM, Cottas MP, Ikeda M (2004) Eficácia do fungicida pyraclostrobin no controle da Pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros (*Citrus sinensis*). **Fitopatologia Brasileira** 29:S281.

Fernandéz-Ortuño D, Torés JÁ, Devicente A, Pérez_García A (2010) Fungicides, the rise and fall of a successful class of agricultural fungicides. In: Carisse O (Ed). **Fungicides**, InTech 10:203-220.

Fogliata GM, Canton NV, Gálvez MR, Ploper LD, Muñoz L (2004) Eficiência de estrobilurinas en el control de mancha negra de los cítricos (*Guignardia citricarpa*) en limón. **Fitopatologia Brasileira** 29:S261.

Fonseca AE (2017) **Controle da mancha preta dos citros via fungicida cúprico e validação da produção de frutos cítricos em área não livre da doença: estudo de caso**. 63 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

Fountaine JM. Screening for QoI resistance in UK populations of *Rhynchosporium secalis*. Project Report No. 482. HGCA; Edinburgh; 2011.

Frac–Fungicide Resistance Action Committee (2014) **List of Plant Pathogenic Organisms Resistant to Disease Control Agents Pathogen**. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4557563/mod_resource/content/1/list-of-resistant-plant-pathogenic-organisms_may-2018.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2019.

Fundecitrus Pinta Preta (2019) O que é Pinta Preta. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/doencas/pinta-preta>>. Acesso em 10 jan. 2020.

Fundecitrus (2012) Carbendazim: Fundecitrus orienta para a substituição de fungicida rejeitado pelos EUA. Notícias agrícolas. Disponível em: <<http://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/laranja-citrus/101880-carbendazimfundecitrus-orienta-para-a-substituicao-de-fungicida-rejeitado-pelos-eua.html>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

Fundecitrus (2005) Manual de pinta preta. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura. 7p.

Gasparotto L, Goes A de, Pereira JCR, Baldassari RB (2004) Ocorrência da Mancha preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado de Amazonas. **Summa Phytopathologica** 30:126.

Gisi U, Chin KM, Knapova G, K $\ddot{u}$ ng Färber R, Mohr U, Parisi S, Sierotzki H, Steinfeld U (2000) Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. **Crop Protection** 19:863-872.

Glienke C, Pereira OL, Stringari D, Fabris J, Kava-Cordeiro V, Galli-Terasawa L, Cunningham J, Shivas RG, Groenwald JZ, Crous PW (2011) Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia** 26:47-56.

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

Goes A, Almeida, TF (2007) Atualização em Pinta Preta. **Citricultura Atual** 61:14-15.

Goes A, Kimati H (1987) Influência da inoculação de concentrações de inóculo de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* em mudas de abacaxi cv. Perola. **Summa Phytopathologica** s.n.

Goes A, Wit CP. Efeito da combinação de diferentes fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* (1999) **Fitopatologia Brasileira** 34:201-202.

Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A, Gisi U (2006) Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. **Pest Management Science** 62:465-472.

Guarnaccia V, Groenewald JZ, Li H, Glienke C, Carstens E, Hattingh V, Fourie PH, Crous PW (2017) First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe. **Studies In Mycology** 87:161-185.

Hily JM, Singer SD, Villani SM, Cox KD (2011) Characterization of the cytochrome *b* (cyt *b*) gene from *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruit and its

significance in the development of QoI resistance. **Pest Management Science** 67:385-396.

Hincapie M, Wang NY, Peres NA, Dewdney MM (2014) Baseline sensitivity of *Guignardia citricarpa* isolates from Florida to azoxystrobin and pyraclostrobin. **Plant Disease** 98:780-789.

Hollomon DW. Frac–Fungicide Resistance Action Committee – Textos técnicos: Definições e Conceitos (2020). Disponível em: <<https://www.frac-br.org/definicoes-e-conceitos>>. Acesso em: 16 fev 2020.

Ishii H, Fountaine J, Chung WH, Kansako M, Nishimura K, Takahashi K, Oshima M (2009) Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. **Pest Management Science** 65:916-922.

Jiang J, Ding L, Michaelidis TJ, Hongye L, Ma Z (2009) Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 93:72-76.

Kava-Cordeiro V, Rodríguez A, Vicent A, Glienke C, Peña L (2012) D-limonene down regulation in transgenic sweet orange provides protection against citrus blacks pot symptoms induced in detached fruits. **Proceedings of the International Society of Citriculture** 01:82.

Kiely TB (1948) Control and epiphytology of black spot of citrus on the central coast of New South Wales. New South Wales: Department of Agriculture Science Bulletin, 88p.

Kimati H (1987) Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. **Agrotécnica** 01:5-7.

Klosowski AC, May de Mio L, Miessnet S, Rodrigues R, Stammer G (2016) Detection of the F129L mutation on the cytochrome *b* gene on *Phakopsora pachyrhizi*. **Pest Management Science** 72:1211-1215.

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

Kotzé JM (1981) Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease** 65:945-950.

Kotzé JM (1996) Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Proceeding International Society of Citriculture** 1296-1299.

Leadbeater A (2012). Resistance risk to QoI fungicides and anti-resistance strategies. In: Thind, T.S. (Ed.). **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. Oxfordshire: CABI, 12:141-154.

Leroux P, Gredt M, Leroux M, Walker AS (2010) Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. **Applied and Environmental Microbiology** 76:6615-6630.

Leroux P, Albertini C, Gautier A, Gredt M, Walker AS (2007) Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest Management Science** 63:688-698.

Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Lanen C, Bach J, Gredt M, Chapeland F (2002) Mechanism of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. **Pest Management Science** 58:876-888.

Lima WG, Spósito MB, Amorim L, Gonçalves FP, Filho PAM (2011) *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology** 131:157-165.

Lopes NSL, Silva AS, Pereira CCO, Menezes IPP, Malafaia G, Lima MLPL (2015) Sensibilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. **Multi-Science Journal**, 1(1):106-114.

Lourenço FR, Jesus T, Pinto A (2011) Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** 47:3:573-584.

Ma Z, Felts D, Michailides TJ (2003). Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 77:2:66-74.

Machado MA, Cristofani-Yaly M, Bastianel M (2011) Breeding: genetic and genomic of citrus for disease resistance. **Revista Brasileira de Fruticultura** 33:158-172.

Manfredini RA (2015) Desenvolvimento e Validação Método de Análise de Sequências Genômicas Baseada em Padrões de Entropia, Coeficiente de Clusterização e Periodicidade. 78 f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul.

McOnie KC (1964a) Orchard development and discharge of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. **Phytopathology** 54:1448.

McOnie KC (1964b) Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*; the citrus black spot pathogen. **Phytopathology** 54:64-67.

Miessner S, Mann W, Stammler G (2011) *Guignardia bidwelli*: the causal agent of black rot on grapevine has low risk for Qol resistance. **Plant Disease and Protection** 118:51-53.

Miessner S, Stammler G (2010) *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fruticola*: Risk estimation of resistance to Qol fungicides and identification of species with cytochrome *b* gene sequences. **Journal of Plant Diseases and Protection** 117:162-167.

Miranda MP, Noronha Júnior NC, Marques RN (2011) Alternativas para o manejo do vetor do Greening no Brasil. In: Baldin ELL, Fujihara RT, Firmino AC, Negrisoni E, Souza ES, Prado EP, Marubayashi JM. (Ed.). Avanços em Fitossanidade. Botucatu: Unesp/Fepaf, p.143-163.

Mondal SN, Bhatia A, Shilts T, Timmer W (2005) Baseline Sensitivities of Fungal Pathogens of Fruit and Foliage of Citrus to Azoxystrobin, Pyraclostrobin and Fenbuconazole. **Plant Disease** 89:1186–1194.

Neves MF, Jank MS. Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015. Relatório Ícone/Markestra/Pensa, São Paulo, 2006.

Nunes, WMC, Croce Filho, J, Severino JJ, Zanutto, CA, Tessmann DJ, Maficioli R, Corazza-Nunesm J, Vida JB (2006) Ocorrência de pinta preta causada por

Guignardia citricarpa em tangerineiras 'Montenegrina' no sul do Paraná. **Summa Phytopatholyca** 32:295-295.

Obenrader S (2003) The Sanger method. In Sarah Obenrader: **Molecular Biology**. Disponível em: http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Obenrader/sanger_method_page.htm. Acesso em: 11 ago. 2020.

Parreira DF, Neves WS, Zambolim L (2009) Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** 03:24-34.

Passos OS, Filho W dos SS, Sobrinho AP da C (2005) Classificação Botânica. In: Filho H PS, Magalhães AF de J, Coelho YdaS (Ed.) Citros – 500 Perguntas 500 Respostas. Embrapa: Brasília, p. 15-18.

Peres NAR, Souza NL, Zitko SE, Timmer LW (2002) Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease** 86:620-624.

Phytus, Atualizações. Fungicidas: Modo de ação e Programas de controle. 2014. Módulo I – Instituto Phytus. Disponível em: < <https://www.passeidireto.com/arquivo/5613178/apostila-fungicidas-modulo-1-4> > Acesso em: 13 ago. 2020.

Pinto LS, Kremer FS (2016) Plataformas de Sequenciamento de Nova Geração & Pré processamento de dados. Disponível em: < http://labbioinfo.ufpel.edu.br/aulas_2016/Capitulo%203.pdf > Acesso em: 11 ago. 2020.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT (2010) Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos; correlatos e cosméticos. 3 ed. Atheneu: São Paulo.

Possiede YM, Gabardo J, Kava-Cordeiro V (2009) Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. **Brazilian Journal of Microbiology** 40:308-313.

Reis EM, Forcelini CA, Reis AC (2001) Manual de fungicidas. Guia para o controle químico de doenças de plantas. 4ª ed. Insular: Florianópolis.

Roohparvar R, De Waard MA, Kema GH, Zwiers LH (2007) MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides. **Fungal Genetics and Biology** 44:378-388.

Robbs; CF (1990) A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça à citricultura paulista. **Laranja** 11:87-95.

Robbs CF, Pimentel JP, Ribeiro RLD (1980) A mancha preta dos frutos cítricos causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira** 5:455.

Rodrigues MBC, Andreote FD, Spósito MB, Aguillar-Vildoso CI, Araújo WL, Pizzirani-Kleiner AA (2007) Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42:323-327.

Rossetto MP (2009) Resistência varietal e manejo da mancha preta dos citros. 75 f. (Dissertação de Mestrado) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.

Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P (1996) Real-Time DNA Sequencing using Detection of Pyrophosphate Release. **Analytical Biochemistry** 242(1) 84-89.

Rossetto MP, Azevedo FA, Martelli IB, Schinor EH (2011) Avaliação da mancha preta dos citros em diferentes variedades de laranja doce. **Bragantia** 70:58-63.

Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, **Journal of Molecular Biology** 94 (3): 441–448

Santos A (2019) CNA BRASIL. Comunicação Sistema Faeg/Senar. A importância da citricultura nacional. Disponível em: < <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/a-importancia-da-citricultura-nacional>> Acesso em 31 dez. 2019.

Santos PSJS (2016). Estudo da sistemicidade e tenacidade de epoxiconazol, piraclostrobina e fluxapiroxade em plantas de soja e videira. X f. Tese (Doutor em Agronomia) – Esalq, Piracicaba.

Scaloppi EMT (2006) Determinação do efeito curativo de infecções de *Guinardia citricarpa* em frutos cítricos mediante o emprego de fungicidas sistêmicos e mesostêmicos. 88 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

Schinor EH, Mourão Filho FAA, Aguilar-Vildoso CI, Teófilo Sobrinho J (2002) Incidência e severidade da mancha preta dos citros em seleções de laranja 'Pêra' e variedades afins. **Laranja** 23:387-400.

Schutte GC, Beeton KV, Kotzé JM (1997) Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease** 81:851-854.

Shabi E, Katan T (1983) Occurrence and control of anthracnose of almond in Israel. **Plant Disease** 67:1364-1366.

Shabi E, Katan T, Elisha S (1993) Taxonomical determination of pathogenic *Colletotrichum gloeosporioides* of almond, anemone and avocado according to fungicide sensitivity. **Phytoparasitica** 21:2.

Sierotzki H, Frey R, Wullschlegel J, Palermo S, Karlin S, Godwin J, Gisi, U (2007) Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for Qol resistance. **Pest Management Science** 63:225-233.

Silva Júnior GJ, Feichtenberger E, Spósito MB, Amorim L, Bassanezi RB, Goes A (2016) Pinta preta dos citros. A doença e seu manejo. Araraquara: Fundecitrus, 208p.

Silva Júnior GJ, Behlau F, Bassanezi RB, Lopes AS (2015) Doenças limitantes na citricultura brasileira: manejo atual e perspectivas. In: Colmán, A. A. et al. (org.). Doenças em Espécies Florestais e Frutíferas. Viçosa: UFV. p. 83-112.

Silva-Pinhati ACO, Goes A, Wickert E, Almeida RF, Machado MA (2009) Mancha preta dos citros: epidemiologia e manejo. **Laranja**. 30:45-64.

Sivanesan A (1984) The bitunicate ascomycetes and their anamorphus. J. Cramer.; Germany. 701p.

Soares Filho WS, Cunha Sobrinho AP, Passos OS, Souza AS (2013) Melhoramento Genético. In: Cunha Sobrinho, A. P. da, Magalhães, A. F. de J., Souza, A. da S., Passos, O. S., Soares Filho, W. dos S. (Ed.). Cultura dos Citros. Brasília: Embrapa, p. 61-102.

Sousa PFC, Goes A (2010) Reação de laranjeiras doces quanto à resistência a *Guignardia citricarpa*. **Revista Brasileira de Fruticultura** 32:718-725.

Souza Pollo A (2015) ***Phyllosticta citricarpa*: diversidade genética temporal em pomares de *citrus sinensis* e sensibilidade a fungicidas**. 74 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Unesp, Jaboticabal.

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

Stammler G (2009). *Botrytis cinerea*. Microtiter test. Basf. Disponível em: <https://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/botrci-microtiter-monitoring-method-basf-2009-v2.pdf?sfvrsn=7b9a419a_4> Acesso em: 20 dez. 2019.

Stammler G (2012) Resistance risk of corn pathogens to QoI fungicides. **Outlooks on Pest Management** 23:211-214.

Stammler G, Schutte GC, Speakman J, Miessner S, Crous PW (2013) *Phyllosticta* species on citrus: risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. **Crop Protection** 48:6 -12.

Stammler G, Speakman J (2006) Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. **Journal of Phytopathology** 154:508-510.

Stringari D (2009) Sistemática e diversidade genética de isolados de *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* spp. nos estados do Paraná e São Paulo. 209 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – UFPR, Curitiba.

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

Thing TS (2012) **Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management**. New Delhi: CABI, 296.

Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH (2000) Compendium of citrus diseases. St Paul: APS Press, 92p.

Timossi AJ, Goes A, Kupper KC, Baldassari RB, Reis RF (2003) Influência da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira** 28:489-494.

Tollig B, Merwe JL, Van Der Schutte G.C (1996) BAS 490 F: A new fungicidal strobirulin for the control of citrus black spot. **Proceedings International Society Citriculture** 01:369-371.

USDA. (2020) Citrus: World Markets and Trade. US Department of Agriculture. Disponível em: < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> > Acesso em: 26 mar. 2020.

Vallières C, Trouillard M, Dujardin G, Meunier B (2011) Deleterious effect of the Qo inhibitor compound resistance-conferring mutation G143A in the intron-containing cytochrome *b* gene and mechanisms for by passing it. **Applied and Environmental Microbiology** 77:2088-2093.

Vega B, Dewdney MM (2014) Distribution of QoI Resistance in Populations of Tangerine-Infecting *Alternaria alternata* in Flórida. **Plant Disease** 98:67–76.

Vieira Junior JR, Fernandes CF, Antunes J, Silva DSG, Reis ND, Lima RF, Fernandes Neto A, Silva RB (2010). Levantamento da ocorrência da pinta preta dos citros em Rondônia: primeira atualização Embrapa Rondônia-Comunicado Técnico (Infoteca-e).

Vincelli P (2002). **QoI (strobilurin) Fungicides: Benefits and Risks**. APS, 2002. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/StrobilurinFungicides.aspx>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

Wang X, Chen G, Huang F, Zhang J, Hyde KD, Li, H. (2011) *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. **Fungal Diversity** 52:209-224.

Webber JH (1967) History and development of the Citrus industry. In: REUTHER, W., Batchelor, L D., Weeber, H. J. (Ed.). The citrus industry, Berkeley: University of California Press, p. 1-39.

Wickert E, Goes A, Lemos EGM, Souza A, Silveira ÉL, Pereira, FD, Rinaldo D (2009) Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp. oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1-5,8s-ITS2. **Revista Brasileira de Fruticultura** 31:360-380.

Wikey S, Lombardi L, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Cheewangkoon R, McKenzie EHC, Hyde KD, Crous PW (2013) A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). **Studies in Mycology** 76:1-29.

Wikey S, Udayanga D, Crous PW, Chukeatirote E, McKenzie EHC, Bahkali AH, Dai D, Hyde KD (2011) *Phyllosticta* - an overview of current status of specie recognition. **Fungal Diversity** 51:43-61.

Wightwick A (2010) **Fungicides**. Rijeka:Intech, 548.

Wood PM, Hollomon DW (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. **Pest Management Science** 59:499-511.

Wu GA, Terol J, Ibanez V, López-García A, Pérez-Román E, Borredá C, Domingo C, Tadeo FR, Carbonell-Caballero J, Alonso R, Curk F, Du D, Ollitrault P, Roose ML, Dopazo J, Gmitter FG Jr, Rokhsar DS, Talon M (2018) Genomics of the origin and evolution of Citrus. **Nature** 554:311–316.

Wulandari NF, To-Anun C, Hyde KD, Duong LM, de Gruyter J, Meffert JP, Groenewald JZ, Crous PW (2009) *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of citrus tan spot of Citrus maxima in Asia. **Fungal Diversity** 34:23–39.

Yamaguchi J, Fujimura M (2005) Recent topics on action mechanisms of fungicides. **Journal of Pesticide Science** 30:67-74.

Yin YN, Kim YK, Xiao CL (2012) Molecular characterization of pyraclostrobin resistance and structural diversity of the cytochrome b gene in *Botrytis cinerea* from apple. **Phytopathology** 102:315-322.