

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Phyllosticta citricarpa*: DIVERSIDADE GENÉTICA**
TEMPORAL EM POMARES DE *Citrus sinensis* E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

Andressa de Souza
Engenheira Agrônoma

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Phyllosticta citricarpa*: DIVERSIDADE GENÉTICA
TEMPORAL EM POMARES DE *Citrus sinensis* E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS**

Andressa de Souza

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Co-orientadores: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

S729p Souza, Andressa de
Phyllosticta citricarpa: diversidade genética temporal em pomares de *Citrus sinensis* e sensibilidade a fungicidas. / Andressa de Souza. – Jaboticabal, 2015
vii, 74 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Antonio de Goes

Banca examinadora: Marcel Bellato Spósito, Vitor Fernandes Oliveira de Miranda, Janete Aparecida Desiderio, Sérgio Florentino Pascholati

Bibliografia

1. *Citrus sinensis*, *Phyllosticta citricarpa*. 2. Mancha Preta dos Citros. 3. Filogenia. 4. AFLP. 5. Sensibilidade a fungicidas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:634.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: *Phyllosticta citricarpa*: DIVERSIDADE GENÉTICA TEMPORAL EM POMARES DE *Citrus sinensis* E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

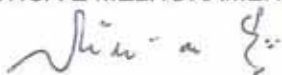
AUTORA: ANDRESSA DE SOUZA

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANTONIO DE GOES

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



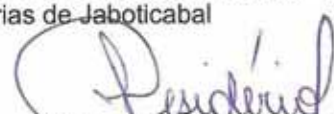
Prof. Dr. MARCEL BELLATO SPÓSITO

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP



Prof. Dr. VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 27 de fevereiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRESSA DE SOUZA – nascida em 10 de agosto de 1985, em São Bernardo do Campo, SP. Engenheira Agrônoma formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, SP, em fevereiro de 2009. Na graduação estagiou, no período de abril de 2004 a agosto de 2008 no Departamento de Fitossanidade, no Laboratório de Fitopatologia, e no Departamento de Tecnologia, no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, na área de fitopatologia e genética de populações de fitopatógenos, como bolsista do CNPq, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes e co-orientação da Dra. Ester Wickert. O Estágio de Conclusão de Curso foi realizado no período de julho a dezembro de 2008 na filial da Monsanto do Brasil Ltda. em Uberlândia, MG, com bolsa de complementação educacional. Concluiu a graduação com o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Diversidade genética e caracterização de isolados de *Guignardia* spp. de diferentes hospedeiros através de marcadores moleculares e testes de patogenicidade”. Em março de 2009, ingressou no curso de Pós-Graduação, Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, pela FCAV/UNESP, como bolsista CNPq e, posteriormente, FAPESP, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes e co-orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos e da Dra. Ester Wickert. A dissertação de mestrado intitulada “Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados a sintomas de antracnose em mangueiras”, foi defendida em 28 de fevereiro de 2011. Em março de 2011, ingressou no curso de Pós-Graduação, Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, pela FCAV/UNESP, como bolsista CNPq. Ainda no ano de 2011, passou em concurso público e assumiu o cargo de Assistente de Suporte Acadêmico IV, no mês de setembro, para se responsabilizar tecnicamente pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular, localizado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV/UNESP.

“Feliz o homem que achou sabedoria e o homem que obtém discernimento, porque tê-la por ganho é melhor do que ter por ganho a prata, e tê-la como produto é melhor do que o próprio ouro. Ela é mais preciosa do que os corais, e todos os outros agrados teus não se podem igualar a ela. Ela é árvore de vida para os que a agarram, e os que a seguram bem devem ser chamados de felizes”

- Provérbios 3:13-15, 18

“Os ousados começam, mas só os determinados terminam.”

- George Bernard Shaw

“Pedras no caminho?

Guardo todas...

Um dia construirei um castelo”

- Fernando Pessoa

Dedico,

A Jeová por ter guiado meus passos...

Ofereço,

À minha mãe Rose, ao meu irmão Alessandro...
e ao meu noivo Gustavo pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Câmpus de Jaboticabal e ao curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade e ensino.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros meses do curso de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento do projeto de pesquisa que originou essa Tese.

Ao Laboratório de Fitopatologia, ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) e ao Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM) que disponibilizaram toda infraestrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador Antonio de Goes, meu pai científico, obrigada mais uma vez por ter acreditado e apoiado o desenvolvimento deste projeto desafiador. Obrigada por se tornar a peça chave do ciclo Graduação, Mestrado e Doutorado que se finda agora aos 11 anos de muita dedicação e amizade. Resta-nos agora mais uma longa caminhada de amizade e parceria profissional.

À minha co-orientadora Eliana G. de Macedo Lemos, profissional exemplar, que apostou mais uma vez no meu trabalho, confiando a estrutura do seu laboratório para o desenvolvimento do projeto e a responsabilidade de um equipamento, cujo aprendizado adquirido acrescentou significativamente na minha formação. Obrigada pela confiança, amizade e apoio.

Ao meu co-orientador Jackson A. M. de Souza, obrigada pelo apoio, pelas oportunidades em ministrar aulas e pela disponibilidade.

Mesmo distante, não posso deixar de agradecer à Ester Wickert, meu exemplo. Obrigada pelas oportunidades de aprendizado que hoje se tornaram o meu meio de subsistência. Muito obrigada por ter compartilhado comigo momentos valiosos e ter me dado toda a base de um conhecimento que não tem preço.

Um agradecimento especial à minha irmã científica e amiga Roberta C. D. Carboni que esteve do meu lado nesses últimos anos, na alegria e na tristeza, quando tudo dava certo e quando tudo dava errado. Conseguimos trabalhar juntas com enorme sintonia, dedicação e carinho em absolutamente tudo que fizemos. Não tenho palavras para agradecer a oportunidade de ter uma parceira como você.

Obrigada aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, onde trabalhei, que compreenderam a importância da obtenção do meu título de Doutorado, e permitiram que eu utilizasse a estrutura do Departamento para o desenvolvimento do meu projeto e da minha co-orientada Roberta.

Aos membros da banca examinadora tanto da qualificação quanto da defesa de Tese pelas valiosas correções e sugestões.

Obrigada às alunas do LEM, que deixaram de ser apenas alunas e passaram a ser minhas amigas, me apoiando em todos os momentos cruciais que envolveram o desenvolvimento desse projeto. À Luciana Lacerda, Mariana Casagrande, Cinthia, Mariah Alves e Marita, muito obrigada pela amizade, confiança e carinho.

A todos os amigos do LBMP que me apoiaram, me ajudaram e me escutaram, em especial Gisele, Silvana, Camila, Gabriela e João Carlos. Um obrigado à Michele que mesmo distante nunca esqueceu de mim.

À minha família, um agradecimento especial para a minha mãe Rose sempre ao meu lado em todos os momentos mais importantes da minha vida, meu irmão e amigo Alessandro, ao meu pai Wagner, aos meus avós Rosentina e Reinaldo que sempre acreditaram em mim, e aos meus tios Wagner, Sônia, Valter, Josy e Elza, e primos Glaucon, Anderson e Adrian, e à minha avó Maria pelo amor e apoio em todos os anos da minha vida.

Agradeço ao meu noivo, futuro marido Gustavo, minha razão, pelo apoio incondicional nesses anos difíceis que deixei de dedicar tempo suficiente para nós em prol de cumprir mais este compromisso. Obrigada pela compreensão, companheirismo, amor e carinho e por fazer parte de todas as etapas importantes da minha vida.

À todos que porventura não foram mencionados, mas que contribuíram de uma forma ou de outra para a conclusão de mais essa etapa...

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Gênero <i>Phyllosticta</i>	3
2.2. Mancha Preta dos citros.....	5
2.2.1. Etiologia, origem e distribuição geográfica da doença	5
2.2.2. Epidemiologia	6
2.2.3. Sintomatologia.....	9
2.2.4. Controle da doença	10
2.2.5. Resistência a fungicidas.....	11
2.3. Caracterização molecular de espécies de <i>Phyllosticta</i> spp.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Amostragem e obtenção dos isolados de <i>Phyllosticta</i> spp.....	16
3.2. Extração de DNA.....	18
3.3. Sequenciamento da região ITS rDNA e dos genes GPDH e TEF1	20
3.4. Marcadores moleculares AFLP	22
3.5. Isolamento e clonagem de fragmentos de DNA obtidos pelo AFLP	25
3.6. Testes de sensibilidade a fungicidas	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Amostragem e obtenção dos isolados de <i>Phyllosticta</i> spp.....	29
4.2. Sequenciamento da região ITS rDNA e dos genes GPDH e TEF1	31
4.3. Marcadores moleculares AFLP	34
4.4. Isolamento e clonagem de fragmentos de DNA obtidos pelo AFLP	41
4.5. Testes de sensibilidade a fungicidas	44
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	59

***Phyllosticta citricarpa*: DIVERSIDADE GENÉTICA TEMPORAL EM POMARES DE *Citrus sinensis* E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS**

RESUMO – A Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, encontra-se espalhada pelos continentes do mundo. Seus sintomas ocasionam a depreciação dos frutos e a queda prematura daqueles severamente infectados. Dada a importância econômica desta doença, realizamos a análise da estrutura genética de duas coleções de isolados de *P. citricarpa*, obtidas de uma única propriedade citrícola, em um intervalo de sete anos. Os frutos foram coletados de laranjeiras ‘Pera’ e ‘Valência’ nos anos de 2005 e 2012. Os isolados obtidos foram identificados mediante a análise de sequências da região ITS e genes GPDH e TEF1. Assim, 80 isolados da coleção de 2005 e 115 de 2012 foram identificados como *P. citricarpa*. Apenas seis isolados de *Phyllosticta capitalensis* foram encontrados em meio aos de 2012. Maior quantidade de sequências com variações genéticas foram identificadas nos isolados obtidos na última amostragem de frutos, principalmente nas populações oriundas de ‘Valência’. A diferenciação genética entre as populações de *P. citricarpa* de laranjeiras ‘Valência’, de 2005 e 2012, foi evidenciada mediante o emprego de marcadores AFLP, sendo o genótipo predominante em 2012 aquele identificado nas populações de ‘Pera’, de ambos os períodos. Pela análise da relação genética entre os isolados, presumiu-se que indivíduos cujo genótipo tenha sido favorecido apareceram primeiramente entre as populações de *P. citricarpa* que abrigavam as plantas de ‘Pera’, e posteriormente, migraram para os pomares de ‘Valência’. Esta uniformização populacional ao longo dos sete anos e o baixo polimorfismo notado entre os isolados ao longo de gerações são indicativos de baixa recombinação genética entre os indivíduos. Sequências das bandas polimórficas entre os isolados de ‘Valência’ de 2005 e 2012 apresentaram similaridade com aquelas de proteínas da família de *ABC transporters*, as quais atuam como bombas de efluxo de compostos citotóxicos, como os fungicidas, e com proteínas NADH desidrogenase. Tais modificações gênicas podem ser responsáveis pela variabilidade nas respostas de sensibilidade dos isolados às estrobilurinas, cuja inibição do crescimento miceliano variou de 2,5 a 89%. Parte da população apresentou baixa sensibilidade à piraclostrobina e, principalmente, à trifloxistrobina. Também, foram encontrados isolados *P. citricarpa* resistentes ao carbendazim em meio aos da coleção de 2012. Concluímos que populações de *P. citricarpa* de um micro-habitat podem sofrer alterações genéticas significativas em um curto período de tempo e suplantam as populações menos favorecidas.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*, *Phyllosticta citricarpa*, Mancha Preta dos Citros, Filogenia, AFLP, sensibilidade a fungicidas.

***Phyllosticta citricarpa*: TEMPORAL GENETIC DIVERSITY IN *Citrus sinensis* ORCHARDS AND SENSITIVITY TO FUNGICIDES**

ABSTRACT – Citrus Black Spot (CBS), caused by the fungus *Phyllosticta citricarpa*, is spread over continents in the world. Its symptoms cause fruit depreciation and those severely infected fall prematurely. Given the economic importance of this disease, we carried out analysis of the genetic structure of two *P. citricarpa* isolates collections, obtained from a single citrus farm in a seven years interval. Fruits were collected from Pera and Valencia orange varieties in 2005 and 2012. The isolates obtained were identified by sequences analysis of ITS region and GPDH and TEF1 genes. Thus, 80 and 115 isolates of the 2005 and 2012 collections, respectively, were identified as *P. citricarpa*. Among the 2012 collection only six *Phyllosticta capitalensis* isolates were found. Higher amount of sequences containing genetic variations were identified in the isolates from the last fruits sampling, especially in populations derived from Valencia oranges. By applying AFLP markers it was evidenced genetic differentiation among *P. citricarpa* populations from Valencia oranges obtained between 2005 and 2012, whose predominant genotype in 2012 was that found in Pera populations from both periods. Through analysis of genetic relationship among isolates, it was assumed that individuals with favored genotypes have first appeared among *P. citricarpa* populations of Pera plants, and further migrated to Valencia orchards. Genetic populations uniformity over the seven years and low polymorphism observed among them, over generations, are indicative of low genetic recombination between individuals. Sequences of polymorphic bands between isolates of 2005 and 2012 Valencia collections presented similarity with those of ABC transporters Family proteins, which act as efflux pumps of cytotoxic compounds, as fungicides, and to NADH dehydrogenase proteins. Such gene modifications might be responsible for variability of sensibility responses of the isolates to strobilurins, which induced mycelial growth inhibition from 2.5 to 89%. Part of the population exhibited low sensitivity to pyraclostrobin and especially to trifloxystrobin. Also, among isolates of 2012 collection it was noted resistance to carbendazim. We concluded that *P. citricarpa* populations from a microhabitat can suffer significant genetic changes in a short period of time and overcome the disadvantaged populations.

Keywords: *Citrus sinensis*, *Phyllosticta citricarpa*, Citrus Black Spot, Phylogeny, AFLP, fungicides sensibility.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura tem contribuído de forma significativa para o desenvolvimento do agronegócio brasileiro. O primeiro núcleo citrícola nacional foi criado em 1920 nos arredores de Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro, que até então abastecia inclusive as cidades do estado de São Paulo. A partir da década de 1940, a citricultura passou a ocupar espaço no Vale do Paraíba e em outras regiões do interior paulista, substituindo o café nos municípios de Limeira, Araraquara e Bebedouro (NEVES et al., 2011).

No entanto, o acontecimento determinante que favoreceu o destaque brasileiro no comércio citrícola mundial foi uma geada que, em 1962, atingiu os pomares da Flórida, nos Estados Unidos da América, que até então eram os maiores produtores mundiais de laranja e de suco. A partir deste ano, o Brasil passou a trabalhar em prol da consolidação da indústria brasileira de suco concentrado de laranja, passando a fazer as primeiras exportações experimentais. A partir da década de 1980, a competitividade da indústria brasileira fez com que o Brasil se tornasse o maior produtor mundial de frutos cítricos, superando os Estados Unidos não só em produção como em tecnologia de citros. As indústrias brasileiras de suco detêm 50% da produção mundial e exportam 98% do que produzem (NEVES et al., 2011). A produção anual de frutos cítricos no Brasil é de cerca de 17 a 18 milhões de toneladas, seguido pelos Estados Unidos que produzem oito milhões de toneladas (FAO, 2014).

A principal ameaça à citricultura são as pragas e doenças. Nos últimos anos, dentre os maiores responsáveis pela erradicação de milhões de plantas destacam-se a tristeza dos citros, o cancro cítrico, a Clorose Variegada dos Citros, a morte súbita e o huanglongbing¹. Além disso, os gastos excessivos com defensivos agrícolas, especialmente inseticidas e fungicidas, ocasionaram a redução de 13% da área plantada de citros no Brasil nos últimos três anos, correspondendo atualmente a 735.742 hectares (AGRIANUAL, 2014).

Além das doenças mencionadas, há também as causadas por fungos, com destaque para a Mancha Preta dos Citros (MPC), ocasionada por *Phyllosticta*

¹ Também conhecido como HLB, *greening* ou amarelão dos citros

citricarpa (VAN DER Aa, 1973). Os sintomas da MPC ocasionam a depreciação dos frutos destinados ao mercado *in natura* e a queda prematura dos mesmos (GOES et al., 1990; TIMMER, 1999). A doença encontra-se espalhada pelo mundo, no entanto, ainda não foi relatada nos países da União Europeia, para os quais a MPC é considerada doença quarentenária A1. Tais países impõem restrições de importação de frutas cítricas de áreas consideradas não livres da doença, incluindo grande parte das regiões brasileiras produtoras de citros (EFSA PLH PANEL, 2014).

O controle da MPC está alicerçado, quase que exclusivamente, no emprego de fungicidas, aplicados de forma sequencial, complementado com práticas culturais utilizadas para reduzir as fontes de inóculo da doença (GOES, 2002; SCALOPPI et al., 2012). Devido a barreiras legislativas por parte das indústrias de suco quanto ao uso de fungicidas do grupo dos benzimidazóis, o controle da MPC, assim como de outras doenças ocasionadas por fungos, está baseado principalmente no emprego de ingredientes ativos do grupo das estrobilurinas (LORENZI; VIANA; BOTEON, 2012). Dentre os possíveis problemas decorrentes da aplicação de fungicidas de um único grupo químico, inclui-se o risco de seleção de linhagens de fungos resistentes a esses ingredientes ativos (VINCELLI, 2012), podendo resultar em sérias limitações quanto ao controle eficiente de *P. citricarpa*, assim como de outros patógenos.

Dada a importância econômica da MPC, muitos resultados de pesquisas foram publicados nos últimos anos. Nesses estudos, a abordagem envolveu avaliações quanto à taxonomia do agente causal (WANG et al., 2012), diversidade genética (BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008; STRINGARI et al., 2009; WICKERT et al., 2014), filogenia (WICKERT et al., 2012), epidemiologia (SPÓSITO et al., 2011), comportamento de variedades e genótipos de laranjeiras (ROSSETTO et al., 2011) e diversos métodos de controle da doença (SCALOPPI et al., 2012; BELLOTTE et al., 2013). Entretanto, nenhum estudo avaliou a estrutura genética de populações de *P. citricarpa* ao longo dos anos. Em vista disso, o presente estudo teve por objetivo analisar o padrão genético e de sensibilidade a fungicidas de duas populações do patógeno, de duas variedades de laranjeiras, obtidas de uma única propriedade citrícola, em um intervalo de sete anos. Para tanto empregou-se o sequenciamento gênico, marcadores moleculares AFLP e ingredientes ativos do grupo das estrobilurinas e benzimidazóis nos testes de sensibilidade a fungicidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Phyllosticta*

O gênero *Phyllosticta* Pers. foi introduzido por Persoon (1818) com a espécie-tipo genérica *Phyllosticta convallariae*. Este gênero, que compreende um dos mais importantes grupos de fungos fitopatogênicos, é considerado taxonomicamente confuso (WIKKE et al., 2011). Inicialmente, muitos fungos com conídios unicelulares foram denominados como *Phoma* ou *Phyllosticta*, dependendo da localização da estrutura reprodutiva do fungo no hospedeiro. As estruturas reprodutivas encontradas na folha foram atribuídas a fungos do gênero *Phyllosticta*, enquanto aqueles que se reproduziam em qualquer outra parte do hospedeiro foram classificados como *Phoma* (VAN DER Aa, 1973). Uma reclassificação do gênero *Phyllosticta*, realizada por Van der Aa e Vanev (2002), mensurou 190 espécies pertencentes a este gênero. No entanto, posteriormente, Kirk et al. (2008) estimaram que *Phyllosticta* englobava de fato apenas 92 espécies.

O gênero *Phyllosticta* foi designado como pertencente à ordem Botryosphaerales, cuja família Botryosphaeriaceae englobaria fungos de ambos os gêneros, *Phyllosticta* e *Botryosphaeria* (SCHÖCH et al., 2006). Entretanto, estudos de reclassificação das famílias da ordem Botryosphaerales demonstraram que, pela análise filogenética, fungos de ambos os gêneros não pertenciam ao mesmo grupo e que, portanto, a realocação destes em famílias diferentes seria apropriada (LIU et al., 2012). Assim, tendo em vista que a família Phyllostictaceae, primeiramente proposta por Fries (1849), ainda se encontrava disponível para uso, Wikke et al. (2013b) sugeriram a realocação de *Phyllosticta* na família Phyllostictaceae, ordem Phyllostictales, conforme proposto anteriormente por Seaver (1922).

O teleomorfo de *Phyllosticta* corresponde ao gênero *Guignardia* Viala & Ravaz, representado por *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz. Assim como *Phyllosticta*, muitas espécies de *Guignardia* foram descritas de acordo com a sua associação com o hospedeiro e, muitas vezes, independentemente do seu anamorfo. Consequentemente, sua classificação é igualmente confusa e sua relação com os

hospedeiros e sintomas que ocasionam é frequentemente pouco compreendida (VAN DER Aa; VANEV, 2002; WIKEE et al., 2011).

Os nomes referentes aos estados assexual, *Phyllosticta*, e sexual, *Guignardia*, foram utilizados separadamente por muitas décadas, de acordo com o sistema de classificação utilizado pelos micologistas. No entanto, com o advento da biologia molecular para a identificação das espécies microbianas, o uso de ambas as nomenclaturas passou a ser redundante. Assim, de acordo com o *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants* (MCNEILL et al., 2012), passou a prevalecer o primeiro nome relatado para o gênero, *Phyllosticta* (WIKEE et al., 2013b).

Embora fungos do gênero *Phyllosticta* sejam conhecidos pelo seu potencial fitopatogênico, algumas espécies produzem metabólitos biotativos os quais possuem outras atribuições. As fitotoxinas phyllostina e phyllostoxina, por exemplo, produzidas por *P. cirsii*, podem ser utilizadas como micoherbicida (EVIDENTE et al., 2008; TUZI et al., 2010). Substâncias produzidas por uma espécie de *Phyllosticta* sp., isolada de *Cucumis sativus* L., podem ter aplicabilidade no controle de *Meloidogyne incognita* (YAN; SIKORA; ZHENG, 2011). E, curiosamente, algumas espécies fitopatogênicas do gênero, inclusive *P. citricarpa*, produzem uma substância denominada taxol, a qual é utilizada no tratamento do câncer (KUMARAN; MUTHUMARY; HUR, 2008; KUMARAN; MUTHUMARY; HUR, 2009).

Fungos do gênero *Phyllosticta* também podem apresentar comportamento saprofítico e endofítico, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais prevalentes (WIKEE et al., 2011; WIKEE et al., 2013b). A espécie endofítica mais frequentemente isolada é a *P. capitalensis* (*G. mangiferae*), a qual coexiste em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo os citros (WIKEE et al., 2013a; BAAYEN et al., 2012). Embora, na maioria das vezes, *P. capitalensis* não ocasione sintomas nas plantas, seu comportamento patogênico já foi comprovado quando da sua inoculação em frutos de goiabeiras (WICKERT et al., 2014). Porém, em sua maioria, espécies de *Phyllosticta* são potenciais agentes fitopatogênicos, podendo ocasionar lesões em folhas e frutos, as quais são caracteristicamente pequenas, circulares, com cerca de 1 a 2 mm de diâmetro (WIKEE et al., 2011). Doenças ocasionadas por espécies desse gênero foram relatadas em uma vasta gama de hospedeiros incluindo algumas culturas economicamente importantes, tais como citros (BAAYEN et al., 2002),

banana (WONG et al., 2012), uva e *cranberry* (ZHANG; ZHANG; CAI, 2013), goiaba (WICKERT et al., 2014), orquídeas (SHIVAS et al., 2013) e plantas ornamentais (LIU et al., 2009; WIKKE et al., 2012).

2.2. Mancha Preta dos citros

2.2.1. Etiologia, origem e distribuição geográfica da doença

A Mancha Preta dos Citros (MPC) é ocasionada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa* Kiely). A primeira descrição dos sintomas da MPC foi realizada por Benson (1895), em frutos sintomáticos originários de pomares de laranjeiras localizados em Nova Gales do Sul, Austrália. Benson publicou desenhos dos frutos sintomáticos, mas não estudou o agente causal. Em 1897, a MPC foi novamente relatada na Austrália, em pomares próximos à Sydney (COBB, 1897), onde o agente causal da doença foi denominado *Phoma citricarpa* McAlpine (McALPINE, 1899). Posteriormente, o seu teleomorfo foi encontrado e descrito como *Guignardia citricarpa* Kiely (KIELY, 1948) e seu anamorfo foi reclassificado, sendo atribuída a designação *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) van der Aa (VAN DER Aa, 1973).

Desde que a MPC foi relatada nos arredores de Pietermaritzburg, na África do Sul, em 1929 (DOIDGE, 1929), houve uma elevada dispersão geográfica da doença a qual encontra-se presente em vários países da Ásia, África, Oceania, América Central, América do Sul e América do Norte, onde em 2010, a doença foi relatada no estado da Flórida, Estados Unidos da América (SCHUBERT et al., 2012; EPPO, 2014). Não há relatos da doença nos países da União Europeia, os quais impõem restrições à importação de frutas cítricas de áreas consideradas não livres da doença, uma vez que nesses países a MPC é considerada doença quarentenária A1 (EFSA PLH PANEL, 2014).

A previsão da disseminação global da MPC é de que a doença não se desenvolva em localidades cuja temperatura atinja valores abaixo de 11°C (PAUL et al., 2005). No entanto, experimentos realizados nos Estados Unidos da América, mostraram que a 4°C ocorre o desenvolvimento de lesões da MPC nos frutos e

produção conidial, mesmo que a colônia do fungo não se desenvolva sob esta temperatura *in vitro*. Dessa forma, devido à versatilidade do fungo em condições ambientes, há riscos de disseminação da doença para áreas livres, caso as barreiras fitossanitárias sejam negligenciadas (ER et al., 2013).

No Brasil, os primeiros sintomas da MPC foram notados em 1938, em frutos de laranjeira ‘Seleta’ coletados em uma feira livre em Piracicaba, estado de São Paulo (AVERNA-SACCÁ, 1940). Todavia, na década de 1940, 75% dos pomares brasileiros de laranjas doces, enxertados em laranjeira azeda, foram erradicados devido à Tristeza dos Citros (MOREIRA, 1942). Assim, somente em 1980, a MPC foi novamente observada a campo, no estado do Rio de Janeiro, afetando plantas de pomares comerciais de mexerica do ‘Rio’ (*Citrus deliciosa*), nos municípios de São Gonçalo e Itaboraí, espalhando-se subsequentemente por toda a Baixada Fluminense (ROBBS; PIMENTEL; RIBEIRO, 1980; GOES, 1998). No estado de São Paulo a doença foi descrita apenas em 1992, ocorrendo em pomares localizados em uma importante região citrícola, compreendida pelos municípios de Conchal e Mogi-Guaçu (GOES; FEICHTENBERGER, 1993). Tais municípios, além de grandes produtores de frutos, também se destacavam por ser importantes produtores de mudas cítricas (NEVES et al., 2011). Assim, as condições ambientais do Brasil, juntamente com o emprego de mudas contaminadas, propiciaram a disseminação do patógeno para todos os demais municípios do estado de São Paulo, assim como para as demais regiões do sudeste, sul, e algumas outras do centro-oeste, nordeste e norte (NEVES et al., 2011; DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2015).

2.2.2. Epidemiologia

Durante a epidemia da MPC, o fungo produz estruturas reprodutivas de forma sexual e assexuadamente. O estado sexual, *Guignardia citricarpa*, é caracterizado por um pseudotécio erumpente, uninocular, globoso a piriforme, cuja forma é irregular, e com ostíolo central formado por deiscência quando maduro. Os ascos são fasciculados, bitunicados, clavados a elipsoides, contendo câmaras oculares bem desenvolvidas, cada uma delas abrigando oito ascósporos (VAN DER Aa, 1973; BAAYEN et al., 2002). Os ascósporos, por sua vez, são elipsoides a limoniformes,

ligeiramente alongados, asseptados, hialinos, frequentemente gutulados ou possuindo uma grande gútula central e medem de $15-17,5 \times 6,5-7,5 \mu\text{m}$. Alguns apresentam apêndices polares mucilaginosos. O estado espermático, presente no ciclo de vida das espécies de *Guignardia*, podem ser encontrados em meio de cultivo, cujos esporos são cilíndricos, em forma de haltere e apresentam gútulas em ambas as extremidades (VAN DER Aa, 1973; BAAYEN et al., 2002; WIKKE et al., 2011).

A produção e maturação do pseudotécio ocorrem exclusivamente nas folhas em decomposição no solo, sob as plantas (McONIE, 1965; KOTZÉ, 1981), e são favorecidos pela alternância dos períodos seco e chuvoso (KOTZÉ, 2000). Após a maturidade do pseudotécio e na presença de umidade, ocorre a liberação dos ascósporos, os quais são ejetados a uma altura de cerca de 1 cm, e então, dispersos pelas correntes de ar (KIELY, 1948). Ao entrarem em contato com a superfície de tecidos suscetíveis, e na presença de umidade e altas temperaturas, de 18 a 30°C, por pelo menos 15 horas, os ascósporos infectam o hospedeiro pela penetração direta no tecido e formam a massa miceliana na região subcuticular (Figura 1). Dessa forma, o fungo pode permanecer quiescente até o início do amadurecimento dos frutos ou nas folhas caídas no solo por até 36 meses sob condições favoráveis (McONIE, 1967; KOTZÉ, 2000).

Já o estágio assexual, *Phyllosticta*, ocorre em lesões dos tipos mancha dura e mancha sardenta nos frutos, assim como nas folhas em decomposição, anteriormente à formação do pseudotécio (KOTZÉ, 2000), ou em ramos secos (SPÓSITO et al., 2011). Nesse caso, a estrutura assexual é denominada picnídio, no interior do qual são produzidos os conídios. Os picnídios de *P. citricarpa* são globosos, subglobosos, achatados na parte superior e uninoculares em sua maioria. Os conídios são hialinos, unicelulares, ovóides, obovados ou elipsoides, cilíndricos, globosos ou subglobosos, possuem um único apêndice apical e medem de $9-13,5 \times 6-7,5 \mu\text{m}$ (VAN DER Aa, 1973; BAAYEN et al., 2002; WIKKE et al., 2011).

Quando o picnídio amadurece, os conídios que encontram-se cobertos com uma mucilagem emergem do ostíolo. Em contato com a água, a mucilagem é dissolvida e os conídios são dispersos pelos respingos das gotas de água da chuva até atingirem tecidos suscetíveis, onde surgem novas infecções (KOTZÉ, 2000). Os conídios não contam com mecanismos ativos de disseminação como os ascósporos,

sendo dispersos apenas a curtas distâncias. No entanto, gotas de água, aerossolizadas, em combinação com vento de aproximadamente 7 m/s, podem carrear esses esporos por até 8 m de distância (PERRYMAN; CLARK; WEST, 2014). Os processos de infecção e colonização dos conídios são similares àqueles dos ascósporos (Figura 1). Artificialmente, o período de incubação dos conídios inoculados em frutos de laranja com 20-30 mm de diâmetro podem variar de 55 a 225 dias (BALDASSARI et al., 2009).

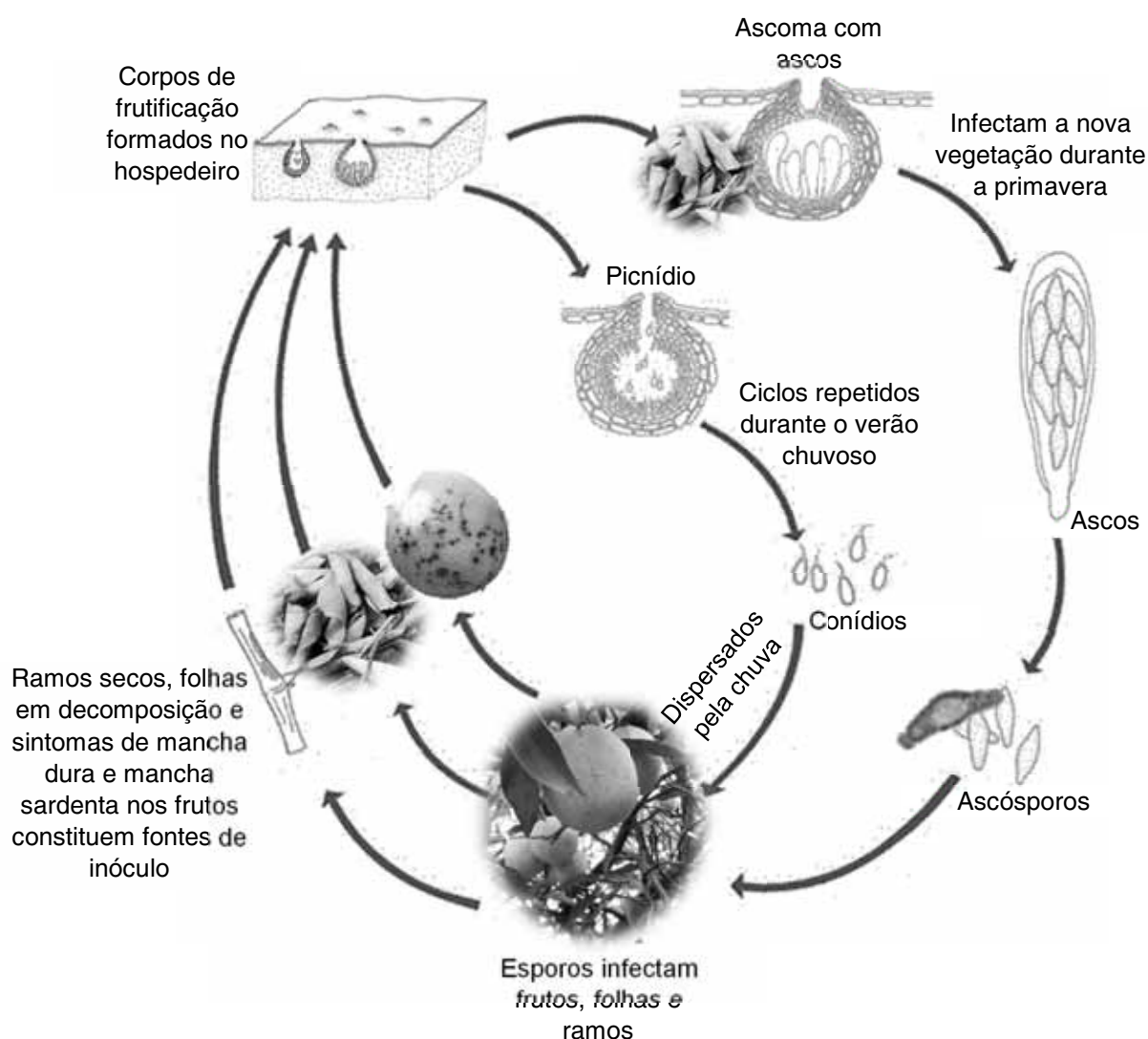


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de *Phyllosticta citricarpa* e seu teleomorfo. Modificado de Wikee et al. (2011).

2.2.3. Sintomatologia

A presença de sintomas da MPC leva à depreciação dos frutos destinados ao mercado *in natura* e, em níveis elevados, à queda prematura dos mesmos, com consequente redução da produtividade dos pomares (FAGAN; GOES, 2000; TIMMER, 1999; KOTZÉ, 2000; AGUILAR-VILDOSO et al., 2002).

Os sintomas da doença são excepcionalmente raros em folhas de laranjeiras e ramos e muito comuns nos frutos (KOTZÉ, 1981; KOTZÉ, 2000), sendo os principais sintomas caracterizados como: (i) mancha dura, sintoma mais comum e típico da MPC, caracterizado por lesões de coloração marrom-escuro e circulares. O centro da lesão é deprimido, de coloração marrom claro a cinza escuro, e contém picnídios caracterizados por pequenos pontos pretos. Tais lesões aparecem durante o amadurecimento do fruto; (ii) mancha sardenta, caracterizada por pequenas lesões avermelhadas, levemente deprimidas, que podem coalescer e formar uma grande lesão. Tais lesões apresentam produção de conídios no centro e aparecem no período de maturação dos frutos e após a colheita; e (iii) falsa melanose, caracterizada por pequenas manchas de 1 a 2 mm de diâmetro, pretas, salientes, distribuídas na casca dos frutos, algumas vezes, de forma a simular o escorrimento de gotas de água. Tais lesões aparecem quando os frutos ainda estão verdes e, não apresentam frutificação do fungo (HERBERT, 1989; KOTZÉ, 2000; SILVA-PINHATI et al., 2009). Outros sintomas da MPC também foram descritos, os quais podem ocorrer quando há maior severidade da doença, sendo estes a mancha virulenta (HERBERT, 1989) e a mancha trincada (GOES et al., 2000).

As espécies cítricas de importância econômica, incluindo todas as variedades de laranjeiras doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), são suscetíveis a *P. citricarpa* (ROSSETTO et al., 2011), com exceção da laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.) e da limeira ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Osbeck) (KOTZÉ, 1981), as quais, embora hospedem o fungo, não desenvolvem os sintomas da doença (WICKERT et al., 2009).

Altas temperaturas e intensa radiação solar são condições ambientais que favorecem a expressão dos sintomas (KOTZÉ, 1981; ANDRADE; PIMENTA; GOES, 2009). Assim, tendo em vista que as variedades de citros tardias e precoces possuem o mesmo nível de sensibilidade à MPC, as diferenças na severidade dos sintomas

entre variedades, por vezes observada, está relacionada ao processo de maturação dos frutos cítricos, dependente das condições ambientais (SPÓSITO; BASSANEZI; AMORIM, 2004).

2.2.4. Controle da doença

Ambas as formas de reprodução de *P. citricarpa* possuem papéis distintos e complementares, e sob condições ideais, ambos os propágulos produzidos podem contribuir para o desenvolvimento da epidemia. Tal comportamento epidemiológico permite que esse patógeno não apenas supere condições ambientais desfavoráveis e garanta a sua sobrevivência, mas também contribui para o aumento do nível de doença no campo (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). Estudos epidemiológicos da MPC na Austrália e Zimbábue mostraram que embora ambos os tipos de inóculo estejam presentes nos pomares de citros, os ascósporos de *P. citricarpa* seriam os maiores responsáveis pela epidemia (KIELY, 1948; WHITESIDE, 1967).

Assim, teoricamente, os sintomas da MPC deveriam ser controlados pelo impedimento da liberação dos ascósporos (SPOSITO et al., 2011). Tendo em vista tal suposição, uma das maneiras de mitigação da MPC adotada nas áreas argentinas exportadoras de limões foi a remoção das folhas caídas no solo anteriormente ao período de florescimento (FOGLIATA et al., 2000). De modo similar, no Brasil, técnicas suplementares ao controle da MPC com fungicidas foram sugeridas, tais como a aceleração da decomposição das folhas cítricas caídas no solo (BELLOTTE et al., 2009), o plantio de gramínea *coastcross* entre as linhas das plantas de citros (BELLOTTE et al., 2013) e o manejo do mato (SCALOPPI et al., 2012). No entanto, tais pesquisadores verificaram que o emprego de alternativas que maximizam a supressão de uma das fontes de inóculo, de forma individual, não resultam em níveis desejáveis de controle da doença.

Tais resultados devem-se ao fato dos conídios também constituírem importante fonte de inóculo da MPC no campo. Experimentos realizados em pomares de citros afetados pela doença mostraram que em áreas com ausência de folhas em decomposição, a intensidade e a taxa de progresso da MPC foram maiores quando os frutos sintomáticos foram deixados nos pomares como fonte de inóculo. No

entanto, experimentos realizados concomitantemente, demonstraram que em áreas livres da MPC, onde os frutos sintomáticos assim como os galhos secos foram eliminados do pomar, e as folhas em decomposição passaram a constituir a única fonte de inóculo, não foi observada a presença de frutos sintomáticos (SPÓSITO et al., 2011).

O controle dos sintomas da MPC, assim como da Podridão floral dos citros, ocasionada por *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* (LIMA et al., 2011), vem sendo realizada pela aplicação sequencial de fungicidas (SCALOPPI et al., 2012). Fungicidas sistêmicos do grupo dos benzimidazóis foram por mais de duas décadas empregados com sucesso no controle desses patógenos (GOES, 2002; GOES et al., 2008), os quais adquiriram resistência a esses ingredientes ativos (SCHUTTE et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007; CHUNG et al., 2010). No entanto, desde 2012, por questões legislativas, o uso dos benzimidazóis foi suspenso em áreas destinadas ao processamento industrial de frutos devido a resíduos identificados no suco de laranja (LORENZI; VIANA; BOTEON, 2012; FUNDECITRUS, 2012). Dessa forma, ingredientes ativos do grupo das estrobilurinas, empregados na cultura a partir do final da década de 90 (BARTLETT et al., 2002), constituem, até o momento, na principal alternativa de controle desses patógenos.

2.2.5. Resistência a fungicidas

Casos esporádicos de resistência a fungicidas passaram a ser relatados a partir de 1970, muitos anos após a introdução dos mesmos. Porém, tais relatos passaram a aumentar consideravelmente com o advento dos fungicidas sistêmicos, cujo período de eficiência dos produtos comerciais passou a ser efêmero. O início da resistência que aparenta ser repentino é decorrente de um processo que ocorre gradativamente em níveis indetectáveis (BRENT, 2007).

Há dois tipos de resistência, a qualitativa e a quantitativa. A resistência qualitativa é baseada em mutação gênica. Neste caso, mesmo sob altas concentrações de fungicida, os indivíduos resistentes não são afetados e sobrevivem ao tratamento. Já a resistência quantitativa é mediada pela manutenção do fungicida em baixa concentração dentro da célula. Os mecanismos que mantêm a concentração

de fungicida intracelular num limiar crítico incluem a síntese de transportadores de efluxo, que carregam as moléculas dos ingredientes ativos para fora do espaço celular, modificações da membrana plasmática que causam redução da permeabilidade do fungicida, ou a síntese de enzimas que degradam as moléculas dos ingredientes ativos (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008; VINCELLI, 2012).

Para os fungicidas do grupo dos benzimidazóis, a resistência relatada é do tipo qualitativa, decorrente de mutação no gene da β -tubulina. Os derivados deste grupo químico se ligam à β -tubulina e impedem o processo de transporte celular dependente do citoesqueleto, incluindo o movimento cromossômico na mitose e a divisão celular (DAVIDSE, 1986). Apenas dois anos após o início da comercialização do benomil, foi relatada resistência a este fungicida desenvolvida pelo oídio das cucurbitáceas, em Nova Iorque (SCHROEDER; PROVVIDENTI, 1969). Posteriormente, outros fungos desenvolveram resistência a este ingrediente ativo, tais como *C. gloeosporioides* (CHUNG et al., 2010) e, inclusive, *P. citricarpa*, cujo primeiro relato ocorreu na África do Sul (SCHUTTE et al., 2003).

No caso de fungicidas do grupo das estrobilurinas, a resistência dos fungos também foi relatada apenas dois anos após o início da sua comercialização (BARTELS, 2000). Ingredientes ativos desse grupo bloqueiam a transferência de elétrons entre o citocromo *b* e o citocromo *c1*, no sítio Qo1, interrompendo o fluxo de energia da célula do fungo pela falta de produção de ATP (BARTLETT et al., 2002). No entanto, mutações gênicas no citocromo *b* podem conferir resistência completa a tais ingredientes ativos quando ocorrem na posição G143A, ou parcial, nas posições F129L e G137R (SIEROTZKI et al., 2006; BRENT, 2007).

Há relatos de que a presença de um íntron imediatamente após o códon 143 do gene codificador do citocromo *b* está relacionada à ausência da mutação G143A (GRASSO et al., 2006), inclusive em estudos com *P. citricarpa* (HINCAPIE et al., 2014). Já nas espécies *P. capitalensis* e *P. citriasiana* não foi localizado o íntron nesta posição, estando essas espécies passíveis de adquirir resistência, segundo Stammler et al. (2013), embora nenhuma mutação tenha sido observada nessas espécies até o momento. Entretanto, considera-se inapropriado afirmar que uma espécie de fungo não esteja sujeita a adquirir resistência a fungicidas dos grupos das estrobilurinas apenas com base em tais resultados. Fernández-Ortuño et al. (2008) indicaram que o

mecanismo responsável pela resistência de *Podosphaera fusca* a fungicidas Qol não está relacionada a mutações típicas no gene do citocromo *b* e que a ausência da substituição G143A não pode ser explicada pela presença de um íntron localizado após o códon 143.

O segundo mecanismo de resistência a fungicidas Qol é mediado pela indução da respiração alternativa, sustentada pela enzima AOX² (WOOD; HOLLOMON, 2003). No entanto, para o caso de *P. citricarpa*, estudos nos quais foi aplicado o SHAM³, inibidor da enzima AOX, mostraram que em contato com fungicidas do grupo das estrobilurinas tal espécie não utiliza a via de respiração alternativa (HINCAPIE et al., 2014).

Transportadores de efluxo também constituem outra alternativa utilizada pelos fungos para driblar a ação dos fungicidas Qol. Essas proteínas ligadas à membrana conferem aos fungos proteção contra uma vasta gama de compostos tóxicos e xenobióticos por agirem na prevenção do seu acúmulo em concentrações tóxicas dentro das células (DEL SORBO; SCHOONBEEK; WAARD, 2000). As mais importantes bombas de efluxo envolvidas na proteção dos fungos contra fungicidas pertencem à família de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) e à *Major facilitator superfamily* (MFS).

Os transportadores ABC utilizam a energia da hidrólise de ATP para transportar substratos diferentes e estruturalmente bastante diversos contra um gradiente de concentração, através da membrana plasmática. Já os transportadores MFS são incapazes de hidrolisar ATP e utilizam a força motriz dos prótons para facilitar o transporte de substância tóxicas, assim como de açúcares, peptídios e íons (STERGIOPOULOS; ZWIERS; WAARD, 2003; DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008).

Transportadores ABC exportam substratos pertencentes a diferentes classes químicas para fora da célula, exercendo uma importante função de adaptação dos fungos a vários fungicidas (ABOU et al., 2013). Tal adaptação ocorre gradativamente e os mecanismos que permitem ao fungo sobreviver a doses elevadas de fungicidas

² Enzima Oxidase Alternativa

³ Ácido Salicilhidroxâmico

são ativados de maneira diferente em cada indivíduo, características estas atribuídas à resistência quantitativa (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008).

2.3. Caracterização molecular de espécies de *Phyllosticta* spp.

Análises filogenéticas têm aumentado significativamente o entendimento da relação entre as espécies de *Phyllosticta*. Nos últimos anos, a análise polifásica se tornou premissa para identificação de espécies de fungos e tem sido empregada para a identificação de espécies crípticas de *Phyllosticta* (WIKKE et al., 2011; WIKKE et al., 2013b). Para tanto, tem sido empregado a análise de sequências da região ITS rDNA e de genes conservados, sendo os mais comumente estudados o TEF1⁴, GPDH⁵, Actina e LSU⁶ (GLIENKE et al., 2011; ZHANG; SU; CAI, 2013; ZHOU et al., 2014; WANG et al., 2012).

Dentre as várias espécies de *Phyllosticta* recém-classificadas (WIKKE et al., 2013b; ZHOU et al., 2014), além de *P. citricarpa*, associada aos citros, foram relatadas outras quatro na China, Brasil e Tailândia, sendo estas *P. citriasiana* (WULANDARI et al., 2009), *P. citribraziliensis* (GLIENKE et al., 2011), *P. citrichinaensis* (WANG et al., 2012) e *P. citrimaxima* (WIKKE et al., 2013b). Tais descobertas ressaltam a importância da reavaliação das espécies de *Phyllosticta* associadas a sintomas da Mancha Preta dos Citros no Brasil.

O polimorfismo entre indivíduos geneticamente relacionados pode ser avaliado mediante o emprego de marcadores moleculares tais como RFLP⁷, RAPD⁸, AFLP⁹, Rep-PCR¹⁰ e SSR¹¹ (SABAT et al., 2013). Dentre estes destaca-se o AFLP (VOS et al., 1995), uma técnica altamente acurada que produz impressões digitais particulares do DNA, específicas para cada espécie, e não requer conhecimento prévio da sequência genômica (CHIAL, 2008).

⁴ Fator de elongação 1 α

⁵ Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

⁶ 28S Large Subunit rDNA

⁷ Restriction Fragment Length Polymorphism

⁸ Random Amplified Polymorphic DNA

⁹ Amplified Fragment Length Polymorphism

¹⁰ Repetitive-element Polymerase Chain Reaction

¹¹ Simple Sequence Repeats

Os marcadores AFLP, dentre outros, sobreviveram à era genômica e continuarão constituindo um método relevante mesmo para espécies com genoma conhecido devido às suas inúmeras funcionalidades. Tais marcadores podem ser utilizados para diferenciação entre espécies, identificação da variabilidade genética inter e intra populacional, mapeamento genético e isolamento de fragmentos do genoma com características particulares, cuja sequência é desconhecida (ZHANG; VAN PARIJS; XIAO, 2014). Além disso, tal técnica pode ser aplicada como auxílio à tecnologia NGS¹², que visa o sequenciamento genômico completo (VAN POECKE et al., 2013).

Para o caso de fungos fitopatogênicos, os marcadores AFLP têm sido empregados principalmente para elucidação da estrutura genética de populações. Souza et al. (2013) aplicaram tal metodologia para estudos de populações de *C. gloeosporioides*, cujos resultados permitiram conhecer a alta variabilidade genética entre os isolados, e inclusive, concluir que aqueles oriundos de mangueiras e citros podem apresentar perfis genéticos distintos. Já Oviedo et al. (2013), utilizaram marcadores AFLP para comparar a diversidade genética entre populações de *Alternaria alternata* e *A. infectoria*, produtores de micotoxinas em grãos de trigo. No que concerne a populações de *P. citricarpa*, estudos similares foram realizados com baixo número de indivíduos, não sendo possível avaliar a estrutura genética desta espécie (BAAYEN et al., 2002; BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008; STRINGARI et al., 2009; WICKERT et al., 2014).

¹² Next generation sequencing

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem e obtenção dos isolados de *Phyllosticta* spp.

O estudo compreendeu a avaliação de duas coleções de isolados de *Phyllosticta* spp., sendo uma obtida no ano de 2005 e outra em 2012. As amostragens foram realizadas na propriedade citrícola 'Fazenda Eleonor', localizada no município de Conchal, estado de São Paulo, cujas coordenadas geográficas são 22°17'53,75" Latitude Sul e 47°09'55,23" Longitude Oeste.

A primeira amostragem foi realizada em setembro de 2005, na qual foram coletados frutos com sintomas da MPC de laranjeiras 'Pera' e 'Valência', de 7 e 4 anos de idade, respectivamente. Foram realizados dois tipos de amostragens: (i) um fruto colhido de cada planta, de um total de 25 plantas amostradas, visando a obtenção de um isolado por planta e, (ii) 25 frutos colhidos dos quatro quadrantes de uma única planta, visando a obtenção de cerca de 25 isolados.

Após a lavagem dos frutos, tecidos com sintomas típicos da MPC foram excisados dos mesmos com auxílio de um bisturi, o qual também foi utilizado na eliminação de todo o tecido assintomático em torno da lesão. Fragmentos dos tecidos sintomáticos, com cerca de 2 mm, foram submetidos à desinfestação superficial em álcool etílico 70% por 1 minuto, e em solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 3 minutos. Após a desinfestação, os fragmentos foram enxaguados em água destilada esterilizada por 30 segundos e secos em papel absorvente esterilizado.

O cultivo do fungo, a partir dos fragmentos com sintomas da MPC, foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA¹³, em estufa bacteriológica a 28°C por cerca de oito dias. Todos os isolados que apresentaram padrão morfológico característico do gênero *Phyllosticta* foram repicados para tubos de ensaio contendo meio de cultivo BDA, nos quais, após o desenvolvimento das colônias, foi acrescentado óleo mineral esterilizado para paralisação do crescimento miceliano e preservação dos isolados.

¹³ Batata-Dextrose-Ágar

Uma nova coleta de frutos foi realizada na mesma propriedade citrícola, no município de Conchal/SP, em outubro de 2012. Tal coleta foi realizada seguindo-se o mesmo padrão de amostragem utilizado no ano de 2005, em plantas das variedades ‘Pera’ e ‘Valência’, com 14 e 11 anos de idade, respectivamente. Os procedimentos aplicados para o isolamento e preservação das culturas foram os mesmos descritos anteriormente. Concomitantemente à obtenção da nova coleção, procedeu-se a recuperação dos isolados armazenados desde 2005 (Figura 2).

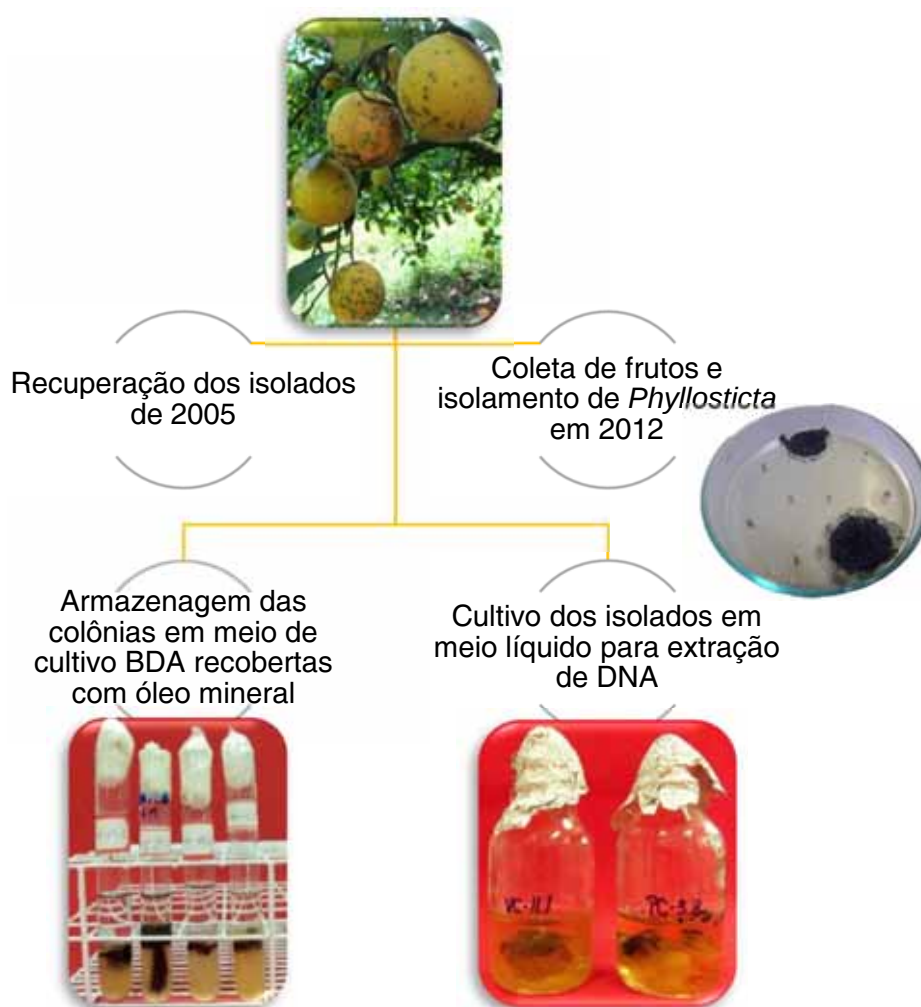


Figura 2. Etapas envolvidas na obtenção dos isolados de *Phyllosticta* spp. de frutos de laranjeiras ‘Pera’ e ‘Valência’ com sintomas da Mancha Preta dos Citros, coletados em Conchal/SP, em 2005 e 2012.

Também, foram acrescentados às análises isolados de *P. citricarpa* da Argentina e Uruguai, obtidos por volta do ano de 2005, e um isolado de *P. capitalensis*, obtido em 2001. Tais isolados foram gentilmente fornecidos pela pesquisadora Dra. Blanca I. Canteros, da Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista, INTA, Argentina, e pelo Prof. Dr. Lavern W. Timmer do Citrus Research and Education Center, University of Florida, Estados Unidos da América (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Phyllosticta citricarpa* e *Phyllosticta capitalensis* oriundos de diferentes países das Américas.

Isolado	Espécie do fungo	Hospedeiro	Tecido	Procedência
5Arg. BV-G05-2619*	<i>P. citricarpa</i>	<i>C. limon</i>	Folha	Bella Vista, Argentina
6Arg. BV.G05.2620*	<i>P. citricarpa</i>	<i>C. limon</i>	Fruto	Argentina
7Arg. BV.G06.2878*	<i>P. citricarpa</i>	<i>C. limon</i>	Fruto	Alta Gracia, Tucumán, Argentina
8Arg. BV.G06.2998*	<i>P. citricarpa</i>	<i>C. limon</i>	Fruto	Bella Vista, Argentina
102UY*	<i>P. citricarpa</i>	<i>C. limon</i>	Fruto	Montevideo, Uruguai
188UY*	<i>P. citricarpa</i>	<i>C. sinensis</i>	Fruto	Montevideo, Uruguai
Gm008 [#]	<i>P. capitalensis</i>	<i>C. maxima</i>	Fruto	Lake Alfred, Flórida Estados Unidos

* Isolados cedidos pela Dra. Blanca I. Canteros da Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista – INTA, Argentina;

[#] Isolado cedido pelo Dr. Lavern W. Timmer do *Citrus Research and Education Center* – University of Florida, EUA.

3.2. Extração de DNA

A fim se de obter quantidades suficientes de micélio, todos os isolados foram cultivados em meio de cultivo líquido BD em estufa bacteriológica a 28°C por oito dias. Após o período de incubação, o micélio foi peneirado, lavado com água esterilizada e seco em estufa a 50°C por 12 horas.

A maceração do micélio seco foi realizada com nitrogênio líquido até a formação de um pó, do qual 0,1 g foram transferidos para tubos eppendorf de 2,0 mL. A lise celular foi realizada acrescentando-se aos tubos 800 µL do tampão de extração

de DNA (160 mM de Tris-HCl pH 8.0, 60 mM de EDTA pH 8.0, 20 mM de NaCl e SDS 0,5%), os quais, após serem agitados, foram mantidos em ThermoMixer¹⁴ a 65°C por 50 minutos. Posteriormente, acrescentaram-se 400 µL de acetato de potássio 5M à solução, que após ser homogeneizada, foi mantida no gelo por 30 minutos. A seguir, procedeu-se a primeira centrifugação a 12.000 x *g*, a 10°C, por 10 minutos, a fim de possibilitar a precipitação das células lisadas e do complexo SDS-proteínas. O sobrenadante translúcido foi então transferido para tubos novos, aos quais foram acrescentados 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). A solução foi agitada vigorosamente em vortex e centrifugada sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após a transferência do sobrenadante para tubos novos, procedeu-se a repetição da etapa de lavagem com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). O sobrenadante obtido após a última centrifugação foi tratado com 20 mg de RNaseA a 37°C por 2 horas.

A precipitação do DNA foi realizada pelo acréscimo de 1000 µL de etanol absoluto gelado ao sobrenadante tratado, cuja solução homogeneizada foi mantida a -20°C por 12 horas. A seguir, procedeu-se a centrifugação dos tubos a 12.000 x *g*, a 10°C, por 20 minutos, visando a obtenção do *pellet* de DNA, o qual foi lavado com 1000 µL de álcool etílico 70%, sob nova centrifugação. Após a lavagem, o *pellet* de DNA foi seco em estufa a 50°C por 30 minutos, e suspenso em 60 µL de solução TE 10:1¹⁵.

A quantidade e qualidade do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop 1000¹⁶. A relação da absorbância entre os comprimentos de onda de 260 e 280 nm resulta no valor referente à qualidade do DNA, desejável entre 1,8 e 2,0 (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Já a integridade do DNA foi observada em gel de agarose 1% (p/v) contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR¹⁷.

¹⁴ Eppendorf

¹⁵ 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0

¹⁶ Thermo Scientific

¹⁷ BioRad

3.3. Sequenciamento da região ITS rDNA e dos genes GPDH e TEF1

A amplificação da região ITS rDNA foi realizada pela utilização do conjunto de primers ITS1/ITS4 (WHITE et al., 1990), para amplificação de um fragmento de 650 pb. Por sua vez, o fragmento do gene GPDH, de cerca de 750 pb, foi amplificado utilizando-se os primers GDF1/GDH2 (GUERBER et al., 2003; GLIENKE et al., 2011). Já para amplificação de um fragmento do gene TEF1, foi selecionada a combinação de primers EF1-728F/EF2 (CARBONE; KOHN, 1999; O'DONNELL et al., 1998), cujo produto de PCR é de 450 pb.

A reação de amplificação dos fragmentos foi composta por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 0,5 U de Platinum® Taq DNA polimerase¹⁸, 4 pmol dos primers específicos, 60 ng de DNA genômico e água pura esterilizada para 20 µL. A amplificação ocorreu em um termociclador Nexus¹⁹ programado para realizar um ciclo a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto e, para concluir, um ciclo de 10 minutos a 72°C. O produto de PCR amplificado foi então submetido à PCR de sequenciamento utilizando-se o kit BigDye® Terminator²⁰ segundo instruções do fabricante, cuja programação de termociclagem foi a mesma utilizada para amplificação inicial dos fragmentos, porém com 41 ciclos.

Os produtos da PCR de sequenciamento foram precipitados em 80 µL de isopropanol 75% (v/v) sob centrifugação a 2200 x *g* por 55 minutos a 14°C. Posteriormente, a fase líquida foi descartada e o precipitado foi lavado com 180 µL de etanol 70% (v/v) sob centrifugação a 1980 x *g* por 10 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante e procedeu-se uma centrifugação da placa de PCR invertida a 200 x *g* para possibilitar a rápida evaporação do etanol. A secagem foi concluída em estufa aquecida a 50°C por 10 minutos. Em seguida, o produto da PCR de sequenciamento foi submetido à desnaturação a 95°C por 5 minutos em formamida²¹.

¹⁸ Invitrogen

¹⁹ Eppendorf

²⁰ Applied Biosystems

²¹ Hi-Di™ Formamide (Life Technologies)

A leitura das sequências de nucleotídeos foi realizada em um sequenciador ABI3100²². A qualidade de bases dos eletroferogramas e as sequências consenso foram obtidas pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; GREEN, 1996; GORDON et al., 1998). O corte das extremidades das sequências consenso foi realizado admitindo-se bases com qualidade Phred igual ou superior a 20. As sequências de DNA qualificadas foram então comparadas a outras sequências depositadas no banco de dados GenBank²³ através da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

Para as análises filogenéticas, as sequências ITS, GPDH e TEF1 do estudo, aquelas de espécies-tipo de *Phyllosticta* spp. depositadas no banco de dados (WIKKE et al., 2013b) e as que compuseram o grupo externo, referentes às espécies *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryosphaeria sarmentorum* e *Diplodia mutila*, foram alinhadas separadamente por MUSCLE (EDGAR, 2004) utilizando-se o software MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013). O mesmo software foi empregado na determinação do modelo evolutivo mais adequado para ser aplicado às sequências do estudo nas análises bayesianas, segundo o critério de informação de Akaike (AIC) (POSADA; BUCKLEY, 2004). Dessa forma, as árvores filogenéticas foram geradas pelo software MrBayes 3.2.3 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) utilizando-se o modelo de substituição de Kimura-2 (KIMURA, 1980), distribuição Gamma e o algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), programado para executar as análises em quatro cadeias simultaneamente, sendo três quentes e uma fria. Foram realizadas quatro corridas independentes com 1.000.000 de gerações, sendo as cadeias amostradas a cada 200 gerações. Ao final das análises, cujo desvio padrão desejável é de 0,01, 25% das árvores geradas foram descartadas como *burn-in*. O filograma gerado pelo MrBayes foi editado graficamente pelo software TreeGraph 2.3.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

²² Applied Biosystems

²³ www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank

3.4. Marcadores moleculares AFLP

A técnica AFLP é composta por quatro etapas. Primeiramente, o DNA genômico íntegro é digerido, concomitantemente, por duas enzimas de restrição, sendo uma de corte raro, *EcoRI*²⁴, e outra de corte frequente, *MseI*²⁵. Aos fragmentos gerados são ligados adaptadores, cujas sequências são complementares às extremidades coesivas dos mesmos, por meio da enzima T4 Ligase. A seguir, a PCR de pré-amplificação permite a seleção dos fragmentos clivados em uma extremidade pela *EcoRI* e na outra pela *MseI*. Para tanto, adicionalmente à sequência dos adaptadores, os primers da PCR pré-seletiva possuem um nucleotídeo complementar na sua extremidade 3'. Na etapa de amplificação seletiva, por sua vez, podem ser acrescentados mais um a dois nucleotídeos à esta extremidade dos primers, resultando assim na seleção refinada dos fragmentos. Nesta última etapa os primers ligantes à extremidade *EcoRI* podem ser marcados com fluorescência.

Todas as etapas que compõem o AFLP devem ser realizadas com acurácia para que a eficiência das PCRs possibilite a correta detecção das bandas ao final do processo. Dessa forma, as reações foram otimizadas para o material genético em estudo (Figura 3), empregando-se apenas as programações de amplificação dos fragmentos conforme sugerido pelo fabricante do kit AFLP™ Microbial Fingerprint²⁶ (Tabela 2).

A procura por bandas diferenciais entre os isolados obtidos no ano de 2005 e 2012 foi realizada mediante o teste das 64 combinações de primers disponíveis no kit (Figura 4). Após a realização dos testes, foram selecionadas quatro combinações para compor as análises, *EcoRI*-AG/*MseI*-G, *EcoRI*-AC/*MseI*-C, *EcoRI*-AG/*MseI*-C e *EcoRI*-AA/*MseI*-CC. Os fragmentos foram separados por eletroforese em capilar em um sequenciador ABI3100²⁷, e mensurados segundo o padrão de tamanho molecular GeneScan ROX500²⁸ (Figura 5).

²⁴ *EcoRI* (5' - G↓AATTC - 3') e (3' - CTTAA↑G - 5')

²⁵ *MseI* (5' - T↓TAA - 3') e (5' - AAT↑T - 3')

²⁶ Applied Biosystems

²⁷ Applied Biosystems

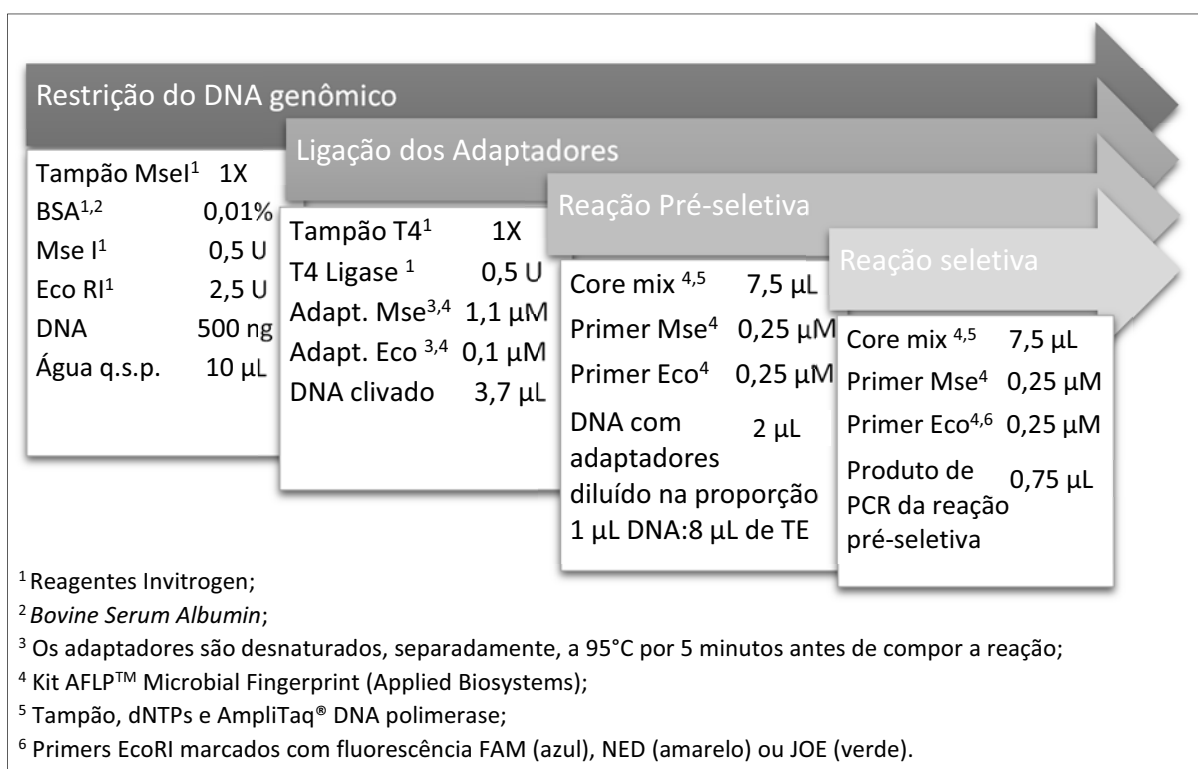


Figura 3. Composição das reações para o emprego dos marcadores moleculares AFLP em espécies de *Phyllosticta*.

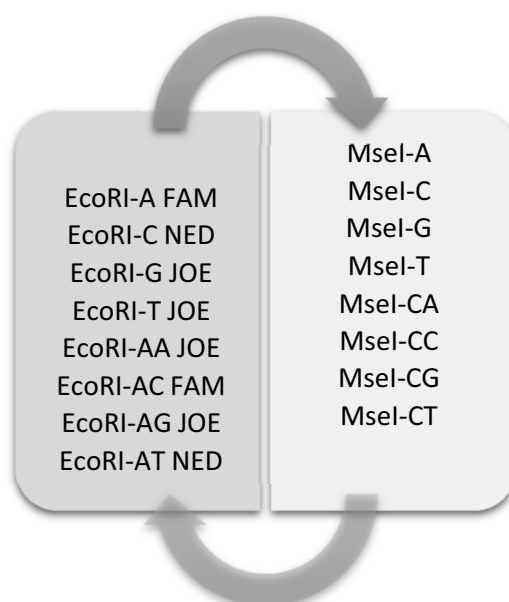
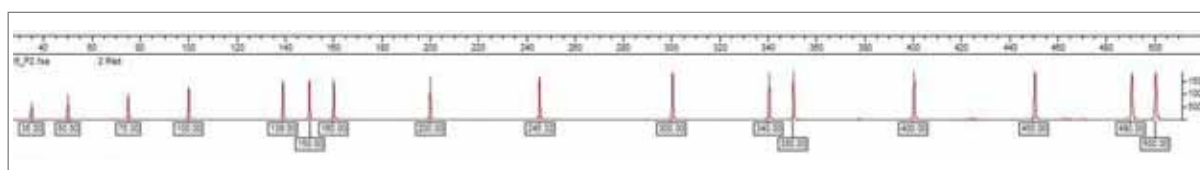


Figura 4. Opções de *primers* do kit AFLP™ Microbial Fingerprint para a reação seletiva, totalizado 64 combinações possíveis. Primers ligantes à extremidade EcoRI marcados com fluorescências FAM (azul), NED (amarelo) e JOE (verde).

Tabela 2. Programações de termociclagem para amplificação pré-seletiva e seletiva.

Passo único	Ciclos			Nº de ciclos
Reação Pré-Seletiva				
72°C por 2 min.	-			1
—	94°C - 20 sec.	56°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	20
Reação Seletiva				
94 °C por 2 min.	94°C - 20 sec.	66°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
—	94°C - 20 sec.	65°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
—	94°C - 20 sec.	64°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
—	94°C - 20 sec.	63°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
—	94°C - 20 sec.	62°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
—	94°C - 20 sec.	61°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
—	94°C - 20 sec.	60°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
—	94°C - 20 sec.	59°C - 30 sec.	72°C - 2 min	1
—	94°C - 20 sec.	58°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
—	94°C - 20 sec.	57°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	1
—	94°C - 20 sec.	56°C - 30 sec.	72°C - 2 min.	20
60 °C por 30 min.	—			1

**Figura 5.** Padrão de tamanho molecular GeneScan ROX500, composto pelos fragmentos de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 245, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500 pb.

Os eletroferogramas obtidos pela leitura dos fragmentos por eletroforese em capilar foram transformados em projetos de análises pelo software GeneScan 3.7²⁸. Tais projetos foram analisados utilizando-se o software Genotyper 3.7²⁸, no qual os picos correspondentes aos fragmentos foram selecionados manualmente, a fim de compor a matriz binária com acurácia, sendo a presença de um fragmento de mesmo tamanho molecular representada pelo número 1, e a ausência pelo zero.

A matriz binária composta pela análise dos quatro conjuntos de primers empregados foi convertida em matriz de distância (NEI; LI, 1979) pelo software PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 2002). O mesmo software foi utilizado na obtenção do dendrograma, gerado pelo método de agrupamento neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987), com bootstrap de 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985). O dendrograma gerado pelo PAUP foi então editado graficamente pelo software TreeGraph 2.3.0 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

A matriz binária também foi utilizada para a realização da análise AMOVA²⁹ e obtenção dos valores de F_{ST} ³⁰ (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) pelo software Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Os valores de F_{ST} , por sua vez, foram utilizados no cálculo do fluxo gênico, cujo número de migrantes por geração, N_m , é igual a $(1-F_{ST})/4F_{ST}$ (COCKERHAM; WEIR, 1993). Se $N_m < 1$, a população local tende a uma diferenciação, porém, se $N_m \geq 1$, então há uma pequena diferenciação entre populações, e a migração nesse caso, é mais importante do que a deriva genética (WRIGHT, 1951).

3.5. Isolamento e clonagem de fragmentos de DNA obtidos pelo AFLP

Após a identificação de bandas diferenciais entre as populações de *Phyllosticta* de 2005 e 2012, as amostras selecionadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% e coradas com prata segundo metodologia descrita por Creste, Tulmann-Neto e Figueira (2001). Os fragmentos de interesse foram excisados do gel de poliacrilamida, colocados em eppendorfs contendo 50 μ L de TE 10:1 e mantidos em solução por 12

²⁸ Applied Biosystems

²⁹ *Analysis of Molecular Variance*

³⁰ Índice de fixação (F_{ST}) = Variação entre populações/(Variação entre populações + variação dentro das populações)

horas a 4°C. Após esse período, as amostras foram submetidas a um choque térmico de 60°C por 2 horas, seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento, visando a recuperação do fragmento de DNA do gel.

A seguir, realizou-se a reamplificação das amostras utilizando-se o par de primers AFLP da reação seletiva (EcoRI-AG/MseI-G, EcoRI-AC/MseI-C, EcoRI-AG/MseI-C ou EcoRI-AA/MseI-CC) correspondente à origem de cada fragmento selecionado. A reação foi composta de Tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 1,25 U de Platinum® Taq DNA polimerase³¹, 20 mM de cada primer, 15 µL da solução de TE 10:1 contendo o fragmento recuperado e água milli-Q para 25 µL. O programa de termociclagem utilizado foi o mesmo aplicado para a reação seletiva do AFLP (Tabela 2). O produto de amplificação desta reação foi submetido a uma PCR-nested³², utilizando-se a mesma metodologia descrita anteriormente, a fim de possibilitar a visualização dos fragmentos em gel de agarose.

A partir da eletroforese em gel de agarose, os fragmentos de interesse contidos nos produtos de PCR reamplificados, foram novamente purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*³³, segundo instruções do fabricante. Após a purificação, mensurou-se a quantidade e qualidade do fragmento de DNA purificado em espectrofotômetro Nanodrop1000³⁴.

A clonagem dos fragmentos de DNA purificados foi então realizada no vetor pJET1.2, do *CloneJET PCR Cloning Kit*³⁵, segundo instruções do fabricante. Em seguida, os plasmídios recombinantes foram inseridos em células competentes de *Escherichia coli*, cepa DH10B, por choque térmico a 42°C por 90 segundos. As células transformadas foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultivo LB³⁵ Ágar com ampicilina (100 µg/mL), a qual impede o desenvolvimento de colônias não transformadas. Após 18 horas de incubação a 37°C, as colônias desenvolvidas foram coletadas e transferidas para tubos eppendorf de 2,0 mL contendo meio de cultivo líquido LB. As células foram multiplicadas sob agitação a 37°C por cerca de 6 horas

³¹ Invitrogen

³² Reação de PCR na qual se utiliza um produto de PCR como amostra de DNA

³³ Promega

³⁴ Thermo Scientific

³⁵ Triptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 85 mM

e, então submetidas a extração plasmidial por lise alcalina, segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001).

O sequenciamento dos fragmentos clonados foi realizado utilizando-se o conjunto de primers do vetor pJET1.2³⁶. As reações de sequenciamento, análises de qualidade das bases e obtenção das sequências consenso foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.3 do presente trabalho.

As sequências consenso qualificadas foram então comparadas com sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados GenBank³⁷, por meio da ferramenta Blastx, e no banco de dados Uniprot³⁸, pela ferramenta Blast (ALTSCHUL et al., 1990).

3.6. Testes de sensibilidade a fungicidas

Para o teste de sensibilidade a fungicidas, os isolados de *Phyllosticta* foram selecionados de acordo com a sua origem e posição no dendrograma do AFLP. Foram avaliados três ingredientes ativos dentre os mais aplicados nos pomares de citros nos últimos anos: (i) piraclostrobina e trifloxistrobina, do grupo das estrobilurinas e, (ii) carbendazim, do grupo dos benzimidazóis (Tabela 3).

Tabela 3. Ingredientes ativos testados no controle *in vitro* de espécies de *Phyllosticta*.

Grupo químico	Ingrediente ativo	Nome	Marca	Lote	Dose recomendada (i.a.)*
Estrobilurina	Piraclostrobina	Comet®	Basf	1491107500	3,75g/100L ou 37,5 µg/mL
Estrobilurina	Trifloxistrobina	Flint® 500WG	Bayer	008126000	5g/100L ou 50 µg/mL
Benzimidazol	Carbendazim	Carbendazim	Nortox	1131325920	25g/100L ou 250 µg/mL

* Dose recomendada dos ingredientes ativos dos fungicidas Comet® e Flint® para o controle de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros, e do fungicida Carbendazim Nortox® para o controle de *Elsinoe fawcettii*, agente causal da verrugose dos citros.

³⁶ CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific)

³⁷ NCBI - National Center for Biotechnology Information

³⁸ <http://www.uniprot.org/>

Ensaio para a seleção da escala logarítmica de concentração dos ingredientes ativos precederam os testes. Para tanto foram testadas as escalas de concentração: (i) 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 µg i.a./mL e, (ii) 0,005; 0,05; 0,5; 5,0; 50,0; 500,0 µg i.a./mL. Soluções/suspensões estoques de 100 e 1 mg i.a./mL, preparadas em água milli-RO esterilizada, foram utilizadas para a preparação do meio de cultivo BDA fundente, a 55°C, nas concentrações desejadas de ingredientes ativos. Os ensaios foram realizados em placas de Petri de 90x15 mm, no centro das quais, foi depositado um disco de colônia dos isolados, de 6 mm de diâmetro. As placas foram incubadas em estufas para BOD a 28°C ± 1°C, no escuro, por 14 dias.

Com base nos resultados dos ensaios, foram selecionadas as escalas de concentração 0,05; 0,5; 5,0; 50,0 e 500,0 µg i.a./mL para piraclostrobina e trifloxistrobina, e 0,005; 0,05 e 0,5 µg i.a./mL para o carbendazim. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada unidade amostral constituída por uma placa de Petri. Para validação e maior confiabilidade dos dados obtidos, alguns isolados foram selecionados aleatoriamente para a repetição dos experimentos.

As avaliações consistiram na determinação do diâmetro médio das colônias, medido em dois sentidos perpendiculares entre si, determinados após 7 e 14 dias de incubação. Os valores de PIC³⁹ foram utilizados na determinação do EC50⁴⁰ e nas análises de variância, realizadas pelo teste de Scott e Knott (1974) por meio do programa computacional AgroEstat, Versão 1.1.0.711 (BARBOSA; MALDONADO, 2014).

³⁹ Porcentagem de Inibição do Crescimento Miceliano

$$PIC = \frac{(\text{Diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento})}{\text{diâmetro da testemunha}} \cdot 100$$

⁴⁰ Concentração de fungicida necessária para inibir 50% do crescimento miceliano

4. RESULTADOS

4.1. Amostragem e obtenção dos isolados de *Phyllosticta* spp.

A coleção de isolados de *Phyllosticta* spp., obtida em 2005, é composta, em sua maioria, por isolados provenientes de lesões cujos sintomas são dos tipos falsa melanose, mancha sardenta e, em minoria, mancha dura. Já na coleção obtida em 2012, a maioria dos isolados provieram de tecidos cujas lesões eram prevalentemente mancha dura e mancha sardenta. Os isolados foram nomeados de acordo com sua origem, da seguinte forma: (i) variedade: 'Valência' (V) ou 'Pera' (P); (ii) tipo de amostragem: 1 fruto/planta (VC e PC) ou 25 frutos por planta (IV e IP); (iii) idade da coleção: acréscimo da letra 'N' ao final do código referente à coleção de 2012; (iv) número do isolado; e (v) tipo de sintoma: último número do código, localizado após um ponto, sendo o '1' referente à mancha dura, '2' à falsa melanose e '3' à mancha sardenta (Tabela 4 e Figura 6).

Embora o isolamento tenha sido realizado apenas de tecidos contendo lesões com sintomas característicos da MPC, a coleção de 2012 é também contemplada por seis isolados com colônias características da espécie *P. capitalensis*, endofítica para os citros (BAAYEN et al., 2002; WICKERT et al., 2014) (Figura 6). Tais isolados foram codificados seguindo-se os mesmos critérios adotados para *P. citricarpa* (Tabela 4).

Junto aos isolados da coleção de 2005, foi acrescido o NC10.1, da espécie *P. citricarpa*, oriundo de fruto de laranjeira 'Natal', obtido na mesma propriedade citrícola onde foram realizadas as demais amostragens. Este isolado, em estudos anteriores, apresentou características morfológicas distintas dos demais, não produzindo halo amarelo em meio de cultivo aveia-ágar, característico para a espécie *P. citricarpa* (BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2008; WANG et al., 2012). Também, visando estabelecer relação entre amostras brasileiras e de outros países, foram acrescentados às análises isolados de *P. citricarpa* da Argentina e Uruguai, obtidos no ano de 2005, e um isolado de *P. capitalensis*, dos Estados Unidos da América, obtido em 2001 (vide Tabela 1).

Tabela 4. Número de isolados com colônias características de *Phyllosticta citricarpa* recuperados da coleção de 2005 e obtidos em 2012, segundo a variedade de laranja, amostragem e tipos de sintomas da Mancha Preta dos Citros dos quais os mesmos foram obtidos.

Ano	Variedade de laranja	Amostragem	Código	N° de isolados/ Sintomas*			N° total de isolados
				1	2	3	
2005	‘Valência’	1 fruto/planta	VC	3	5	12	20
		25 frutos/planta	IV	-	8	14	22
2005	‘Pera’	1 fruto/planta	PC	3	13	7	23
		25 frutos/planta	IP	4	10	-	14
Total de isolados recuperados da coleção de 2005							79
2012	‘Valência’	1 fruto/planta	VCN	21	-	8	29
		25 frutos/planta	IVN	16	-	8	24
2012	‘Pera’	1 fruto/planta	PCN	23	-	10	33
		25 frutos/planta	IPN	22	-	7	29
Total de isolados obtidos em 2012							115

* Código dos sintomas: 1 - Mancha Dura; 2 - Falsa Melanose; 3 - Mancha Sardenta

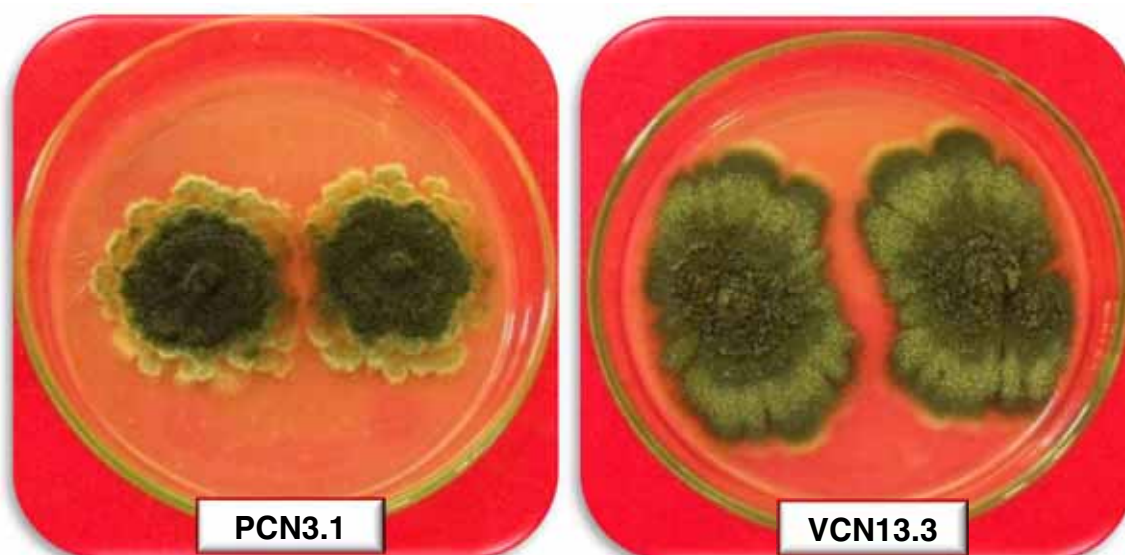


Figura 6. Isolados cujas colônias apresentaram morfologia característica das espécies *Phyllosticta citricarpa* (PCN3.1) e *Phyllosticta capitalensis* (VCN13.3).

4.2. Sequenciamento da região ITS rDNA e dos genes GPDH e TEF1

As sequências qualificadas das regiões ITS, GPDH e TEF1 foram compostas, em média, respectivamente, por 520, 580 e 360 pb. Todas as sequências obtidas apresentaram de 99 a 100% de similaridade com sequências de *Phyllosticta* do banco de dados, cujo *e-value*⁴¹ apresentou valor igual a zero. Dessa forma, os 80 isolados pertencentes à coleção de 2005, incluindo o NC10.1, foram identificados como *P. citricarpa*. Por outro lado, dentre os 115 isolados da coleção de 2012, seis apresentaram similaridade com sequências de *P. capitalensis*, sendo estes VCN13.3, VCN25.1, VCN29.1, PCN6.3, IVN14.1 e IPN20.1, e os demais com sequências de *P. citricarpa*. Quanto aos isolados estrangeiros, confirmou-se a identificação realizada previamente em seus países de origem, sendo o isolado Gm008 pertencente a *P. capitalensis* e os demais a *P. citricarpa*.

A partir do alinhamento individual das sequências ITS, GPDH e TEF1 foram identificados, respectivamente: (i) 41 SNPs⁴² em sequências de *P. citricarpa* e 14 em *P. capitalensis*; (ii) 14 SNPs em *P. citricarpa* e 2 em *P. capitalensis*; e (iii) 3 SNPs em *P. citricarpa* e 7 em *P. capitalensis*. De fato, regiões intergênicas, não codificadoras, acumulam maior taxa de mutações em detrimento de sequências codificadoras de genes conservados.

Verificou-se que maior quantidade de isolados de *P. citricarpa* da coleção de 2012 acumulou sítios variáveis em suas sequências em relação àqueles da coleção de 2005. Ainda referente à coleção de 2012, notou-se maior quantidade de haplótipos nas populações de 'Valência', em especial na VCN, em relação às de 'Pera'. Guardadas as devidas proporções, este fato foi observado tanto em sequências ITS quanto em GPDH (Tabela 5).

⁴¹ *E-value* é o valor do ruído referente à procura aleatória por sequências homólogas do banco de dados à sequência alvo. Admite-se que quanto mais próximo de zero este valor se encontra, maior é a significância do alinhamento entre as sequências.

⁴² *Single Nucleotide Polymorphism*

Tabela 5. Número e porcentagem de isolados de *Phyllosticta citricarpa* de cada população em cujas sequências foram identificados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Coleção	Código	Número de haplótipos					
		ITS		GPDH		TEF1	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
2005	VC	4	20%	0	0%	0	0%
	IV	2	9%	0	0%	1	4,5%
	PC	5	21,7%	1	4,3%	0	0%
	IP	1	7,1%	0	0%	0	0%
2012	VCN	14	53,8%	5	19,2%	0	0%
	IVN	4	17,4%	2	8,7%	0	0%
	PCN	6	18,7%	2	6,2%	2	6,2%
	IPN	2	7,1%	2	7,1%	0	0%

As três árvores filogenéticas, resultantes do alinhamento das sequências ITS, GPDH e TEF1 separadamente, apresentaram igual agrupamento entre os isolados. Dessa forma, optou-se pela representação do filograma obtido pelas sequências ITS, com valores de confiabilidade dos ramos referentes às três árvores. Para tanto, foram selecionadas 39 sequências de haplótipos identificados nas populações de *P. citricarpa*. As demais sequências de *P. capitalensis*, dos isolados estrangeiros e do banco de dados também foram incluídas nas análises (Figura 7).

Mediante análise do filograma, observou-se que os isolados foram agrupados de acordo com a espécie a qual pertencem. Dentre os isolados de *P. citricarpa*, o VCN21.1, o NC10.1 e o 8Arg. destacaram-se em relação aos demais. O VCN21.1 possui algumas variações gênicas diferentes dos demais isolados. O NC10.1, por sua vez, se diferenciou dos demais isolados de *P. citricarpa* em estudos anteriores por não apresentar a formação do halo amarelo, característico da espécie, em meio de cultivo aveia-ágar. Já o 8 Arg., assim como os isolados 5Arg. e 6Arg., que formaram um subgrupo dentro do agrupamento da espécie *P. citricarpa*, são oriundos da Argentina, e portanto, podem conter variações gênicas diferentes das encontradas nos isolados brasileiros. Quanto ao agrupamento da espécie *P. capitalensis*, dentre os seis isolados brasileiros, notou-se a formação de dois subgrupos, IVN14.1 e PCN6.3, e, VCN25.1 e VCN29.1, o que demonstrou maior variabilidade genética entre isolados desta espécie em relação aos de *P. citricarpa*.

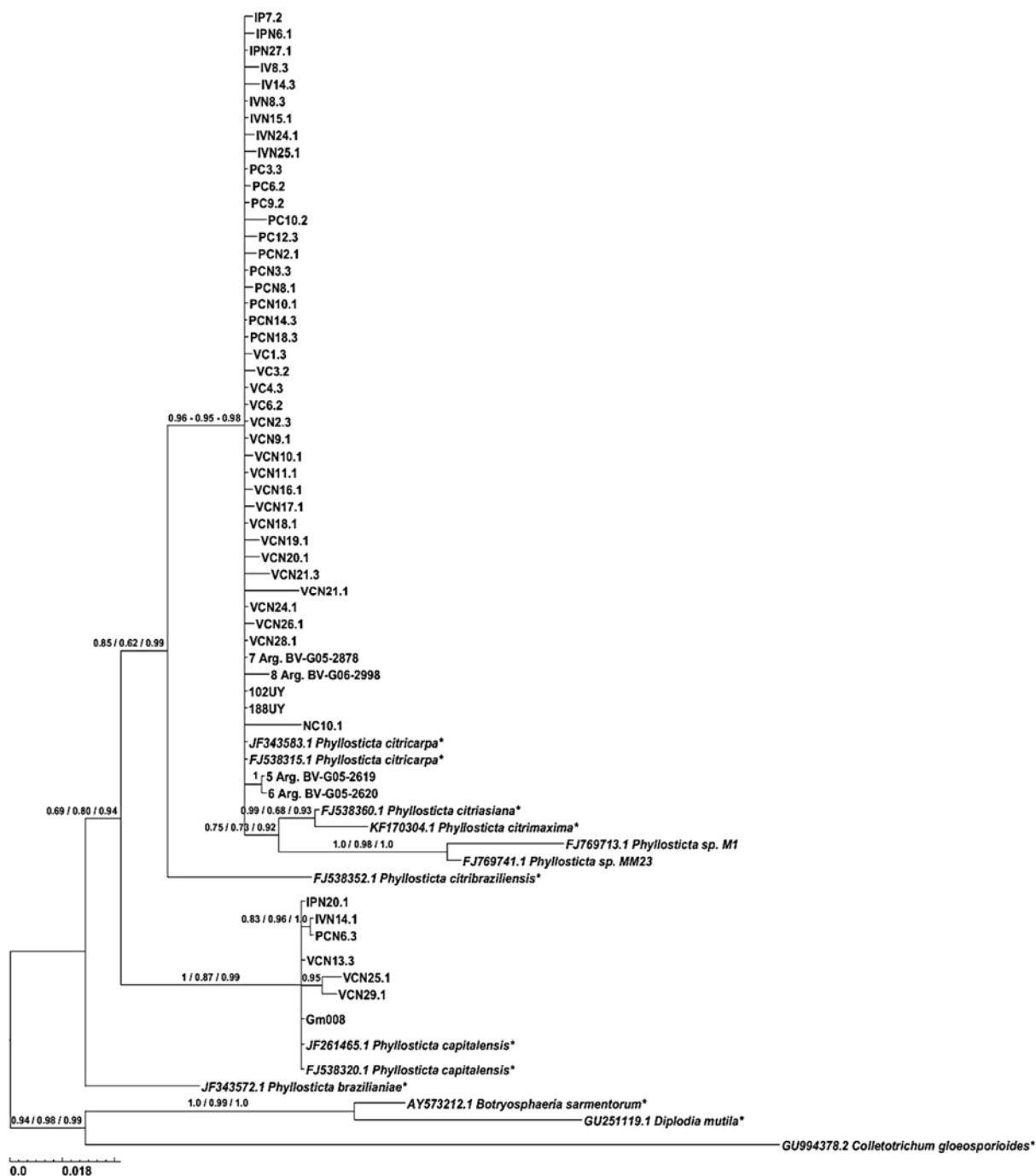


Figura 7. Análise bayesiana de sequências ITS de isolados de *Phyllosticta citricarpa*, *P. capitalensis*, de espécies-tipo de *Phyllosticta* spp. do banco de dados GenBank (marcadas com *), assim como de sequências que compõem o grupo externo. Os três valores de confiabilidade dos ramos são referentes àqueles obtidos nos agrupamentos com sequências ITS, GPDH e TEF1, respectivamente.

4.3. Marcadores moleculares AFLP

Mediante o emprego dos marcadores AFLP, constatou-se que os isolados de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* apresentaram perfis genéticos distintos entre si, e portanto, foram agrupados separadamente. Em todos os Grupos do dendrograma observou-se que isolados com antecedentes em comum como épocas de coleta, tipos de amostragens, variedades de laranjeiras e tipos de sintomas dos quais provieram, por vezes pertenciam aos mesmos subgrupos, porém, não como regra (Figuras 8, 9, 10 e 11). Também, observou-se que não houve relação entre genótipos específicos do fungo e os tipos de sintomas da MPC os quais ocasionaram.

Levando-se em consideração tanto a variável tempo de coleta quanto as variedades de laranjeiras dos quais os isolados provieram, notou-se uma nítida distinção entre os isolados de 'Valência' de 2005, que foram agrupados principalmente no Grupo 1 do dendrograma, e os demais isolados advindos da mesma propriedade citrícola, os quais foram, em sua maioria, agrupados no Grupo 2 (Figura 8).

Dessa forma, observou-se que o Grupo 1 foi formado essencialmente pelos isolados das populações IV e VC, de 2005, pelo isolado NC10.1, também obtido em 2005, e pelos da Argentina e Uruguai, sendo este um indicativo de que tal genótipo não é específico do micro-habitat amostrado. Entretanto, foram notadas algumas exceções neste Grupo, como a presença de três isolados de 'Valência' da coleção de 2012 e cinco isolados de 'Pera' de 2005 (Figura 8 e 9).

Os isolados das demais populações de 'Valência' de 2012 (VCN e IVN) e de 'Pera', 2005 (PC e IP) e 2012 (PCN e IPN), foram agrupados segundo as suas relações genéticas nos Grupos 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 do dendrograma (Figuras 10 e 11). Novamente foram observadas exceções. Cinco isolados de 'Valência' da população IV, representando 11% da coleção de 'Valência' de 2005, foram encontrados entre os isolados dos Grupos 2.1 e 2.2 (Figuras 8, 10 e 11). Destaca-se também que o isolado VCN21.1 não foi agrupado junto aos demais, embora esteja inserido no grupo específico da espécie *P. citricarpa*. Tal resultado corrobora os obtidos com o sequenciamento gênico.

Em termos gerais, as médias dos valores das distâncias genéticas (DG) entre os isolados que compuseram uma mesma população, VCN, IVN, PCN, IPN, VC, IV,

PC e IP, foram semelhantes entre si, em torno de 0,035. Os maiores valores de DG verificados entre isolados das populações de *P. citricarpa* foram entre aqueles pertencentes às populações de ‘Valência’ de 2005 e de ‘Pera’ 2012 (0,06), e entre os de ‘Valência’ de 2005 e de 2012 (0,056). Já entre os isolados de *P. capitalensis* a média da DG foi de 0,12, sendo este um indicativo de maior diversidade genética entre isolados desta espécie, em relação aos de *P. citricarpa*.

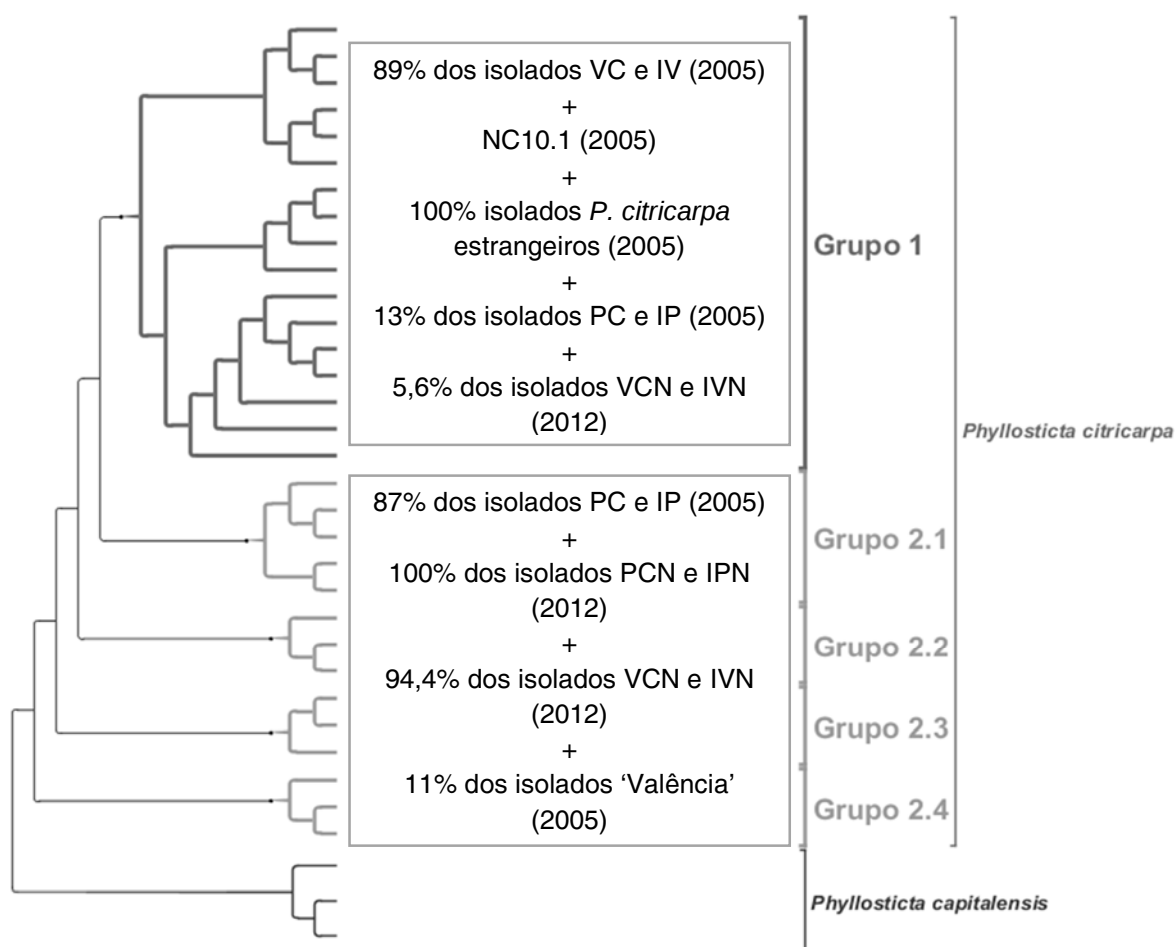


Figura 8. Agrupamento neighbor-joining resultante da análise com marcadores AFLP de isolados de *Phyllosticta citricarpa* e *Phyllosticta capitalensis*. Súmula da composição dos Grupos 1 e 2 do dendrograma.

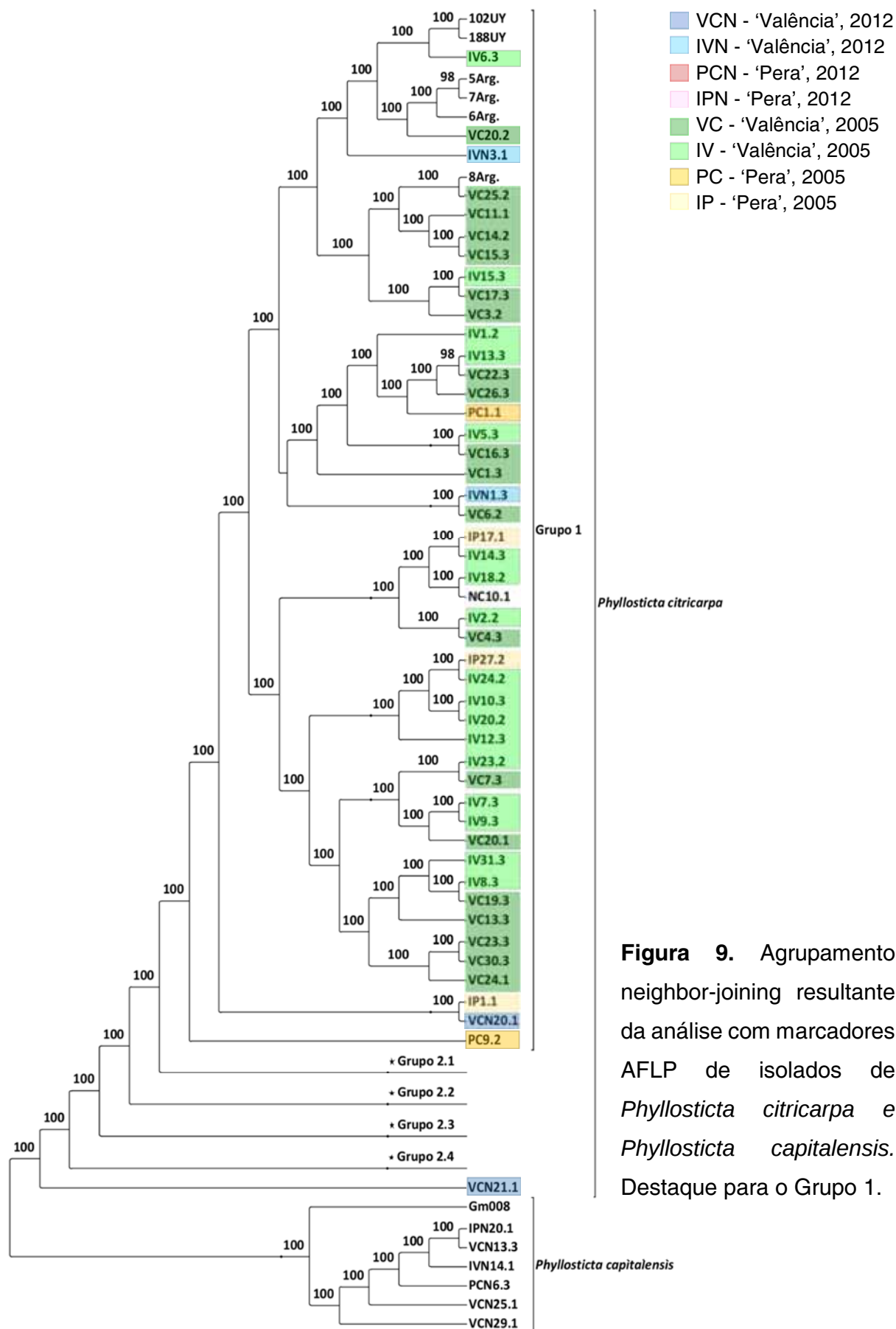


Figura 9. Agrupamento neighbor-joining resultante da análise com marcadores AFLP de isolados de *Phyllosticta citricarpa* e *Phyllosticta capitalensis*. Destaque para o Grupo 1.

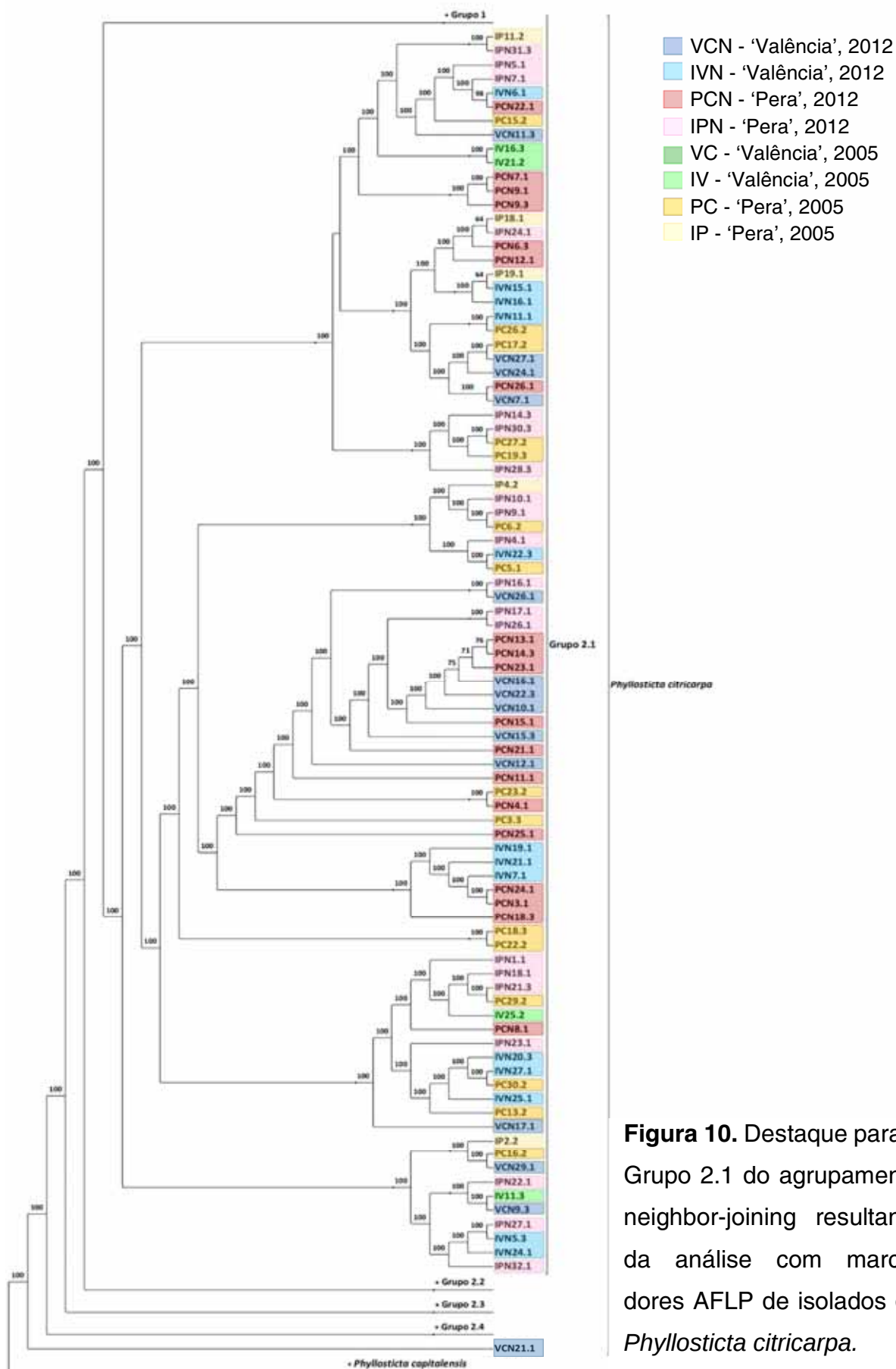
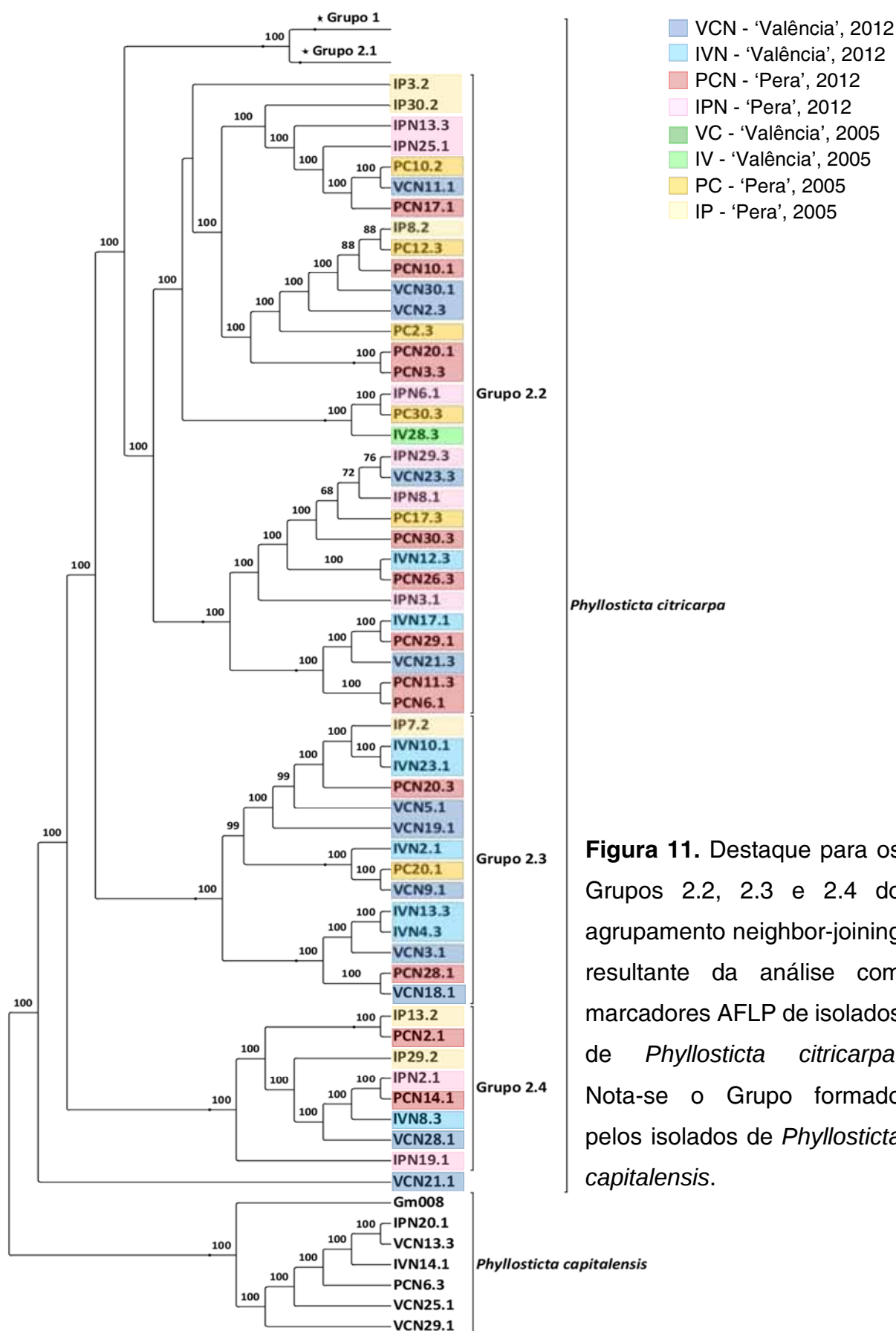


Figura 10. Destaque para o Grupo 2.1 do agrupamento neighbor-joining resultante da análise com marcadores AFLP de isolados de *Phyllosticta citricarpa*.



Por meio dos marcadores AFLP foram identificados 313 loci, dos quais mostraram-se polimórficos: (i) 57 loci entre as populações PC e IP; (ii) 50 loci entre as populações PCN e IPN; (iii) 49 loci entre as populações VC e IV; (iv) 82 loci entre as populações VCN e IVN; e (v) 70 loci entre os seis isolados de *P. capitalensis* brasileiros. Novamente, ressalta-se que o maior número de loci polimórficos encontram-se entre as populações de 'Valência' de 2012, o que corrobora os resultados do número de haplótipos obtidos pelo sequenciamento. Um breve comparativo com o número de loci polimórficos encontrados para *C. gloeosporioides* (de 745, dentre 920 loci), utilizando-se o mesmo método empregado no presente estudo (SOUZA et al., 2013), é demonstrativo do baixo polimorfismo entre indivíduos da espécie *P. citricarpa*.

A significativa diversidade genética entre os isolados das populações de 'Valência' de 2005 e de 2012 foi confirmada pela análise de variância. Segundo a AMOVA, a porcentagem de variação genética dos isolados de 'Valência' pertencentes a uma mesma coleção foi de 63,08%, e entre as coleções de 2005 e 2012, foi de 36,92%, cujo valor de F_{ST} foi de 0,37 ($P < 0,0001$). Já os isolados de 'Pera' de uma mesma coleção apresentaram variação genética entre si de 99,62%, e entre as coleções de 2005 e 2012, de apenas 0,38%, cujo F_{ST} correspondente foi 0,0038 ($P < 0,0001$). Baseado nos valores de F_{ST} , o fluxo gênico (N_m) calculado mostrou que a população de 'Valência' passou por um processo de diferenciação genética ($N_m=0,43$) durante o intervalo de tempo avaliado. No mesmo período, as populações de 'Pera', por sua vez, já estavam avançadas em tal processo e encontravam-se em migração ($N_m=65$). Tais considerações podem embasar a identificação de exceções nos agrupamentos, apontadas anteriormente.

Adicionalmente, foi também detectada variação genética entre isolados oriundos de um mesmo fruto, porém advindos de sintomas diferentes. Considerando todas as populações do estudo, 10 duplas de isolados compartilham tal característica. Pela análise da localização de tais isolados no dendrograma, organizado apenas com tais amostras (Figura 12), observou-se que isolados oriundos de um mesmo fruto, porém de sintomas diferentes não foram agrupados no mesmo subgrupo, como regra. Por exemplo, o isolado VCN11.3, oriundo de sintoma de mancha sardenta encontra-se no subgrupo A, enquanto o isolado VCN11.1, obtido do mesmo fruto, porém de

sintoma de mancha dura, encontra-se no subgrupo B, e assim sucessivamente. Exceção observada apenas para os isolados VC20.1 e VC20.2, oriundos de lesões de mancha dura e falsa melanose, respectivamente. Especula-se que tal variação genética ocorre especialmente entre isolados advindos de sintomas que produzem estruturas reprodutivas do fungo.

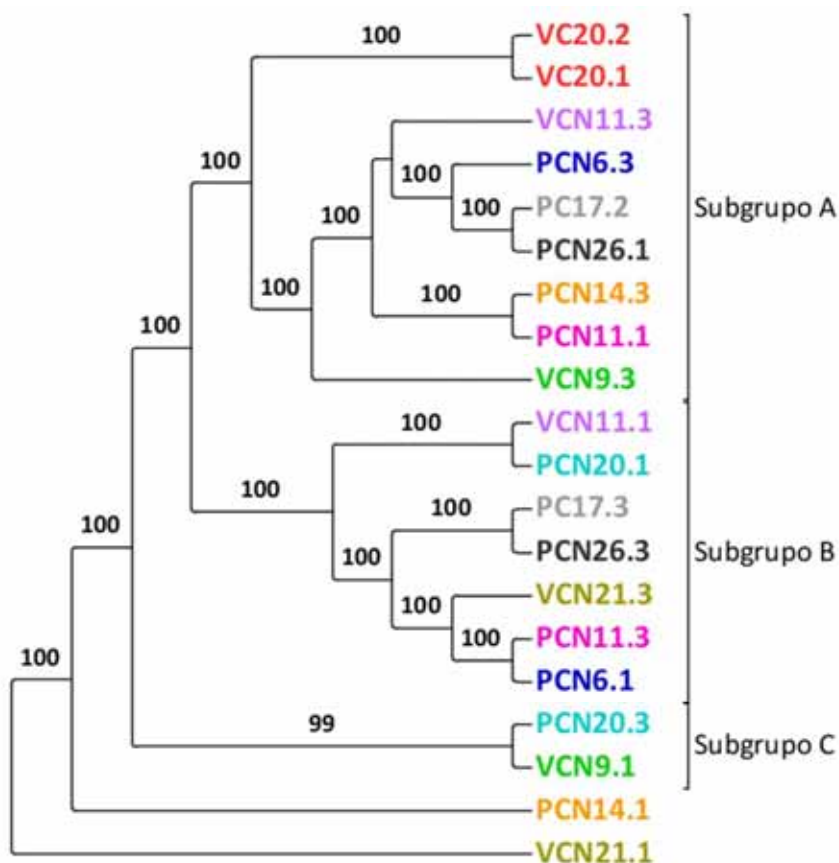


Figura 12. Agrupamento neighbor-joining dos isolados de *Phyllosticta citricarpa* oriundos de um mesmo fruto, porém de diferentes sintomas, os quais encontram-se ilustrados com a mesma cor.

4.4. Isolamento e clonagem de fragmentos de DNA obtidos pelo AFLP

Bandas diferenciais, resultantes da aplicação dos marcadores AFLP, foram isoladas mediante aplicação das amostras em gel de poliacrilamida, purificadas, clonadas e sequenciadas. As amostras que apresentaram similaridade com sequências de aminoácidos dos bancos de dados continham: (i) um fragmento de 157 pb resultante da PCR seletiva com os primers EcoRI-AC/MseI-C (FAM), identificado apenas nos isolados que compuseram o grupo 2 do dendrograma (Figuras 10 e 11), e (ii) um fragmento de 134 pb resultante da PCR seletiva com os primers EcoRI-AG/MseI-C (JOE), presente na maioria dos isolados que compuseram o grupo 2 do dendrograma, em cinco isolados da coleção de 'Valência' de 2005 e no NC10.1 (Figura 13).

O fragmento de 157 pb também foi encontrado em isolados da espécie *P. capitalensis*, sendo estes IPN20.1, IVN14.1, PCN6.3, VCN13.3 e VCN29.1. A sequência desse fragmento apresentou similaridade com sequências de aminoácidos da família de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) (Tabela 6), a qual está relacionada à tolerância do fungo a vários estresses abióticos, incluindo compostos citotóxicos e fungicidas (ABOU et al., 2013; KIM et al., 2014). Já o fragmento de 134 pb não foi encontrado em isolados de *P. capitalensis* e apresentou similaridade com sequências de aminoácidos da NADH desidrogenase (Tabela 7) que exerce papel de proteção ao fungo contra estresses oxidativos (VOULGARIS et al., 2012).

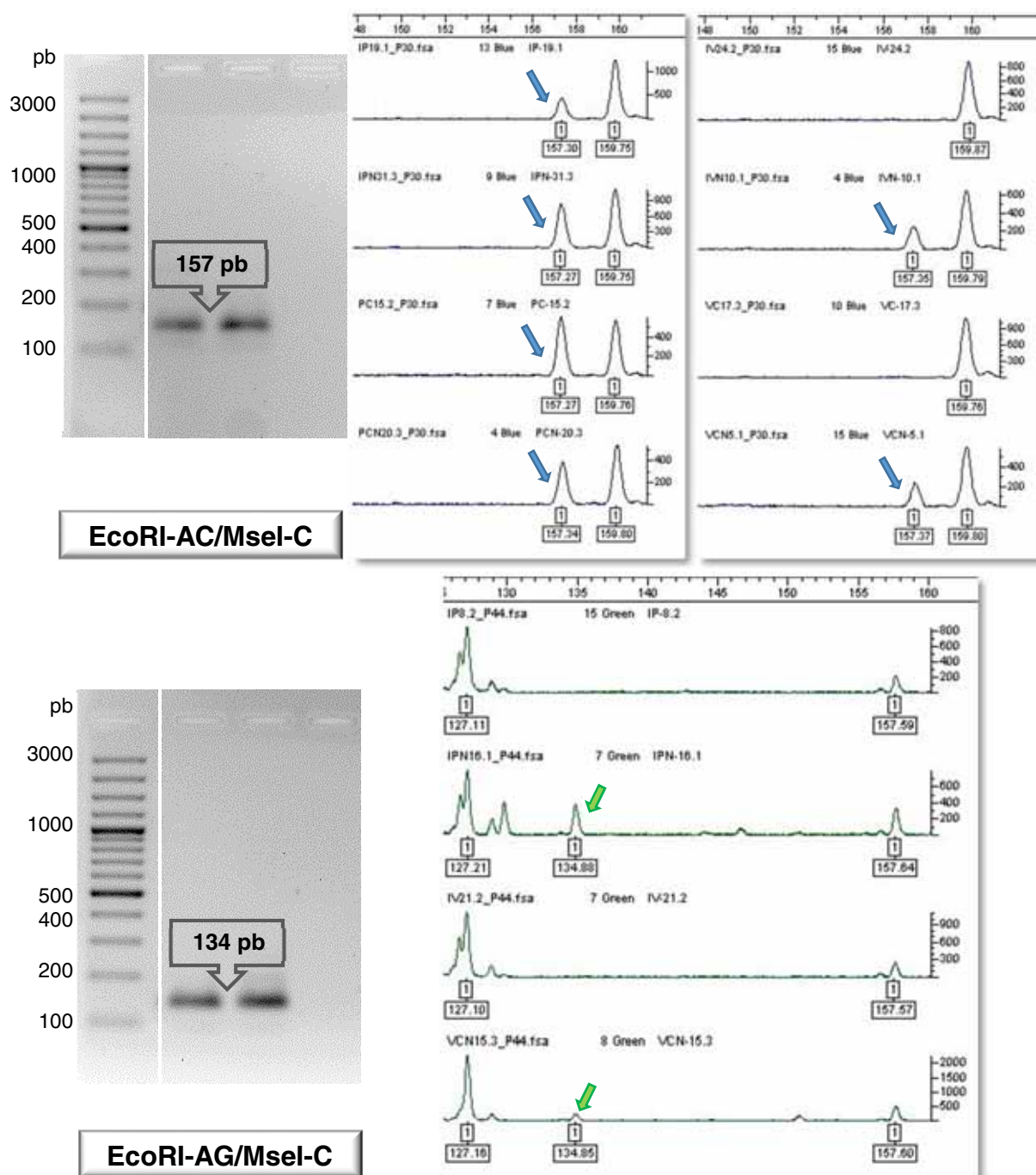


Figura 13. Bandas diferenciais entre isolados de *Phyllosticta citricarpa*, identificadas por meio da aplicação de marcadores AFLP em eletroforese de capilar (figuras à direita) e, visualização dos fragmentos purificados e reamplificados em gel de agarose (figuras à esquerda). O fragmento de 157 pb foi identificado apenas nos isolados que compuseram o Grupo 2 do dendrograma. Já o fragmento de 134 pb foi identificado na maioria dos isolados pertencentes à coleção de 2012 e em alguns da coleção de 2005.

Tabela 6. Resultados do Blastx, nos bancos de dados NCBI e UNIPROT, da sequência de nucleotídeos do fragmento de 157 pb obtido pela reação PCR seletiva do AFLP com os primers EcoRI-AC/MseI-C.

Números de acesso	Descrição da proteína	Cobertura	E-value	Identidade
NCBI				
KGQ11348.1	Putative ABC transporter ATP-binding protein YbhF [<i>Beauveria bassiana</i>]	93%	3e-20	85%
UNIPROT				
A0A015KDE1	ATP-binding cassette permease MDL2 [<i>Rhizophagus irregularis</i>]	84%	3e-5	61%
R9AHV5	ABC transporter G family member 22 [<i>Wallemia ichthyophaga</i>]	79%	3e-5	53%
E7A262	ATP-binding cassette protein (ABC) transporter [<i>Sporisorium reilianum</i>]	78%	5e-5	54%
A0A063BP41	ABC a-pheromone efflux pump [<i>Villosiclava virens</i>]	72%	6e-5	51%
A0A075AWM6	ABC transporter domain containing protein [<i>Rozella allomyces</i>]	79%	6e-5	53%

Tabela 7. Resultados do Blastx, nos bancos de dados NCBI e UNIPROT, da sequência de nucleotídeos do fragmento de 134 pb obtido pela reação PCR seletiva do AFLP com os primers EcoRI-AG/MseI-C.

Números de acesso	Descrição da proteína	Cobertura	E-value	Identidade
NCBI				
AAY30327.1	NADH dehydrogenase subunit 2 [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>]	94%	4.8e-2	89%
UNIPROT				
U5QQN7	NADH dehydrogenase subunit 2 [<i>Cordyceps militaris</i>]	81%	3e-4	59%
A9Y5H8	NADH dehydrogenase subunit 2 [<i>Mycosphaerella graminicola</i>]	79%	8e-3	55%
Q8HG61	NADH dehydrogenase subunit 2 [<i>Lecanicillium muscarium</i>]	77%	1.1e-2	55%
B2L0Z2	NADH dehydrogenase subunit 2 [<i>Beauveria bassiana</i>]	78%	2e-2	56%

4.5. Testes de sensibilidade a fungicidas

Dentre os 202 isolados de *Phyllosticta* spp. analisados, 48 foram submetidos aos testes de sensibilidade a fungicidas. Assim, com base na origem dos isolados e características genéticas, foram selecionados: (i) cinco isolados de cada uma das populações PC, IP, VC, IV, PCN, IPN, VCN e IVN, (ii) o isolado NC10.1, (iii) três isolados brasileiros da espécie *P. capitalensis* sendo estes VCN29.1, IVN14.1 e PCN6.3, (iii) três isolados estrangeiros, 5Arg., 102UY e Gm008, e (iv) o isolado VCN21.1, o qual não encontra-se inserido nos grupos 1 e 2 do dendrograma do AFLP.

Dentre as estrobilurinas testadas, os isolados apresentaram maior sensibilidade à piraclostrobina, cujo EC50 foi de 80 µg i.a./mL, o equivalente ao dobro da quantidade recomendada deste ingrediente ativo para o controle da MPC no campo (vide Tabela 3). Apenas as concentrações de 0,05, 50 e 500 µg i.a./mL foram

estatisticamente diferentes entre si na inibição do crescimento miceliano, cuja porcentagem aos 14 dias de incubação variou, em média, de 30 a 70% (Figura 14).

Após o terceiro dia de incubação dos isolados em meio de cultivo contendo piraclostrobina a 500 µg i.a./mL, observou-se a formação de um halo mais claro, uniforme, ao redor dos discos das colônias, tanto de *P. citricarpa* quanto de *P. capitalensis*. Na primeira avaliação do ensaio, aos sete dias de incubação, notou-se aumento desse halo, cujo diâmetro era de 3,3 cm em média, mesmo mediante ausência do desenvolvimento das colônias. Já aos 14 dias de incubação, além do aumento no diâmetro do halo, em cerca de 1,8 cm em relação à avaliação anterior, constatou-se crescimento miceliano, em média de 32% relativamente à testemunha. Apenas o isolado PC18.3, da coleção de 2005, mostrou 100% de sensibilidade à piraclostrobina na concentração de 500 µg i.a./mL.

A confirmação da presença desse halo ao redor dos discos de colônias foi realizada com a repetição do experimento. Adicionalmente, outros seis isolados foram submetidos a um segundo ensaio, no qual foram aferidas as alterações de pH e densidade ótica (D.O.) do meio de cultivo líquido BD contendo piraclostrobina na concentração de 500 µg i.a./mL e discos de colônias dos fungos. Constatou-se que do início ao final do ensaio não ocorreu alteração de pH, sendo este em torno de 6,0. No entanto, houve uma diminuição exponencial da D.O. ao longo dos 14 dias de avaliação.

Já nos ensaios com trifloxistrobina não foram realizadas observações desta natureza. O fungo mostrou baixa sensibilidade a este ingrediente ativo, cujo EC₅₀ foi de 421 µg i.a./mL, referente a sete vezes a concentração recomendada para o controle de *P. citricarpa* (vide Tabela 3). Para este fungicida as concentrações estatisticamente diferentes entre si na inibição do crescimento miceliano, foram de 0,05, 0,5 e 500 i.a./mL, cujas porcentagens de inibição, em média, aos 14 dias de incubação, variaram de 31 a 44% (Figura 14).

Em contrapartida, os isolados de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* testados mostraram alta sensibilidade ao carbendazim, cujo EC₅₀ foi de 0,37 µg i.a./mL. Aos 14 dias de incubação na concentração de 0,5 µg i.a./mL, foi observado crescimento miceliano, em média, de apenas 9% em relação à testemunha (Figura 14). Observou-se que houve maior inibição do crescimento miceliano na concentração de 0,005 µg

i.a./mL do que na de 0,05 μg i.a./mL. Apenas dois isolados, IVN2.1 e IPN4.1, da coleção de 2012, mostraram-se resistentes a este fungicida, os quais se desenvolveram inclusive na concentração de 1000 μg i.a./mL, testada complementarmente às demais (Figura 15). Com exceção de tais isolados, a inibição do crescimento miceliano dos demais variou, em média, de 81 a 100% aos 14 dias de incubação.

Assim, de um modo geral, os isolados mostraram maior sensibilidade ao carbendazim, seguido pela piraclostrobina e trifloxistrobina. A análise de variância separou os isolados em 11, 8 e 3 grupos estatisticamente diferentes quanto ao seu comportamento frente aos ingredientes ativos piraclostrobina, trifloxistrobina e carbendazim, respectivamente (Tabela 8). Observou-se ainda que, para os três fungicidas testados, o aumento do PIC foi inversamente proporcional ao tempo de exposição aos fungicidas, ou seja, aos 14 dias de incubação a inibição do crescimento miceliano foi menor do que aos sete dias (Figura 14).

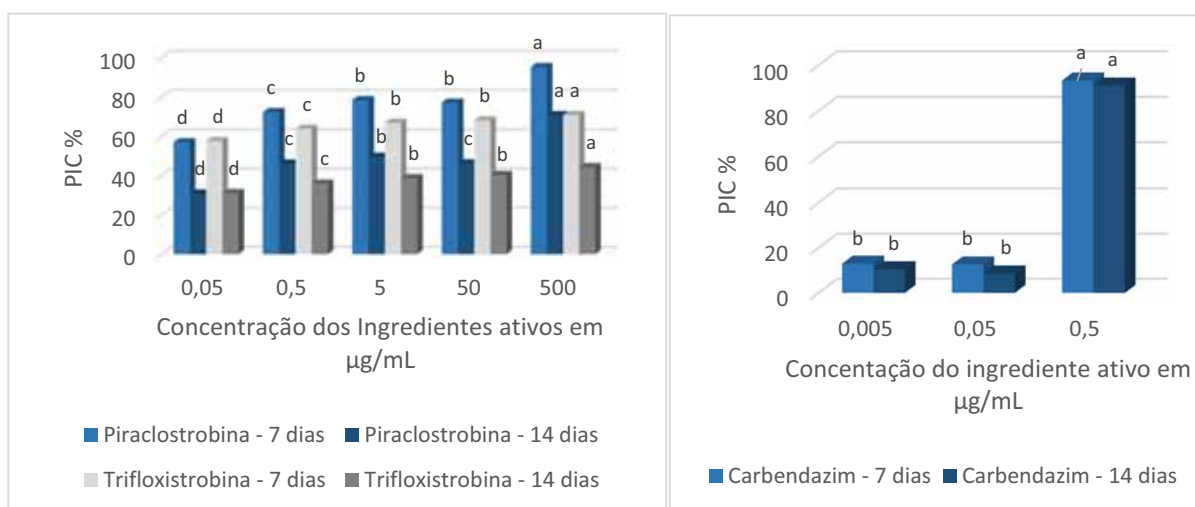


Figura 14. Porcentagem média de Inibição do Crescimento (PIC) miceliano de isolados de *Phyllosticta citricarpa* e *P. capitalensis* sob diferentes concentrações de piraclostrobina, trifloxistrobina e carbendazim. As letras sob as barras representam os grupos estatísticos aos quais as diferentes concentrações dos ingredientes ativos pertencem (Scott e Knott, 1974).

Em termos fenotípicos, fungos da espécie *P. citricarpa* tendem a mudar a coloração da colônia quando submetidos a estresse, alternando do verde-musgo ao amarelo intenso. Tal comportamento foi observado em colônias desenvolvidas em meios cultura contendo piraclostrobina e trifloxistrobina. A coloração amarela nas extremidades das colônias foi intensificada proporcionalmente ao aumento das concentrações dos ingredientes ativos. Comportamento semelhante não foi notado nos ensaios com isolados de *P. capitalensis*, tampouco para ambas as espécies quando expostas ao carbendazim (Figura 15).

Quanto aos isolados da espécie *P. capitalensis* e aos estrangeiros, os mesmos também apresentaram maior sensibilidade à piraclostrobina em relação à trifloxistrobina. Tais isolados podem ser notados nos dois primeiros grupos da análise de variância do ensaio da piraclostrobina, referentes à menor porcentagem de inibição do crescimento miceliano (Tabela 8). Quanto ao isolado NC10.1, que se diferencia dos demais de *P. citricarpa* por não apresentar formação do halo amarelo em meio aveia-ágar, apresentou baixa sensibilidade tanto à piraclostrobina quanto à trifloxistrobina. Já o VCN21.1, que também destacou-se por apresentar maior distância genética em relação aos demais isolados na análise bayesiana de sequências ITS e, inclusive, por encontrar-se separado dos demais no agrupamento do AFLP, mostrou moderada sensibilidade às estrobilurinas (Tabela 8).

Denota-se que não foi observada relação entre o agrupamento dos isolados no dendrograma obtido pela análise com marcadores AFLP e os resultados dos ensaios de sensibilidade a fungicidas (Tabela 8).

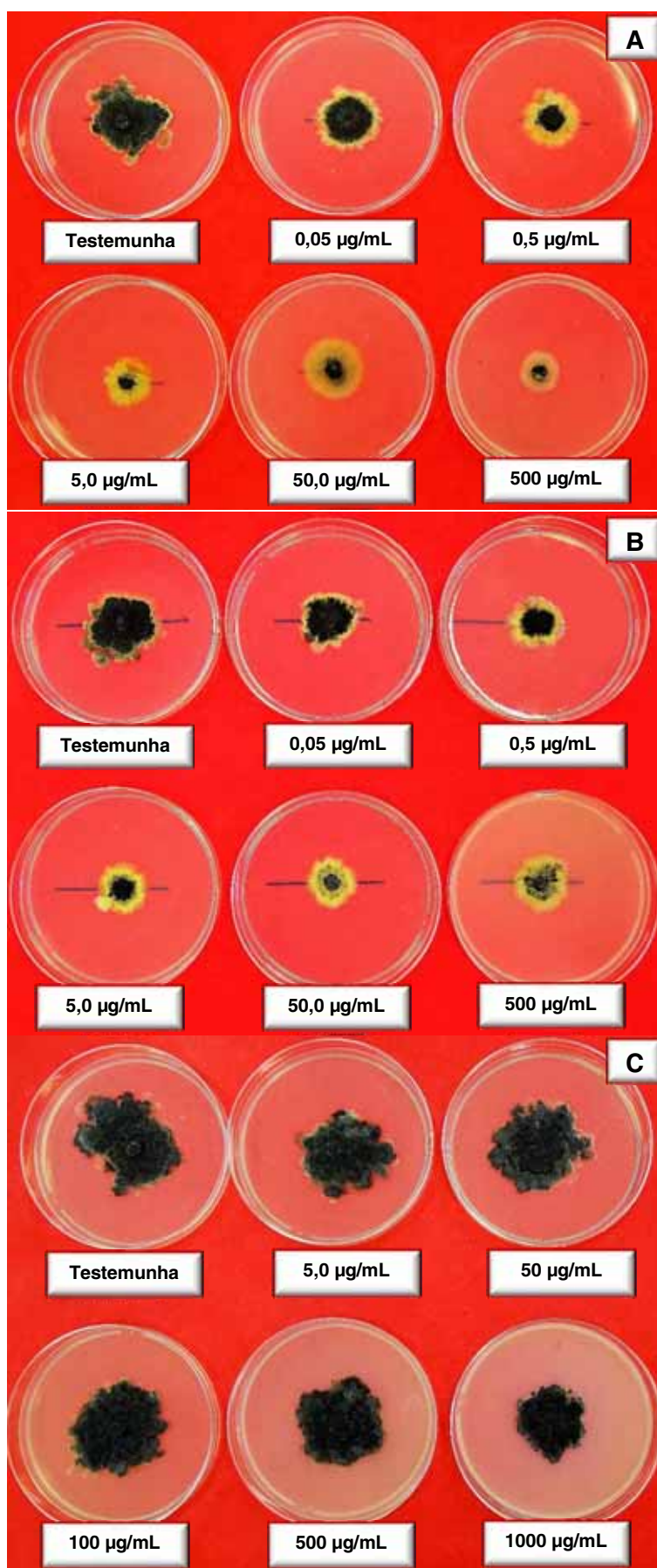


Figura 15. Isolado IVN2.1 submetido aos ensaios com os ingredientes ativos (A) piraclostrobina, (B) trifloxistrobina e (C) carbendazim aos 14 dias de incubação. Nota-se a insensibilidade do isolado ao carbendazim inclusive na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 8. Dados referentes à análise de variância da porcentagem de inibição do crescimento miceliano, aos 14 dias de incubação, sob diferentes concentrações dos ingredientes ativos piraclostrobina, trifloxistrobina e carbendazim, e sua relação com a análise de marcadores AFLP.

AFLP ¹	Piraclost.	PIC ²	A.V. ³	AFLP ¹	Triflox.	PIC ²	A.V. ³	AFLP ¹	Carbend.	PIC ²	A.V. ³
P.c. ⁴	IVN14.1	89,1	a	1	VC30.3	75,6	a	1	VCN20.1	100,0	a
P.c. ⁴	PCN6.3	87,6	a	P.c. ⁴	IVN14.1	73,2	a	2.1	IVN5.3	100,0	a
P.c. ⁴	Gm008	79,4	b	1	5Arg.	62,9	b		IVN25.1	100,0	a
P.c. ⁴	VCN29.1	74,1	b		VCN21.1	59,1	b	2.1	PCN4.1	100,0	a
1	102UY	73,1	b	1	IV24.2	58,3	b	2.1	IPN9.1	100,0	a
1	5Arg.	72,0	b	P.c. ⁴	PCN6.3	57,2	b	1	VC3.2	100,0	a
1	VC30.3	65,9	c	2.1	IPN16.1	56,5	b	1	VC30.3	100,0	a
2.1	PCN9.1	63,1	c	P.c. ⁴	Gm008	55,5	b	1	IP1.1	100,0	a
2.1	VCN15.3	63,1	c	1	IVN1.3	55,3	b	P.c. ⁴	Gm008	100,0	a
2.1	IPN1.1	61,9	c	2.1	PC15.2	54,3	b	2.1	IPN1.1	98,2	a
1	IVN1.3	61,8	c	2.4	IP29.2	52,5	b	1	IV24.2	98,0	a
2.4	IP29.2	61,5	c	1	102UY	52,3	b	2.1	VCN9.3	97,8	a
	VCN21.1	60,8	c	1	VC11.1	47,2	c	2.2	PC2.3	97,1	a
1	VCN20.1	58,0	c	2.2	IV28.3	46,6	c	P.c. ⁴	VCN29.1	97,1	a
2.1	IPN9.1	56,3	d	1	IP17.1	45,0	c	P.c. ⁴	IVN14.1	97,1	a
2.1	PC15.2	55,2	d	2.1	IPN9.1	44,7	c	1	IV2.2	96,7	a
1	VC11.1	55,2	d	2.3	PCN20.3	44,5	c	1	IVN3.1	96,6	a
2.2	IPN6.1	54,7	d	2.1	PCN4.1	43,8	c	1	102UY	96,4	a
1	IV24.2	54,3	d	2.2	IP3.2	43,7	c	2.2	VCN21.3	96,3	a
1	IV15.3	53,9	d	2.3	IVN2.1	42,2	c	P.c. ⁴	PCN6.3	96,2	a
2.2	IP3.2	53,1	d	2.1	PC16.2	40,0	d	1	VC20.1	96,1	a
1	IV2.2	52,5	d	2.1	IVN25.1	39,8	d	2.1	PC15.2	95,8	a
2.1	IVN25.1	50,5	e	2.1	IV11.3	39,8	d	2.1	IPN16.1	95,3	a
2.3	PCN20.3	50,4	e	2.1	VCN9.3	39,6	d	2.1	VCN15.3	95,2	a
2.1	IPN16.1	49,6	e	1	IP1.1	39,4	d	1	IVN1.3	95,2	a
2.3	IVN2.1	49,4	e	P.c. ⁴	VCN29.1	39,2	d	2.2	IPN6.1	94,9	a
2.2	PC2.3	48,1	e	2.1	IP19.1	37,6	d	2.4	IP29.2	94,7	a
2.1	VCN9.3	47,8	e	2.1	VCN15.3	37,4	d	1	5Arg.	94,3	a
2.1	PC18.3	44,9	f	1	IV2.2	36,1	d	2.1	PCN9.1	93,9	a
2.1	IV11.3	44,6	f	2.1	PC18.3	36,0	d	2.2	PCN10.1	93,9	a
2.2	VCN21.3	43,8	f	2.1	IPN1.1	33,4	e	2.2	IP3.2	93,9	a
2.2	PCN10.1	42,4	f	1	IV15.3	33,0	e		VCN21.1	93,9	a
2.1	PCN4.1	42,3	f	1	PC1.1	31,7	e	1	NC10.1	93,7	a
1	IP17.1	41,7	f	2.2	PC2.3	31,4	e	2.1	IV11.3	93,1	a

AFLP ¹	Piraclost.	PIC ²	A.V. ³	AFLP ¹	Triflox.	PIC ²	A.V. ³	AFLP ¹	Carbend.	PIC ²	A.V. ³
2	IP19.1	39,6	f	1	VCN20.1	30,4	e	1	IV15.3	92,4	a
2	IPN4.1	38,8	f	3	IPN6.1	29,7	e	1	VC20.2	92,2	a
1	IP1.1	34,1	g	2	IVN5.3	27,9	f	3	IV28.3	92,0	a
2	PCN11.1	33,8	g	2	PCN11.1	26,5	f	4	PCN20.3	91,5	a
3	IV28.3	32,8	g	2	IPN4.1	21,6	f	2	PC18.3	91,3	a
1	IVN3.1	31,9	g	3	PCN10.1	19,2	g	1	VC11.1	91,0	a
2	IVN5.3	31,1	g	3	VCN21.3	17,0	g	2	IP19.1	90,8	a
2	IVN24.1	30,0	g	1	VC20.1	15,9	g	2	PCN11.1	89,8	a
1	VC3.2	26,7	h	1	IVN3.1	15,6	g	1	IP17.1	87,9	a
1	PC1.1	26,3	h	2	PCN9.1	14,2	g	2	PC16.2	82,7	a
1	VC20.1	21,0	i	1	VC3.2	14,1	g	2	IVN24.1	82,1	a
1	VC20.2	20,2	i	2	IVN24.1	7,1	h	1	PC1.1	81,3	a
1	NC10.1	10,4	j	1	VC20.2	4,2	h	4	IVN2.1	19,8	b
2	PC16.2	2,6	k	1	NC10.1	2,5	h	2	IPN4.1	0,4	c

¹ Número referente ao grupo do dendrograma do AFLP no qual cada isolado encontra-se localizado;

² Porcentagem de Inibição do Crescimento Miceliano pela análise de variância dos dados referentes às diferentes concentrações dos ingredientes ativos testadas e às duas avaliações, aos sete e 14 dias de incubação;

³ Grupo referente à análise de variância por Scott e Knott (1974);

⁴ *Phyllosticta capitalensis*.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos, verificou-se que populações de *P. citricarpa* de um micro-habitat podem sofrer alterações genéticas significativas ao longo do tempo. Tais alterações foram notadas especialmente entre as populações de *P. citricarpa* oriundas de ‘Valência’ de 2005 e 2012, cujo genótipo predominante foi aquele identificado nas populações de ‘Pera’ de ambos os períodos.

De acordo com o sequenciamento gênico, em um intervalo de sete anos, houve incremento no número de haplótipos de *P. citricarpa*, tanto de sequências intergênicas, quanto codificadoras do gene GPDH. Ainda, dentre os isolados da coleção de 2012, notou-se maior quantidade de haplótipos nas populações de ‘Valência’, em detrimento às de ‘Pera’. Embora abordagens dessa natureza não tenham sido contempladas em outros estudos de filogenia, pesquisadores tem verificado que populações de *P. capitalensis* possuem maior quantidade de variações gênicas em relação à *P. citricarpa* (BALDASSARI et al., 2008; WANG et al., 2012; ZAVALA et al., 2014), o que converge aos resultados obtidos no presente trabalho.

Diferenciações genéticas entre as populações de *P. citricarpa* oriundas de laranjeiras ‘Valência’ de 2005 e 2012, foram notadas de forma mais evidente mediante a análise com marcadores AFLP. Os isolados de ‘Valência’ e ‘Pera’, coletados em 2005, foram separados nos grupos 1 e 2 do dendrograma, respectivamente. Dentre os isolados das populações de ‘Valência’ (VC e IV), apenas 11% apresentaram genótipo semelhante aos de ‘Pera’ (PC e IP), ou seja, pressupõe-se que nesta época o genótipo prevalente em ‘Pera’ já havia adentrado o pomar de ‘Valência’. Por sua vez, 13% dos isolados das populações de ‘Pera’ de 2005 foram encontradas no Grupo 1 do dendrograma, sendo este um indício de que a modificação genética que resultou na mudança de genótipo das populações de ambos os pomares, pode ter sido iniciada em plantas de ‘Pera’. Além disso, os valores de F_{ST} e fluxo gênico obtidos são indicativos de que a população de *P. citricarpa* de frutos de laranjeira ‘Valência’ sofreu diferenciação genética ao longo dos sete anos, em detrimento das populações de ‘Pera’. Certamente, tais mudanças já haviam ocorrido nesta população.

Tendo em vista que na propriedade citrícola na qual foram realizadas as coletas, o pomar da variedade 'Valência' era três anos mais novo do que o de 'Pera', a população de *P. citricarpa* que abrigava tais plantas ficou exposta por mais tempo às condições bióticas e abióticas daquele micro-habitat. Quando ocorre o surgimento de um genótipo favorecido, os indivíduos que o possuem continuam a se reproduzir exponencialmente em maiores quantidades do que aqueles pouco favorecidos (SCITABLE BY NATURE EDUCATION, 2014). Dessa forma, a população de *P. citricarpa* que sofreu modificação e, provavelmente, se adaptou primeiramente na variedade 'Pera', migrou para as plantas de 'Valência'.

O uso intensivo de fungicidas pode ser um fator responsável pela pressão de seleção sobre os patógenos alvos. Doses subletais de fungicidas provocam estresse no fungo, levando à superexpressão de genes que os ajudam a resistir aos tratamentos subsequentes. Como consequência, a população vai diminuindo gradualmente a sua sensibilidade a estes produtos químicos, de forma que, um número crescente de indivíduos, com grau de resistência elevado, pode ser encontrado ao longo das gerações (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008).

Plantas da variedade 'Pera', em decorrência dos seus vários fluxos vegetativos, múltiplas floradas e da melhor aceitabilidade dos seus frutos no mercado *in natura* (NEVES et al., 2011), recebem maior número de pulverizações com fungicidas, necessárias tanto para o controle da Podridão Floral dos Citros (SILVA-JUNIOR et al., 2014), quanto para o de *P. citricarpa* (SCALOPPI et al., 2012). Segundo o histórico de pulverizações da propriedade citrícola (Dados não publicados), objeto do presente estudo, entre os anos de 2005 e 2012 as plantas da variedade 'Pera' de fato receberam maior número de aplicações de fungicidas do que as de 'Valência', cujos frutos eram destinados ao processamento industrial. Neste período, as aplicações de fungicidas dos grupos dos benzimidazóis e estrobilurinas deram-se, na maioria das vezes, de forma alternada. Porém, a partir de 2010, devido a dificuldades no controle dos patógenos alvo, em especial da MPC, o número de aplicações de fungicidas foi incrementado significativamente, o que pode ter contribuído para as modificações genéticas nas populações de *P. citricarpa*.

O maior índice de severidade da MPC, por vezes observado em plantas de 'Pera' em relação às de 'Valência', não está associado à suscetibilidade diferencial

dessas variedades (SPÓSITO et al., 2004; ROSSETTO et al., 2011). Tal fator pode estar relacionado à arquitetura das plantas de ‘Pera’, as quais apresentam menos enfolhamento, e uma maior quantidade de ramos secos em relação às de ‘Valência’. Em um ambiente que favorece uma maior produção de inóculo e disseminação da doença, há maior possibilidade de surgimento de biótipos diferentes. Assim, pressupõe-se que indivíduos cujo genótipo foi melhor favorecido, ao encontrarem condições ideais de reprodução nas plantas de ‘Pera’, se disseminaram pelo pomar, chegando a alcançar o de ‘Valência’, onde superaram em número a população de *P. citricarpa* que o hospedava.

O baixo polimorfismo entre isolados de *P. citricarpa*, relatado no presente trabalho e, inclusive, por outros pesquisadores (BAAYEN et al., 2002; BALDASSARI et al., 2008; WANG et al., 2012; ZAVALA et al., 2014) pode estar relacionado à baixa variabilidade genética inerente à especificidade de hospedeiro do fungo, além de ser indicativo de baixa recombinação genética entre os indivíduos. Tais observações podem estar associadas ao fato dos conídios, resultantes da reprodução assexuada do fungo, exercerem importância fundamental na dispersão da doença nos pomares. Tal suposição corrobora aquela realizada por Spósito et al. (2011) os quais determinaram, sob condições naturais de campo, no Brasil, a importância dos conídios e ascósporos como fontes de inóculo e progresso da MPC. Os autores associaram a presença de ascósporos, em áreas com ausência de sintomas da MPC nos frutos, nas quais folhas em decomposição foram utilizadas como fonte de inóculo, ao isolamento de fungos da espécie *P. capitalensis*. Tal espécie está frequentemente em associação com *P. citricarpa* e é comumente isolada de sintomas da MPC (BAAYEN et al., 2002; WANG et al., 2012), assim como também relatado no presente estudo, ainda que esta não seja a responsável pela expressão dos sintomas da doença (BAAYEN et al., 2002; WICKERT et al., 2014).

Embora os resultados com marcadores AFLP tenham indicado baixo polimorfismo entre isolados de *P. citricarpa* em relação a outros fitopatógenos (SOUZA et al., 2013), observou-se que há variabilidade genética entre os isolados. Assim, ressalta-se que as modificações genéticas não ocorrem apenas pela recombinação sexual entre indivíduos. Polimorfismos entre cromossomos, resultante

do reparo da quebra da fita dupla de DNA, poderão resultar em *mismatches*⁴³, e o reparo desses *mismatches* podem resultar em conversão gênica pela recombinação mitótica (LAFAVE; SEKELSKY, 2009), gerando diversidade genética.

Os indivíduos que agregam mutações genéticas favoráveis podem difundir sinais no ambiente extracelular a fim de autorregular sua própria população podendo, inclusive, inibir o crescimento e reprodução de indivíduos da sua própria espécie, fenômeno este denominado *quorum-sensing* (HOGAN, 2006). O primeiro relato de *quorum-sensing* em fungo foi registrado em *Candida albicans*, o qual pode suprimir, por meio de moléculas sinalizadoras, o seu próprio crescimento miceliano e a formação de biofilmes, quando a população atinge um determinado limiar (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012). No caso de fungos fitopatogênicos, já foi relatada a ocorrência de *quorum-sensing* em *Erysiphe necator*, agente causal do oídio da videira. Dentre os efeitos do *quorum-sensing* em *E. necator*, destaca-se o fato do fungo cessar a produção de conídios uma vez que ocorre a compatibilidade vegetativa entre hifas. Assim que a fusão ocorre, o fungo cessa a produção de conidióforos e, aqueles já existentes, interrompem a produção de conídios (GADOURY et al., 2012).

Especula-se que tal fenômeno pode estar relacionado ao fato de isolados de *P. citricarpa* provenientes de um mesmo fruto, porém de diferentes sintomas, estarem agrupados separadamente uns dos outros no dendrograma do AFLP. Devido à baixa diversidade genética encontrada entre isolados de *P. citricarpa*, seria este um mecanismo utilizado pelo fungo para a diminuição da reprodução de conídios geneticamente idênticos, em um mesmo micro-ambiente, como por exemplo, um fruto individualmente. Também, observa-se, em condições de campo, que os sintomas do tipo falsa melanose, que não apresentam estruturas reprodutivas, são decorrentes do escorrimento de gotas de água que carrearam os conídios para um local próximo ao seu sintoma de origem.

De forma convergente, há relatos de que os tipos de sintomas da MPC podem variar de acordo com a concentração da suspensão de esporos utilizada na inoculação de frutos de laranjeiras. Em termos práticos, estudos demonstraram que a inoculação de uma suspensão altamente concentrada de conídios de *P. citricarpa* em frutos, resultaram em sintomas do tipo falsa melanose. Por outro lado, suspensões de

⁴³ Reajustes, incompatibilidade

conídios menos concentradas resultaram predominantemente em sintomas dos tipos mancha dura e mancha sardenta (SILVA-PINHATI et al., 2009). No dendrograma do AFLP que exemplifica apenas a relação entre isolados advindos de um mesmo fruto, observa-se que apenas os isolados VC20.1 e o VC20.2 agruparam-se no mesmo ramo da árvore, sendo o primeiro oriundo de sintoma de mancha dura, e o segundo, de falsa melanose. Notou-se, também, que uma maior quantidade de haplótipos, tanto de sequências ITS, quanto GPDH, foi observada nas populações de isolados oriundos de diferentes plantas em relação àqueles de uma mesma planta, para ambas as variedades estudadas. Diante de tais observações, pressupõe-se que tal fenômeno não ocorra apenas em um micro-ambiente, como o fruto, mas num universo mais amplo, como a planta.

O mapeamento do polimorfismo que resultou na mudança da estrutura genética das populações de *P. citricarpa*, no período avaliado, indicaram que este está relacionado com a codificação de enzimas de atividade conhecida. Por exemplo, a banda do tamanho de 134 pb, diferencial entre alguns isolados dos grupos 1 e 2 do dendrograma, está relacionada com a codificação da NADH desidrogenase, que protege o fungo contra estresses oxidativos. Tal enzima é bastante estudada quanto ao bioprocessamento de fungos, como por exemplo, a produção do ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Pesquisadores comprovaram o papel protetor da enzima NADH desidrogenase quando do bloqueio da mesma, com consequente maior produção de biomassa e utilização de substrato pelo fungo sob estresse oxidativo (VOULGARIS et al., 2012).

Já a sequência do fragmento de 157 pb, presente apenas nos isolados do grupo 2 do dendrograma, referente ao genótipo que prevaleceu na última coleta de frutos, está associada à codificação da proteína *ATP-binding cassette* da superfamília de *ABC transporters*. Essa família de proteínas é uma das maiores já estudadas, e encontra-se presente em todas as células vivas, desde Archaea, bactérias até os mais complexos eucariotos. A maioria dessas proteínas está envolvida no transporte ATP-dependente de uma ampla gama de substratos através das membranas biológicas. Sua importância é enfatizada pela sua contribuição no desenvolvimento de resistência multidrogas pelos microrganismos patogênicos e, inclusive, por atuarem contra o

efetivo tratamento de células tumorais (PIDDOCK et al., 2006; KOVALCHUK; DRIESSEN, 2010).

Há vários relatos na literatura sobre a atuação dos *ABC transporters* em fungos fitopatogênicos. Por exemplo, estudos com *C. acutatum* possibilitaram o isolamento do gene CaABC1, cujo papel na conidiação, estresse abiótico e resistência do fungo a vários fungicidas foi comprovadamente demonstrado (KIM et al., 2009). Outros pesquisadores demonstraram que um medicamento humano, que modula a atividade das *ATP-binding cassette*, potencializou a atividade do fungicida ciproconazole contra o crescimento *in vitro* de *Mycosphaerella graminicola*, um patógeno de plântulas de trigo (ROOHPARVAR et al., 2007). Ainda em outro estudo foi demonstrado que os *ABC transporters* podem proteger fungos da espécie *Fusarium graminearum* contra moléculas antifúngicas do hospedeiro, como também diminuir a sensibilidade dos mesmos a triazóis e fenarimol (ABOU et al., 2013).

Sinais da possível atuação de enzimas da superfamília *ABC transporters* em *Phyllosticta* spp. foram relatados no presente estudo tais como, a mudança na coloração da extremidade das colônias para amarelo, quando sob estresse *in vitro*, e a formação de um halo mais claro, ao redor dos discos de colônias dos isolados em contato com piraclostrobina, na concentração de 500 µg i.a./mL. A formação de tal halo pode estar relacionada a bombas de efluxo ou até mesmo a metabólitos do fungo que degradam, modificam ou detoxificam a estrutura da molécula do ingrediente ativo do fungicida.

Assim, expressões gênicas diferenciais entre os isolados de *Phyllosticta* spp. podem ter contribuído para a diversidade nas respostas de sensibilidade dos mesmos aos fungicidas, em especial do grupo das estrobilurinas. A baixa sensibilidade desses isolados a piraclostrobina, e em especial, a trifloxistrobina, não corrobora os demais relatos da literatura. Rodrigues et al. (2007), constataram alta sensibilidade de 21 isolados de *P. citricarpa* oriundos do estado de São Paulo a piraclostrobina, na concentração de 0,5 µg i.a./mL. Já Hincapie et al. (2014), ao estudarem 86 isolados de *P. citricarpa* da Flórida relataram inibição de 91% do crescimento miceliano na concentração de 10,0 µg i.a./mL de piraclostrobina.

De um modo geral, os resultados de sensibilidade a fungicidas podem variar muito de acordo com a espécie de fungo e procedência dos isolados. Por exemplo,

contrariamente ao exposto no presente trabalho, pesquisadores relataram que trifloxistrobina a 2,0 µg i.a./mL inibiu completamente o desenvolvimento de *Cercospora beticola*, ao passo que a piraclostrobina inibiu 78% do crescimento miceliano do fungo a 10,0 µg i.a./mL (KARADIMOSA; KARAOGLANIDISB; TZAVELLA-KLONARIC, 2005).

Apenas os isolados de *P. citricarpa* IPN4.1 e IVN2.1, ambos da coleção de 2012, mostraram completa insensibilidade ao fungicida carbendazim. Tal resistência adquirida, nessas populações, possivelmente é decorrente da pressão de seleção exercida pelas aplicações sequenciais de tal ingrediente ativo nos pomares amostrados, anteriormente ao ano de 2012. Relatos na literatura quanto à resistência qualitativa dos fungos a benzimidazóis são comumente encontrados (CHUNG et al., 2010). Para o caso de *P. citricarpa*, a resistência foi primeiramente relatada na África do Sul (SCHUTTE et al., 2003). No Brasil, Rodrigues et al. (2007) também encontraram dois isolados de *P. citricarpa* resistentes ao carbendazim, resultados estes convergentes aos obtidos no presente estudo.

Em termos gerais, tanto isolados de *P. citricarpa*, quanto de *P. capitalensis*, mostraram grande variação nos níveis de sensibilidade aos fungicidas do grupo das estrobilurinas, cuja porcentagem de inibição do crescimento miceliano variou de 2,5 a 89%. Não obstante tal variação, não foi possível estabelecer relação entre os diferentes grupos de sensibilidade aos fungicidas e o agrupamento obtido pela aplicação dos marcadores AFLP. Resultados semelhantes também foram obtidos por outros pesquisadores, os quais não identificaram relação entre a sensibilidade ou resistência a fungicidas de diferentes espécies de fungos e o agrupamento do AFLP (DEVRIES et al., 2008; MARTÍN; MARTÍN, 2013).

6. CONCLUSÃO

- ✓ Populações de *P. citricarpa* de um micro-habitat sofrem alterações genéticas significativas em um curto período de tempo e suplantam as populações com genótipos menos favorecidos;
- ✓ Polimorfismos pontuais entre os dois principais genótipos identificados estão associados a sequências codificadoras das proteínas da família de *ABC transporters* e NADH desidrogenase, cuja principal contribuição é o favorecimento da sobrevivência do fungo sob estresse;
- ✓ Há grande variação na inibição do crescimento miceliano e baixa sensibilidade de parte da população de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* a fungicidas do grupo das estrobilurinas, em especial de trifloxistrobina em relação à piraclostrobina;
- ✓ Há indivíduos resistentes ao carbendazim nas populações mais recentes de *P. citricarpa*.

7. REFERÊNCIAS

ABOU, A. G.; TRYONO, R.; DOËLL, K.; KARLOVSKY, P.; DEISING, H. B.; WIRSEL, S. G. R. Identification of ABC transporter genes of *Fusarium graminearum* with roles in azole tolerance and/or virulence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-13, 2013.

AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo, Brasil: AgraFNP, 2014. p. 244.

AGUILAR-VILDOSO, C. I.; RIBEIRO, J. G. B.; FEITCHTENBERGER, E.; GOES, A.; SPÓSITO, M. B. **Manual técnico de procedimento da mancha preta dos citros**. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002. 72p.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi - a review. **Medical Mycology**, Cary, v.50, p. 337-345, 2012.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, La Jolla, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANDRADE, A. G.; PIMENTA, A. A.; GOES, A. Influência do alinhamento de plantio na severidade da mancha-preta-dos-citros, produção e qualidade do suco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1033-1041, 2009.

AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista Agrícola**, Piracicaba, v. 15, p. 468-475, 1940.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN DER AA, H. A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI, W. J. R.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 464-477, 2002.

BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F.; GOES, A. A new method for inoculation of fruit with *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 123, p. 1-4, 2009.

BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 120, p. 103-110, 2008.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO, J. R. W. AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos Versão 1.1.0.711, 2014.

BARTELS, M. Leitfaden Pflanzenschutz 2000 - Welche Fungizidstrategien im Weizen 2000? **Top Agrar**, Berlin, v. 1, p. 51-57, 2000.

BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. Review: the strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, Malden, v. 58, p. 649-662, 2002.

BELLOTTE, J. A. M.; KUPPER, K. C.; RINALDO, D.; SOUZA, A.; GOES, A. The effects of inter-crop cultivation between rows of citrus crop on spreading of *Guignardia citricarpa* ascospores and in the citrus black spot occurrence. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p.102-111, 2013.

BELLOTTE, J. A. M.; KUPPER, K. C.; RINALDO, D.; SOUZA, A.; PEREIRA, F. D.; GOES, A. Acceleration of the decomposition of Sicilian lemon leaves as an auxiliary measure in the control of citrus black spot. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, p. 71-76, 2009.

BENSON, A. H. Black Spot of the Orange. **Agricultural Gazette of New South Wales**, Sydney, v. 6, n. 4, p. 249-252, 1895.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. v. 1, p. 229-234.

BRENT, K. J. **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?** 2. ed. Newline Graphics: Bristol, 2007. p. 9, 13-14.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, Stanford, v. 91, p. 553-556, 1999.

CHIAL, H. DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphisms (AFLP): No genome sequence required. **Nature Education**, London, v. 1, n. 1, p. 176, 2008.

CHUNG, W. H.; CHUNG, W. C.; PENG, M. T.; YANG, H. R.; HUANG, J. W. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. **New Biotechnology**, Barcelona, v. 27, p. 17-24, 2010.

COBB, N. A. Letters on the diseases of plants: black spot of the orange. **Agricultural Gazette of New South Wales**, Sydney, v. 8, p. 229-231, 1897.

COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, Lancaster, v. 47, p. 855-863, 1993.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 43-65, 1986.

DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Sistema de mitigação de risco de *Guignardia citricarpa***, 2015. Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/www/programas/index.php?action=view&cod=52&ar=2&nm=Sanidade%20Vegetal>>. Acesso em: 19 Jan. 2015.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 286-95, 2008.

DEL SORBO, G.; SCHOONBEEK, H.; WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, Madison, v. 30, p. 1-15, 2000.

DEVRIES, R. E.; TRIGIANO R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S.; SOROCHAN, J. C.; RINEHART, T. A.; VARGAS, J. M. Genetic analysis of fungicide-

resistant *Sclerotinia homoeocarpa* isolates from Tennessee and northern Mississippi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 83-90, 2008.

DOIDGE, E. M. Some disease of citrus prevalent in South Africa. **South African Journal of Science**, Karachi, v. 26, p. 320-325, 1929.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

EFSA PANEL ON PLANT HEALTH. Scientific Opinion on the risk of *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) for the EU territory with identification and evaluation of risk reduction options. **EFSA Journal**, Parma, v. 12, n. 2, p. 1-243, 2014.

EPPO. **PQR – EPPO database on quarantine pests**, 2014. Disponível em: <<http://www.eppo.int>>. Acesso em: 19 Jan. 2015.

ER, H. L.; ROBERTS, P. D.; MAROIS, J. J.; VAN BRUGGEN A. H. C. Potential distribution of citrus black spot in the United States based on climatic conditions. **European Journal Plant Pathology**, Wageningen, v. 137, p. 635-647, 2013.

EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M.; MOTTA, A. Phyllostoxin and phyllostin, bioactive metabolites produced by *Phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 3, p. 884-888, 2008.

EWING, B.; GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using PHRED. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 186–94, 1998.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.10, p.564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v.131, p.479-491, 1992.

FAGAN, C.; GOES, A. Efeito da mancha preta dos frutos cítricos, causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutas de laranjas ‘Natal’ e ‘Valência’. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, p.122, 2000.

FAO, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; TORÉS, J. A.; VICENTE, A.; PÉREZ-GARCÍA, A. Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. **Pest Management Science**, Malden, v. 64, n. 7, p. 694-702, 2008.

FOGLIATA, G. M.; CANTON, N. V.; PLOPER, L. D. Análisis de laboratorio para certificación de fruta cítrica del NOA con destino a EE.UU. **Avance Agroindustrial EEAOC**, Tucumán, p. 4-7, 2000.

FRIES, E. M. Summa Vegetabilium Scandinaveae. Sectio posterior. Sweden, Stockholm, Uppsala & Germany, Leipzig. **Typographia Academica**, Lovaina, p. 259-572, 1849.

FUNDECITRUS. **Carbendazim: Fundecitrus orienta para a substituição de fungicida rejeitado pelos EUA**. Notícias agrícolas, 2012. Disponível em: <<http://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/laranja-citrus/101880-carbendazim-fundecitrus-orienta-para-a-substituicao-de-fungicida-rejeitado-pelos-eua.html>>. Acesso em: 09 de Jan. 2015.

GADOURY, D. M.; WAKEFIELD, L. M.; CADLE-DAVIDSON, L.; DRY, I. B.; SEEM, R. C. Effects of prior vegetative growth, inoculum density, light, and mating on conidiation of *Erysiphe necator*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.102, p. 65-72, 2012.

GLIENKE; C.; PEREIRA, O.L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVACORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; CUNNINGTON, J.; SHIVAS, R. G.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia**, Utrecht, v. 26, p. 47-56, 2011.

GOES A. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causados por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 9-13, 2002.

GOES, A. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 2, p. 305-320, 1998.

GOES, A.; BALDASSARI, R. B.; FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M. B.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Brazil. In: IX INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE CONGRESS, 9., 2000, Orlando. **Programs and Abstracts...** Orlando: International Society of Citriculture, 2000. p. 145.

GOES, A.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa em pomares cítricos do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 10., 1992, Aracajú. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1993. p. 318.

GOES, A.; GARRIDO, R. B. O.; REIS, R. F.; BALDASSARI, R. B.; SOARES, M. A. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, p. 71-76, 2008.

GOES, A.; GRAÇA, J.; BARRO, J. C. S. M; PINHEIRO, J. E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina 'Rio' (*Citrus deliciosa*), ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa* kiely). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, p.73-75, 1990.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v. 8, n. 3, p.195-202, 1998.

GRASSO, V.; PALERMO, S.; SIEROTZKI, H.; GARIBALDI, A.; GISI, U. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. **Pest Management Science**, Malden, v. 62, p. 465-472, 2006.

GREEN, P. PHRAD documentation, 1996. Disponível em: <<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>>. Acesso em: 04 Fev. 2015.

GUERBER, J. C.; LIU, B.; CORRELL, J. C.; JOHNSTON, P. R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, New York, v.95, p. 872-895, 2003.

HERBERT, J. A. **Citrus black spot**. Nelspruit: Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, 1989.

HINCAPIE, M.; WANG, N. Y.; PERES, N. A.; DEWDNEY, M. M. Baseline sensitivity of *Guignardia citricarpa* isolates from Florida to azoxystrobin and pyraclostrobin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, p. 780-789, 2014.

HOGAN, D. A. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. **Eukaryotic Cell**, Washington, v.5, n.4, p. 613–619, 2006.

KARADIMOSA, D.A.; KARAOGLANIDISB, G.S.; TZAVELLA-KLONARIC, K. Biological activity and physical modes of action of the Qo inhibitor fungicides trifloxystrobin and pyraclostrobin against *Cercospora beticola*. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, p. 23-29, 2005.

KIELY, T. B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* sp.: the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of Linnean Society of New South Wales**, Mebson's Point, v. 73, p. 249-292, 1948.

KIM, S.; PARK, S.-Y.; KIM, H.; KIM, D.; LEE, S.-W.; KIM, H. T.; LEE, J.-H.; CHOI, W. Isolation and characterization of the *Colletotrichum acutatum* ABC Transporter *CaABC1*. **The Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 30, n. 4, p. 375-383, 2014.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, p. 111-120, 1980.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 10th edn. CAB International, Wallingford, 2008.

KOTZÉ, J. M. Black spot. In: TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. **Compendium of citrus diseases**. Saint Paul: APS Press, 2000, p. 23-25.

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, p. 945-950, 1981.

KOVALCHUK, A.; DRIESSEN, A. J. M. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. **BMC Genomics**, Londres, v. 11, n. 177, p. 1-21, 2010.

KUMARAN, R. S.; MUTHUMARY, J.; HUR, B. K. Isolation and identification of an anticancer drug, taxol from *Phyllosticta tabernaemontanae*, a leaf spot fungus of an angiosperm, *Wrightia tinctoria*. **The Journal of Microbiology**, Daejeon, v. 47, n. 1, p. 40-49, 2009.

KUMARAN, R. S.; MUTHUMARY, J.; HUR, B-K. Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the angiosperm *Citrus medica*. **Journal of bioscience and bioengineering**, Osaka, v. 106, n. 1, p. 103-106, 2008.

LAFAVE, M. C.; SEKELSKY, J. Mitotic Recombination: Why? When? How? Where? **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. e1000411, 2009. Disponível em: <[http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000411](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000411)>.

LIMA, W. G.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F. P.; DE FILHO, P. A. M 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 131, p. 157–165, 2011.

LIU, J.-K.; PHOOKAMSAK, R.; DOILOM, M.; WIKEE, S.; LI, Y-M.; ARIYAWANSHA, H.; BOONMEE, S.; CHOMNUNTI, P.; DAI, D-Q.; BHAT, J. D.; ROMERO, A. I.; ZHUANG, W-Y.; MONKAI, J.; JONES, E. B. G.; CHUKEATIROTE, E.; KO, T. W. K.; ZHAO, Y-C.; WANG, Y.; HYDE, K. D. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 57, p. 149–210, 2012.

LIU, Q.; YU, J.; HU, Y.; YAN, J.; CHENG, H.; QI, X. *Phyllosticta* sp. nov., a new pathogenic species from *Buxus sinica*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 470-473, 2009.

LORENZI, C. O.; VIANA, M. M.; BOTEON, M. EUA limita entrada de suco no país por restrição ao carbendazim. **Hortifruti Brasil**, Piracicaba, v. 109, p. 28, 2012.

MARTÍN, L.; MARTÍN, M. T. Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. **Crop Protection**, Guildford, v. 52, p. 141-150, 2013.

McALPINE, D. **Fungus diseases of citrus trees in Australia and their treatment**. RS Brain: Government Printer, 1899.

McNEILL, J. C.; BARRIE, F. R.; BUCK, W. R.; DEMOULIN, V.; GREUTER, W.; HAWKSWORTH, D. L.; HERENDEEN, P. S.; KNAPP, S.; MARHOLD, K.; PRADO, J.;

PRUD'HOMME VAN REINE, W. F.; SMITH, G. F.; WIERSEMA, J. H.; TURLAND, N. J. **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code), Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia**. Bratislava: International Association for Plant Taxonomy, 2012. cap. 8, p. 113.

McONIE, K. C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, p. 743-746, 1967.

McONIE, K. C. Source of infection for black spot of citrus. **South African Citrus Journal**, Johannesburg, v. 376, p. 5-9, 1965.

MOREIRA, S. Observação sobre a tristeza dos citros ou podridão das radículas. *O Biológico*, São Paulo, v. 8, p. 269-272, 1942.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. São Paulo: CitrusBR, 2011. p. 8,12.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.95, p. 2044-2049, 1998.

OVIEDO, M. S.; STURM, M. E.; REYNOSO, M. M.; CHULZE, S. N.; RAMIREZ, M. L. Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 447-455, 2013.

PAUL, I.; VAN JAARSVELD, A.; KORSTEN, L.; HATTINGH, V. The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* (Kiely): likelihood of disease establishment in the European Union. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, n. 4, p. 297-308, 2005.

PERRYMAN, S. A. M.; CLARK, S. J.; WEST, J. S. Splash dispersal of *Phyllosticta citricarpa* conidia from infected citrus fruit. **Scientific Reports**, Londres, v. 4, p. 1-8, 2014.

PERSOON, C. H. Traité sur les champignons comestibles, contenant l'indication des espèces nuisibles precede d'une introduction a l'histoire des champignons. **Belin-Leprieur**, Paris, France, 1818.

PIDDOCK, L. J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nature Review Microbiology**, Londres, v. 4, p. 629-636, 2006.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

ROBBS, C. F.; PIMENTEL, J. P.; RIBEIRO, R. L. D. A mancha preta dos citros causada por *Phoma citricarpa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 13., 1980, Itaguaí. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1980. p. 455.

RODRIGUES, M. B. C.; ANDREOTE, F. D.; SPÓSITO, M. B.; AGUILLAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 323-327, 2007.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

ROOHPARVAR, R.; HUSER, A.; ZWIERS, L.-H.; WAARD, M. A. Control of *Mycosphaerella graminicola* on wheat seedlings by medical drugs known to modulate the activity of ATP-Binding Cassette Transporters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n.15, p. 5011-5019, 2007.

ROSSETTO, M. P.; AZEVEDO, F. A.; MARTELLI, I. B.; SCHINOR, E. H. Avaliação da mancha preta dos citros em diferentes variedades de laranja doce. **Bragantia**, Campinas, v. 70, p. 58-63, 2011.

SABAT, A.J., BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J.M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A.W. Overview of molecular typing

methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveillance**, Stockholm, v. 18, n. 4, p. 1-14, 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. Londres: CSHL Press, 2001. p.1448.

SCALOPPI, E. M. T.; AGUIAR, R. L.; GOES, A.; SPÓSITO, M. B. Efeito do manejo cultural e químico na incidência e severidade da mancha-preta dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 102-108, 2012.

SCOTT, A. J. & KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, p. 507-12, 1974.

SCHOCH, C. L.; SHOEMAKER, R. A.; SEIFERT, K. A.; HAMBLETON, S.; SPATAFORA, J. W.; CROUS, P. W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, Stanford, v. 98, p. 1041-1052, 2006.

SCHROEDER, W. T.; PROVVIDENTI, R. Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits. **Plant Disease Report**, Saint Paul, v. 53, p. 271-275, 1969.

SCHUBERT, T. S.; DEWDNEY, M. M.; PERES, N. A.; PALM, M. E.; JEYAPRAKASH, A.; SUTTON, B.; MONDAL, S. N.; WANG, N. Y.; RASCOE, J.; PICTON, D. D. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 8, p. 1225, 2012.

SCHUTTE, G. C.; MANSFIELD, R. I.; SMITH, H.; BEETON, K. V. 2003. Application of azoxystrobin for control of benomyl-resistant *Guignardia citricarpa* on 'Valencia' oranges in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 784-788, 2003.

SCITABLE BY NATURE EDUCATION. The genetic variation in a population is caused by multiple factors, Cambridge, 2014. Disponível em: < <http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-genetic-variation-in-a-population-is-6526354>>. Acesso em: 04 Fev. 2015.

SEEVER, F. J. Phyllostictaceae. **North American Flora**, Cidade do México, v. 6, p. 3-84, 1922.

SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; GRICE, K. R. E. *Phyllosticta* species on orchids (Orchidaceae), introducing *Phyllosticta speewahensis* sp. nov. (Phyllostictaceae, Ascomycota) from northern Australia. **Sydowia**, Wien, v. 65, n. 1, p. 139-146, 2013.

SIEROTZKI, H.; FREY, R.; WULLSCHLEGER, J.; PALERMO, S.; KARLIN, S.; GODWIN, J.; GISI, U. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for Qol resistance. **Pest Management Science**, Malden, v. 63, p. 225-233, 2006.

SILVA-JUNIOR, G. J.; SPÓSITO, M. B.; MARIN, D.; AMORIM, L. Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus postbloom fruit drop. **Crop Protection**, Guildford, v. 59, p. 51-56, 2014.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T. F.; MACHADO, M. A. Mancha Preta dos Citros: epidemiologia e manejo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 30, p. 45-64, 2009.

SOUZA, A.; CARBONI, R. C. D.; WICKERT, E.; LEMOS, E. G. M.; GOES, A. Lack of host specificity of *Colletotrichum* spp. isolates associated with anthracnose symptoms on mango in Brazil. **Plant Pathology**, Nottingham, v. 62, p. 1038-1047, 2013.

SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BASSANEZIA, R. B.; YAMAMOTOA, P. T.; FELIPPEA, M. R.; CZERMAINSKIC, A. B. C. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 1546-1552, 2011.

SPÓSITO, M.B.; BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L. Resistência à mancha preta dos citros avaliada por curvas de progresso da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 532-537, 2004.

STAMMLER, G.; SCHUTTEB, G. C.; SPEAKMANA, J.; MIESSNERA, S.; CROUSC, P. W. *Phyllosticta* species on citrus: Risk estimation of resistance to Qol fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. **Crop Protection**, Guildford, v. 48, p. 6-12, 2013.

STERGIOPOULOS, I.; ZWIERS, L.; WAARD, M. A. Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the

ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 108, p. 719-734, 2003.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, London, v. 11, p. 7, 2010.

STRINGARI, D.; GLIENKE, C.; CHRISTO, D.; MACCHERONI, J. R. W.; AZEVEDO, J. L. High molecular diversity of the Fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the Citrus Black Spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1063-1073, 2009.

SWOFFORD, D. L. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0b10**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TIMMER, L. W. Diseases of fruit and foliage. In: TIMMER, L.W.; DUNCAN, L.W. **Citrus Health Management**. Saint Paul: APS Press, 1999, p.107-115.

TUZI, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; EVIDENTE, A. X-Ray crystal structure of Phyllostin, a metabolite produced by *Phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide of *Cirsium arvense*. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 40, n. 1, p. 15-18, 2010.

VAN DER Aa, H. A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 5, p. 1-110, 1973.

VAN DER Aa, H. A.; VANEV, S. **A revision of the species described in *Phyllosticta***. CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, 2002.

VAN POECKE, R. M.; MACCAFERRI, M.; TANG, J. F.; TRUONG, H. M.; JANSSEN, A.; VAN ORSOUW, N. J.; SALVI, S.; SANGUINETI, M. C.; TUBEROSA, R.; VAN DER VOSSSEN, E. A. Sequence-based SNP genotyping in durum wheat. **Plant Biotechnology Journal**, Malden, v. 11, p. 809–817, 2013.

VINCELLI, P. QoI (Strobilurin) Fungicides: Benefits and Risks. **The Plant Health Instructor**, 2012. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/>

topics/Pages/StrobilurinFungicides.aspx>. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0809-02. Acesso em: 15 Jan. 2015.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

VOULGARIS, I.; O'DONNELL, A.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Inactivating alternative NADH dehydrogenases: enhancing fungal bioprocesses by improving growth and biomass yield? **Scientific Reports**, Londres, v. 2, n. 322, p. 1-9, 2012.

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J. D.; VAN EIJK, M. J. AFLP technology for DNA fingerprinting. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 6, p. 1387-1398, 2007.

WANG, X.; CHEN, G.; HUANG, F.; ZHANG, J.; HYDE, K.; LI, H. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 52, p. 209-224, 2012.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELGARD, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. cap.38, p. 315-322.

WHITESIDE, J. O. Sources of inoculum of the black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, in infected Rhodesian citrus orchards. **Rhodesia, Zambia and Malawi Journal of Agricultural Research**, Rhodesia, v. 5, p. 171-177, 1967.

WICKERT, E.; GOES, A.; LEMOS, E. G. M.; SOUZA, A.; SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, F. D.; RINALDO, D. Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp. oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1-5,8S-ITS2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.2, p. 360-380, 2009.

WICKERT, E.; GOES, A.; SOUZA, A.; LEMOS, E. G. M. Genetic diversity and population differentiation of the causal agent of citrus black spot in Brazil. **The Scientific World Journal**, Nasr City, v. 2012, p. 1-14. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1100/2012/368286>>.

WICKERT, E.; SOUZA, A.; PEREIRA, R. M.; KISHI, L. T.; LEMOS, E. G. M.; GOES, A. Molecular and pathogenic study of *Guignardia* spp. isolates associated to different hosts. **Advances in Microbiology**, London, v. 4, p. 116-25, 2014.

WIKKEE, S.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; ALIAS, S. A.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. *Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 60, n. 1, p. 91-105, 2013a.

WIKKEE, S.; LOMBARD, L.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; CHEEWANGKON, R.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D.; CROUS, P. W. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 76, p. 1–29, 2013b.

WIKKEE, S.; UDAYANGA, D.; CROUS, P. W.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H. C.; BAHKALI, A. H.; DAI, D.; HYDE, K. D. *Phyllosticta* - an overview of current status of specie recognition. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 51, p. 43-61, 2011.

WIKKEE, S.; WULANDARI, N. F.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. *Phyllosticta ophiopogonis* sp. nov. from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 19, p. 13-16, 2012.

WONG, M.; CROUS, P. W.; HENDERSON, J.; GROENEWALD, J. Z.; DRENT, A. *Phyllosticta* species associated with freckle disease of banana. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 56, p. 173-187, 2012.

WOOD, P. M.; HOLLOMON, D. W. 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**, Malden, v. 59, p. 499-511, 2003.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v.15, p.323-354, 1951.

WULANDARI, N. F.; TO-ANUN, C.; HYDE, K. D.; DUONG, L. M.; DE GRUYTER, J.; MEFFERT, J. P.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. (2009). *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 34, p. 23-39, 2009.

YAN, X.; SIKORA, R. A.; ZHENG, J. Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.) endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 12, n. 3, p. 219-225, 2011.

ZAVALA, M. G. M.; ER, H. L.; GOSS, E. M.; WANG, N. Y.; DEWDNEY, M.; VAN BRUGGEN, A. H. C. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n.2, p.119-128, 2014.

ZHANG, K.; ZHANG, N.; CAI, L. Typification and phylogenetic study of *Phyllosticta ampellicida* and *P. vaccinii*. **Mycologia**, Stanford, v. 105, n. 4, p.1030-1042, 2013.

ZHANG, Z.; VAN PARIJS, F. R. D.; XIAO, B. The status of AFLP in the genomics era and a pipeline for converting AFLPs into single-locus markers. **Molecular Breeding**, Lleida, v. 34, p. 1245-1260, 2014.

ZHOU, N.; CHENA, Q.; CARROLLC, G.; ZHANGD, N.; SHIVASE, R. G. CAI, L. Polyphasic characterization of four new plant pathogenic *Phyllosticta* species from China, Japan, and the United States. **Fungal biology**, Manchester, 2014. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.08.006>