

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 10/07/2022.

**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)

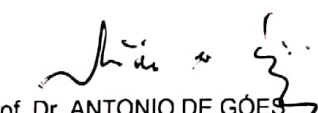
**AUTORA: NADIA MARIA POLONI**

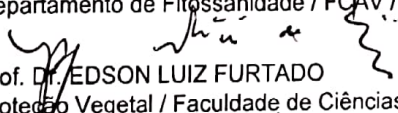
**ORIENTADOR: ANTONIO DE GÓES**

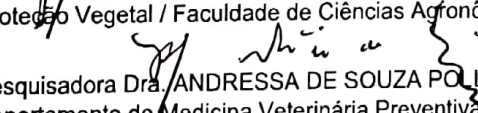
**COORDINADORA: KELLY SIMÕES**

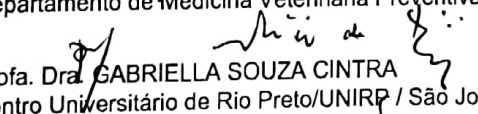
**COORDINADORA: FERNANDA DIAS PEREIRA**

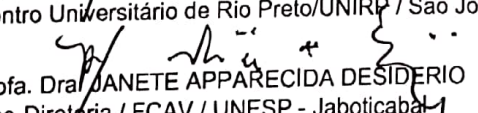
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

  
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

|                                                                                                                                           |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                                        | <b>iii</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                      | <b>iv</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                | <b>1</b>   |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                                                                     | <b>4</b>   |
| 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         |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                        | <b>20</b>  |
| 3.1 Material biológico .....                                                                                                              | 20         |
| 3.2 Identificação de isolados de <i>Phyllosticta citricarpa</i> por marcador morfológico<br>meio aveia-água.....                          | 21         |
| 3.3 Avaliação da sensibilidade de isolados de <i>Phyllosticta citricarpa</i> a fungicidas QoI<br>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         |

|                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                    | <b>27</b> |
| 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        |
| <b>5. CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                | <b>42</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                | <b>43</b> |

**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  $\text{EC}_{50}$  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  $\text{EC}_{50}$  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.

## 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](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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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](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](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, Küng 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 $\alpha$ -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, Negrissoli 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](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](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 laranjeira '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 QoI 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](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.