**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Eficiência do processo de beneficiamento de laranja doce na
redução de incidência de frutos com mancha preta dos citros
(*Phyllosticta citricarpa*) em *packinghouse* com frutos destinados ao
mercado interno**

Paula Schiavolin Panosso

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2014**

**Paula Schiavolin Panosso
Engenheira Agrônoma**

Eficiência do processo de beneficiamento de laranja doce na redução de incidência de frutos com mancha preta dos citros (*Phyllosticta citricarpa*) em *packinghouse* com frutos destinados ao mercado interno

Orientador:
Profa. Dra. **LILIAN AMORIM**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Panosso, Paula Schiavolin

Eficiência do processo de beneficiamento de laranja doce na redução de incidência de frutos com mancha preta dos citros (*Phyllosticta citricarpa*) em *packinghouse* com frutos destinados ao mercado interno / Paula Schiavolin Panosso. - - Piracicaba, 2014.

61 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. *Citrus sinensis* 2. Controle 3. Doença Quarentenária 4. Epidemiologia I. Título

CDD 634.31
P195e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico, não apenas este trabalho, mas também minha vida às pessoas mais importantes da minha vida, meu pai João Francisco Lanosso, minha mãe Maria Inês Schiarolin e minha irmã Patricia Schiarolin Lanosso.

Sem vocês eu não tenho razão pra viver

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proporcionar a vida e a família que tenho.

À Profa. Dra. Lilian Amorim, por ter confiado em mim, pela sua paciência, pela dedicação ao trabalho e pela sua extrema competência, deixo aqui meu agradecimento e minha admiração.

Ao programa de pós-graduação do Departamento de Fitopatologia.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelo conhecimento transmitido, em especial o prof. Dr. Nelson Massola, pela preocupação e disposição em ajudar sempre, ao Prof. Dr. José Belasque, pela competência e pela agradável companhia durante as aulas ministradas durante o semestre de 2013.

À secretária de Pós-graduação Fabiana Wolak, pela extrema competência no trabalho, torcida e momentos de descontração.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa durante o período de Mestrado.

Ao Dr. Renato Bassanezi pela disposição em ajudar e pela contribuição no trabalho.

Ao Dr. Geraldo José Silva Júnior pelas idéias inseridas no trabalho, disposição em ajudar e fornecimentos de frutos sempre quando necessário.

À Silvia Lourenço e Luiz Ortiz, pela amizade construída, pelas inúmeras idas à Engenheiro Coelho, pela ajuda na condução dos experimentos, pelo conhecimento transmitido, pela extrema competência no trabalho, sem vocês esse trabalho não teria sido concluído.

Ao pesquisador Eduardo Feichtenberger (APTA-Sorocaba), pela atenção, dedicação e pela colaboração nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Sentelhas pelo fornecimento de dados climáticos e por sempre se colocar a disposição para solucionar dúvida e ajudar no que fosse necessário.

Ao *packinghouse* ALFA-CITRUS, por abrir suas portas para a pesquisa, pela disposição em ajudar e pela ótima recepção em todos os dias de análise, em especial Pedro Fávero, Marcelo de Campos e Rodrigo Forner.

Aos alunos do Laboratório de Epidemiologia; André Gama, Alécio Moreira, Antônio Nogueira, Caroline Rabelo, Guilherme Frare, Pedro Gava e Pedro Fávero. Em especial, Ana Raquel Colletti, Isabela Primiano, Maria Cândida Gasparoto e Renata Mesquini pela amizade construída, companheirismo, conselhos e inúmeros dias de alegria que foram proporcionados durante esses anos.

Aos alunos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica: Dalilla Rezende, Luiz Rafael Pinto, Rafaela Roma e Simone Brand, pela amizade e momentos de descontração. Em especial, Thiago Anchieta, pela amizade construída, por alegrar meu dia e me fazer sorrir.

À amiga do Laboratório de Patologia de Sementes Meyriele Pires, pela amizade, momentos de descontração e por me deixar muito nervosa em todos os dias de prova, apresentações, etc.!!!

À amiga de laboratório Juliana Baggio pelo conhecimento transmitido, pela paciência em ajudar, pela agradável companhia durante todos os dias nesses dois anos, em estudos, em momentos de descontração e, principalmente, pela amizade construída.

Às minhas queridas amigas que fiz na graduação e que levo eternamente no coração: Caroline Blumer (Da-marxa), Isabela Barbeiro (Cirola), Isadora Rosalem (Gt), Mariana Kolonko (Avãço), Raquel Bertholdi (µlgous) e Renata Santos, obrigada pelos conselhos, inúmeras conversas, abraços, risos e choros, apesar da distância entre nós a amizade permanece constante e na mesma intensidade. Sinto falta todos os dias!!!

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esse sonho se tornar realidade.

EPÍGRAFE

Amor é fogo que arde sem se ver,
é ferida que dói, e não se sente;
é um contentamento descontente,
é dor que desatina sem doer.

É um não querer mais que bem querer;
é um andar solitário entre a gente;
é nunca contentar-se de contente;
é um cuidar que ganha em se perder.

É querer estar preso por vontade;
é servir a quem vence, o vencedor;
é ter com quem nos mata, lealdade.

Mas como causar pode seu favor
nos corações humanos amizade,
se tão contrário a si é o mesmo Amor?

Luis Vaz de Camões

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Produção e exportação de frutos <i>in natura</i> e suco concentrado de laranja no Brasil	17
2.2 <i>Phyllosticta citricarpa</i> e a mancha preta dos citros.....	18
2.2.1 Distribuição geográfica e importância	18
2.2.2 Agente causal e sintomatologia.....	19
2.2.3 Controle.....	21
2.2.4 Praga Quarentenária	22
2.3 <i>Packinghouse</i>	24
2.3.1 O que é um <i>packinghouse</i> ?.....	24
2.4 Material e Métodos	25
2.4.1 Avaliação da incidência e da severidade de MPC em lotes antes e após o beneficiamento em <i>packinghouse</i>	25
2.4.1.1 <i>Packinghouse</i> ALFA-CITRUS	25
2.4.1.2 Avaliações de incidência e de severidade da mancha preta dos citros.....	28
2.4.1. Análise de dados	30
2.4.2 Frutos descartados pelo <i>packinghouse</i>	30
2.4.3 Indução de sintomas de mancha preta dos citros	31
2.4.5 Quantificação de picnídios em lesões novas de mancha sardenta	33
2.4.6 Efeito de aplicação de cera de carnaúba e do fungicida Imazalil nos sintomas pós-colheita de mancha preta dos citros	34
2.5 Resultados e Discussão	35
2.5.1 Avaliação de incidência e severidade da mancha preta dos citros antes e após o beneficiamento em <i>packinghouse</i>	35
2.5.2 Frutos descartados pelo <i>packinghouse</i>	43
2.5.3 Indução de sintomas	45
2.5.3.1 Frutos sintomáticos	45
2.5.3.2 Frutos assintomáticos.....	47

2.5.4 Quantificação de picnídios em lesões novas de mancha sardenta	48
2.5.5 Efeito de aplicação de cera de carnaúba e do fungicida Imazalil nos sintomas pós-colheita de mancha preta dos citros	50
3 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	57

RESUMO

Eficiência do processo de beneficiamento de laranja doce na redução de incidência de frutos com mancha preta dos citros (*Phyllosticta citricarpa*) em *packinghouse* com frutos destinados ao mercado interno

A mancha preta dos citros (MPC) é causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* e está entre as principais doenças citrícolas do Brasil. Esse fungo provoca lesões superficiais e queda precoce dos frutos. Essas lesões não comprometem a qualidade interna do fruto, porém limita a comercialização no mercado brasileiro de frutos e impede que o Brasil seja exportador do produto *in-natura* devido à presença dos sintomas. A MPC é uma doença quarentenária A1 na União Europeia (UE) por não estar presente em seus países membros. Essa é a principal razão pela qual o Brasil, embora seja o maior produtor mundial de frutos e suco, não apareça no topo dos países exportadores. O principal controle utilizado para a doença é o controle químico associado a práticas culturais. Os principais fungicidas utilizados são os cúpricos, os benzimidazóis e a mistura de estrobilurinas e triazóis. Porém, em 2012 os benzimidazóis foram retirados da lista de produtos permitidos em pomares com frutos destinados ao mercado externo. Nesse contexto, os produtores se veem com uma opção a menos para o controle da doença no campo. Sabe-se que o beneficiamento em *packinghouse* é um método de controle dos frutos em pós-colheita, porém a eficiência desse processo nunca foi avaliada. Por essa razão, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do processo de beneficiamento em *packinghouse* na redução de incidência de frutos com MPC. Para isso, foi avaliado quinzenalmente, no período de abril de 2012 a maio de 2013 a incidência e a severidade de MPC nos frutos antes e após o beneficiamento pelo *packinghouse*. Para a avaliação da severidade foi utilizada a escala diagramática. A redução da incidência no lote chegou a 53,3 %, enquanto que a redução da severidade no lote chegou a 68 %. Foi observado que grande parte dos frutos se agrupa em intervalos baixos de severidade, entre 0,5 a 1,7 %. A eficiência do *packinghouse* aumenta com o incremento na classe de severidade, por exemplo, a redução da MPC é de 100 % em casos em que a severidade dos frutos é maior que 11,6 %. Os frutos com baixa severidade são dificilmente detectados e não são retirados da linha de beneficiamento, já que o *packinghouse* tem seus frutos destinados ao mercado interno e menos exigentes na questão fitossanitária. A quantificação de picnídios em lesões novas de mancha sardenta foi realizada em frutos que já apresentavam sintomas da doença. Os frutos foram mantidos em recipientes plásticos, a temperatura de 25 ° C sob luz constante, o acompanhamento era feito a cada dois dias. Foi verificado que o aparecimento de picnídios ocorre de 2 a 18 dias após o aparecimento da lesão e não foi verificado um padrão de produção dos picnídios em manchas sardentas. O efeito da aplicação de cera de carnaúba e fungicida imazalil nos sintomas pós-colheita foi realizado em frutos com três tratamentos, (1) cera de carnaúba, (2) cera de carnaúba + imazalil e (3) controle. Os frutos foram mantidos em recipientes plásticos, a temperatura de 25 ° C sob luz constante, a avaliação era feita a cada quatro dias. Foi verificado que a taxa de progresso da doença foi crescente para os tratamentos (1) cera de carnaúba + imazalil, (2) cera de carnaúba e (3) controle. As taxas diferiram estatisticamente pelo teste-t a 5 % de probabilidade.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Controle; Doença Quarentenária; Epidemiologia

ABSTRACT

Efficiency of processing sweet orange on the reduction of incidence of fruits with citrus black spot (*Phyllosticta citricarpa*) in a packinghouse with fruits allocated for the domestic market

The citrus black spot (CBS) is caused by *Phyllosticta citricarpa* fungus and is one of the main citrus diseases in Brazil. This fungus causes surface lesions and early fruit drop. These lesions do not compromise the internal quality of the fruit; however, they limit its commercialization in the domestic market and hinder exports of the fruit *in-natura*. The CBS is a quarantine disease classified as A1 by the European Union (EU) with no occurrence in its member countries. For this reason, the EU has tolerance zero for fruits contaminated with CBS. This is the main reason that stops Brazil, the world's largest fruit and juice producer, from being the top citrus exporter country. The disease is controlled mainly by the use of chemicals associated with cultural practices. The main chemical products used are cupric, benzimidazols and mixture of strobilurin and triazole. However, in 2012 benzimidazols were banned from the domestic market. Therefore, producers have fewer options for the control of the disease in the field. The processing of fruits at a packinghouse is a method of post-harvest fruit control; nevertheless, the efficiency of this process was never assessed. This study aimed to evaluate the efficiency of packinghouse process in reducing incidence of CBS in oranges. The incidence and severity of CBS in the fruits before and after packinghouse process were evaluated every fifteen days, from April 2012 to May 2013. The diagrammatic scale was used to assess the severity of CBS. Incidence reduction of these fruits can reach 50.5 %, whereas the reduction of fruits severity decreased up to 68 %. We observed that large quantities of fruits are aggregated to low severity breaks on the diagrammatic scale, from 0.5 to 1.7 %. For fruits with high severity, the detection is easier and they are removed from the processing belt, improving efficiency. The efficiency of a packinghouse in reducing the occurrence of CBS is 100% in cases where severity of fruits is greater than 11.6%. The behavior adopted by the packinghouse to detect fruits changes depending on severity. The fruits with low severity are hard to be detected on the belt and are not removed from the processing line, because the packinghouse studied allocates its fruits to the domestic market, which is less demanding in terms of plant health. Quantification of pycnidia in new freckled spot lesions was carried out in fruits that already show symptoms of the disease, the fruits were kept in containers at 25 ° C under constant light, the monitoring was done every two days. It was found that the appearance of pycnidia was between 2 and 18 days after onset of the injury and was not observed standard in pycnidia production. The appearance of freckles spot was performed with three treatments on fruit (1) carnauba wax, (2) carnauba wax + imazalil and (3) control. The fruits were kept in containers at a temperature of 25 ° C under constant light, the assessment was carried out every four days. It was found that the rate of progress of the disease increased for treatment (1) Carnauba wax + imazalil, (2) carnauba wax and (3) control. Rates differed statistically in the t-test at 5% probability.

Keywords: *Citrus sinensis*; Control; Quarantine Disease; Epidemiology

1 INTRODUÇÃO

O Estado de São Paulo é o maior Estado produtor de citros, pois tem a maior área plantada de *Citrus sinensis*. A proximidade de indústrias processadoras de suco de laranja facilita a produção e representa o principal destino das frutas produzidas.

O Brasil é o principal produtor e exportador de suco de laranja. A maior parte do suco vai para Europa seguida dos Estados Unidos. Embora o Estado de São Paulo se destaque na sua produção, outros Estados como Bahia, Minas Gerais, Sergipe e Paraná também apresentam grande participação na produção de laranja (AGRIANUAL, 2012).

A área colhida no ano de 2011 foi de 795.860 hectares e só a Região Sudeste foi responsável por 588.678 hectares de colheita no mesmo ano. Segundo o IBGE, a área com plantio de *Citrus sinensis* em 2013 foi de 724.292 hectares, com redução de 9 % em relação a 2011 (AGRIANUAL, 2012). Porém, essa redução de área não afetou a produção, pelo contrário, a produção aumentou no ano de 2011. Os motivos desse aumento foram: a troca de pomares antigos por pomares mais adensados (580 plantas por hectare), o aumento de tecnologia e a utilização de variedades mais produtivas.

A citricultura paulista convive com problemas que envolvem ordem política, econômica e fitossanitária. Tais interferências atingem o setor e muitas vezes forçam o produtor a migrar para outro segmento, como por exemplo, o setor canavieiro. Um dos problemas que afetam consideravelmente a citricultura paulista é o fitossanitário. A cultura de citros é hospedeira de várias doenças causadas por diversos patógenos, entre eles fungos, bactérias, vírus etc. Uma das principais doenças da cultura é a mancha preta dos citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*. Os sintomas ocasionados pela doença depreciam os frutos para comercialização *in natura* no mercado interno, assim como restringem as exportações (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002). A MPC também causa a queda prematura dos frutos (TIMMER, 1999), podendo levar a reduções de até 80 % na produção (KLOTZ, 1978).

O controle mais comum e mais eficiente para a mancha preta dos citros é o químico com a utilização de produtos cúpricos nas primeiras aplicações e o uso de estrobilurinas + triazol a partir da segunda aplicação. O recomendado são duas a

seis aplicações na safra, a partir da queda das pétalas das flores, porém para frutos *in natura* esse número de aplicações deve ser maior (FUNDECITRUS, 2013).

No ano de 2012, uma engarrafadora norte-americana encontrou resíduo do fungicida carbendazim (benzimidazol) acima do permitido pelas normas americanas em suco brasileiro. O produto não está registrado para a cultura de citros nos Estados Unidos. Por essa razão, produtores brasileiros que destinam seus frutos ao mercado externo ficam proibidos de utilizar o produto em seus pomares.

Não há tolerância para MPC na Europa, todo lote é rechaçado caso a inspeção no local de destino detecte um fruto com lesão da doença. Essa é a principal razão pela qual o Brasil, embora seja o maior produtor mundial de frutos e de suco, não aparece nos primeiros lugares do ranking de exportadores de frutos.

Para o consumo interno e externo de frutos *in natura*, é necessário que os frutos sejam direcionados a *packinghouses* para serem beneficiados. As atividades de sanitização, de eliminação de frutos e de proteção dos mesmos com cera de carnaúba e fungicida, executados no *packinghouse* são formas de controle da doença. Os frutos sintomáticos retirados da linha de beneficiamento são descartados ou redirecionados para o processamento de suco, porém a eficiência dos *packinghouses* na redução da MPC nunca foi mensurada.

Após o processamento, os frutos são encaminhados a hipermercados, atacadistas e depois chegam ao consumidor. A seleção dos frutos na linha de beneficiamento é dependente da exigência do destino final dos frutos.

Na seleção, são descartados frutos com danos mecânicos e frutos doentes. Nessa etapa os frutos com MPC que apresentam alta severidade são detectados visualmente e são retirados manualmente ou mecanicamente da linha de beneficiamento. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência do beneficiamento de laranjas doce na redução de MPC, em frutos direcionados ao mercado interno em *packinghouse*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Produção e exportação de frutos *in natura* e suco concentrado de laranja no Brasil

O Brasil lidera a produção de laranjas com 20.196.000 toneladas produzidas na safra de 2010/11. Os países seguintes ao Brasil são Estados Unidos com uma produção de 7.963.000 toneladas e EU-27 com uma produção de 6.134.000 toneladas (AGRIANUAL, 2012).

No mercado brasileiro de citros, a produção de laranja se concentra no Sudeste. As regiões Norte, Nordeste, Sul, Centro Oeste também apresentam participações no setor, porém o destaque é para a região Sudeste. A área colhida do Estado de São Paulo teve uma diminuição entre os anos de 2005 a 2011, decorrente da mudança de cultura de citros pela cana-de-açúcar, porém a produção brasileira de laranja do Sudeste no mesmo período teve um aumento. No ano de 2005 o Brasil produziu 17.853.443 toneladas de laranja e no ano de 2011 produziu 19.112.251 toneladas (AGRIANUAL, 2012).

Em 2011, o Brasil exportou um total de 216.835 toneladas de suco de laranja, uma diminuição de 53,5 % em relação ao ano de 2010 (AGRIANUAL 2012). Esse decréscimo na exportação de suco foi decorrente da exigência sanitária dos Estados Unidos em relação ao suco brasileiro.

No ano de 2012 foram encontrados resíduos de carbendazim em suco brasileiro exportado por uma engarrafadora Norte Americana a uma concentração superior a 10 partes por bilhão (ppb). O uso do carbendazim é liberado no Brasil, mas proibido Estados Unidos para a cultura dos citros, por essa razão lotes que apresentam resíduos desse fungicida são rechaçados.

A concentração inferior a 10 ppb de carbendazim é o limite imposto pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA) para laranja. Esse órgão é responsável por fazer análises de amostras que chegam ao país. O agrotóxico em questão é do grupo químico benzimidazol, produto sistêmico utilizado para doenças fúngicas, entre elas a mancha preta dos citros (MPC).

Por decisão da Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA), no dia 10 de janeiro de 2012, o governo suspendeu

importações de suco de qualquer país que apresentem níveis de 10 ppb ou superior do fungicida carbendazim.

O Brasil também exporta suco concentrado para a Europa. Para esses países o limite permitido de carbendazim é de 200 ppb. A referência internacional na área de resíduos de alimentos, o *Codex Alimentarius* indica como limite 1000 ppb do produto. Por essa razão, a exportação de suco teve decréscimo imediato, ao longo de 2012. O Brasil teve que se adequar às exigências impostas e as vendas foram retomando o ritmo.

2.2 *Phyllosticta citricarpa* e a mancha preta dos citros

2.2.1 Distribuição geográfica e importância

A mancha preta dos citros (MPC) foi primeiramente descrita na Austrália em 1895, causando grandes perdas em frutos de laranja doce (KIELY, 1948), em 1925, foi encontrada na África do Sul (DOIDGE, 1929). Nos anos posteriores foi encontrada em outros lugares do mundo como: Ásia (China, Taiwan, Japão, Hong Kong, Filipinas e Indonésia), África (Moçambique, Swazilândia, Nigéria, Quênia, Rodésia, Uganda, Gana e Zimbábue), América do Sul (Argentina, Peru, Venezuela, Brasil e Uruguai) (KOTZÉ, 1988, FEICHTENBERGER, 1996, FEICHTENBERGER et al., 1997, TIMMER et al., 2000) e América do Norte (Estados Unidos) (SCHUBERT et al., 2012)

A MPC, afeta praticamente todas as espécies de importância econômica de citros, especialmente laranjas doce (*Citrus sinensis*), com exceção da laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.) (KOTZÉ, 1981) e da lima ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Osbeck).

No Brasil, a doença se encontra amplamente distribuída nos seguintes Estados: Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas gerais, Espírito Santo e Bahia (ROBBS et al., 1980; FEICHTENBERGER, 1996; GOES & FEICHTENBERGER, 1993; COSTA et al., 2003; SILVA, 2012).

Todas as variedades comerciais de laranja doce são suscetíveis à doença (SPÓSITO et al., 2004). Os sintomas ocasionados pela doença depreciam os frutos para a comercialização *in natura* no mercado interno, essas lesões

restringem a exportação. Os sintomas ocasionados se limitam ao flavedo do fruto, não havendo alteração na qualidade interna (CARDOSO FILHO, 2003), de tal forma que esses frutos podem ser utilizados no processamento para a produção de suco (AGUIAR-VILDOSO et al., 2002).

A doença não é encontrada da Europa, por essa razão os lotes exportados do Brasil para a Europa devem estar livres da doença.

2.2.2 Agente causal e sintomatologia

A mancha preta dos citros (MPC) é causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) van der Aa].

Nas folhas de citros caídas no chão e que estão em decomposição são formados os esporos sexuais do fungo, os ascósporos. Os ascósporos constituem na principal fonte de inóculo, a produção desses esporos é favorecida pela alternância entre os períodos de molhamento e de seca das folhas, momento esse comum durante estações chuvosas do ano. Os ascósporos são dispersos pelo vento e responsáveis por infectar ramos, folhas e frutos da planta e outras plantas a maiores distâncias (FEICHTENBERGER et al., 2011).

Nos ramos e em frutos infectados são formadas lesões que produzem esporos assexuais (conídios) a partir dos picnídios. Os conídios são somente disseminados a curtas distâncias pela ação da água (SPÓSITO et al., 2011). Eles emergem através de um ostíolo do picnídio e são envolvidos por uma substância mucilagínosa. A água da chuva, do orvalho ou da irrigação dissolve essa mucilagem e ajuda na dispersão dos conídios a curtas distâncias. Essa dispersão é responsável pelo aumento da doença dentro na planta. Nas nossas condições, os conídios vêm se constituindo fonte adicional de inóculo, ao contrário de outros países onde a doença está presente, como a Austrália e a África do Sul (SPÓSITO et al., 2011). Os esporos germinam na superfície de órgãos suscetíveis produzindo apressório. Uma massa de micélio é formada a partir do apressório, que penetra através da cutícula e se desenvolve. Forma-se então uma massa de micélio entre a cutícula e a epiderme. Dessa forma, torna-se uma infecção quiescente, podendo se desenvolver e formar sintoma típico da doença na época de maturação do fruto, ou quando as condições ambientais tornam-se favoráveis (FEICHTENBERGER et al., 2011).

O tempo entre infecção e aparecimento de sintomas pode chegar a 12 meses. Em folhas caídas no solo, formam-se novos esporos sexuais do fungo, dando continuidade ao ciclo da doença (FUNDECITRUS, 2013; FEICHTENBERGER et al., 2005).

O patógeno pode causar lesões em frutos e ramos, pedúnculos e raramente em folhas (FEICHTENBERGER et al., 2005; SPÓSITO, 2006). Em frutos, diferentes tipos de sintomas estão associados à MPC (TIMMER et al., 2000):

1) mancha dura: é o sintoma mais comum da doença, as lesões aparecem quando o fruto atinge a maturação ou quando o ambiente é favorável à doença. Em frutos verdes, um halo amarelo aparece circundando as lesões, em frutos maduros, as lesões são circundadas por um halo verde e apresentam um centro deprimido de coloração marrom-claro e com bordos salientes de coloração marrom-escura. No centro das lesões aparecem pontuações negras, que constituem os picnídios. 2) falsa melanose: são lesões bem pequenas e numerosas, aparecem quando o fruto ainda é verde. Uma característica importante que diferencia a falsa-melanose dos demais sintomas é a ausência de picnídios na lesão. Esse tipo de sintoma forma-se em decorrência de uma reação da planta à infecção pelo patógeno. Acúmulo de compostos fenólicos ocorre próximo às células infectadas e um meristema de cicatrização instala-se abaixo dos pontos de infecção, impedindo a colonização e reprodução do patógeno (MARQUES et al., 2012). Recebe este nome por ser semelhante à melanose (*Diaporthe citri*). 3) mancha sardenta: são lesões levemente deprimidas e avermelhadas, que aparecem em frutos maduros ou frutos já colhidos. Podem se manter individualizadas ou coalescer e formar grandes lesões. 4) mancha virulenta: se desenvolvem no final da safra em frutos maduros. São resultantes da coalescência de lesões do tipo mancha dura e falsa melanose. Resultando em grandes lesões deprimidas de bordos marrom-escuro ou vermelho-escuro, no centro apresentam pontuações escuras, que correspondem aos corpos de frutificação (FEICHTENBERGER et al., 2011).

Além dos sintomas anteriormente descritos, no Brasil encontram-se também descritos os sintomas denominados mancha trincada (GÓES et al., 2000) e mancha rendilhada (FUNDECITRUS, 2005), podendo este último ser caracterizado como uma variante do sintoma de falsa-melanose (GÓES, 2001).

Mancha trincada: o sintoma está associado ao ácaro da falsa ferrugem *Phyllocoptruta oleivora* e aparece quando os frutos estão verdes, são lesões

superficiais, escuras, de tamanhos diferentes e sem corpos de frutificação. Mancha rendilhada: em geral ocorrem em frutos verdes, são lesões superficiais, com coloração alaranjada com o centro amarelo-marrom e marrom-escuro, não apresentam corpos de frutificação (FEICHTENBERGER et al., 2011).

A expressão dos sintomas de MPC é favorecida por vários fatores, dos quais o mais importante é a exposição dos órgãos infectados à radiação solar intensa e às altas temperaturas (FEICHTENBERGER et al., 2005). A doença não modifica a qualidade interna dos frutos (FAGAN & GÓES, 2000), podendo estes serem utilizados na produção de suco cítrico concentrado (AGUIAR-VILDOSO et al., 2002). Frutos cítricos infectados no campo podem expressar sintomas de MPC na pós-colheita e no período de transporte. (OEPP/EPPO, 2003).

Aspecto relevante no monociclo da doença que ainda não foi elucidado é a duração do período infeccioso, definido como o período de tempo em que a lesão permanece esporulando (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 2001). Essa variável está relacionada ao risco de frutos sintomáticos servirem de fonte de inóculo. Embora a legislação europeia de barreiras alfandegárias pressuponha que frutos sintomáticos sejam fonte de inóculo, a quantidade de esporos produzidos nos picnídios, o tempo de produção de esporos e sua viabilidade nunca foram quantificados.

2.2.3 Controle

Os métodos utilizados para a redução da MPC são: o controle químico aplicado no campo associado às práticas culturais (FEICHTENBERGER et al., 2005; SILVA-PINHATI et al., 2009) e a eliminação manual ou eletrônica de frutos sintomáticos em *packinghouse*.

A eficiência do controle químico é elevada quando o inóculo no campo e a incidência da doença são baixos (KLOTZ, 1978). Em situações de epidemias, o controle químico não assegura eficiência de 100 %. Nos *packinghouses*, frutos sintomáticos são retirados da linha de beneficiamento destinada ao mercado interno e são redirecionados a indústrias para o processamento de suco.

Para o controle químico é necessário pulverizar todos os talhões que apresentam sintomas, as aplicações são realizadas de duas a seis vezes no ano, a

partir da queda das pétalas das flores. As duas primeiras aplicações no pomar são realizadas com fungicidas cúpricos (sulfato de cobre, hidróxido de cobre, oxicleto de cobre e óxido cuproso), pois são também eficientes no controle de outras doenças como a verrugose e a melanose. Quando o florescimento se encerra em meses mais chuvosos, recomenda-se a utilização de produtos sistêmicos a partir da segunda aplicação (FUNDECITRUS, 2013).

As aplicações de fungicidas devem obedecer a intervalos recomendados, de três a quatro semanas para os cúpricos e de cinco a seis semanas para produtos sistêmicos (triazol + estrobilurina). A calda deve atingir partes internas das plantas como ramos, folhas e frutos, protegê-los da infecção. Em pomares mais velhos o volume de calda é superior, já que esses pomares apresentam uma incidência maior da doença. Para certificação de que a calda está atingindo o alvo desejado, é recomendado utilização de papéis hidrossensíveis no interior da copa das plantas (FUNDECITRUS, 2013).

Existem vários métodos para controlar a MPC no campo além do controle químico citam-se entre eles: manejo do mato com roçadeira ecológica, a roçadeira remove o mato na entrelinha e o deposita sobre as folhas caídas no chão nas linhas, esse método favorece a decomposição das folhas e impede a liberação de ascósporos (FEICHTENBERGER et al., 2005; ROSSETTO, 2009), esse mesmo princípio pode ser feito com a utilização de ureia ou nitrato de amônio. A antecipação da colheita é feita para evitar que os frutos fiquem expostos por muito tempo no campo ao inóculo. O uso de irrigação por gotejamento é utilizado para evitar acúmulo de água de irrigação nas folhas, já que os períodos de alternância de água nas folhas favorecem o desenvolvimento do patógeno.

2.2.4 Praga Quarentenária

Praga Quarentenária é definida como “Qualquer espécie, raça ou biótipo de vegetais, animais ou agentes patogênicos, nocivos para os vegetais ou produtos vegetais” de acordo com a Convenção Internacional Fitossanitária de 1997 (ZAMBOLIM & BASSANEZI, 2006).

As Pragas Quarentenárias podem ser divididas em duas categorias: Quarentenária A1 e Quarentenária A2.

As Pragas Quarentenárias A1 (ausente) são as que têm importância econômica potencial para uma área posta em perigo e não estão presentes na área. As Pragas Quarentenárias A2 (presentes) são as que têm importância econômica potencial para uma área posta em perigo, que ainda não tenham alcançado seus limites ecológicos (amplamente distribuída) e que estejam sendo controladas oficialmente (ZAMBOLIM & BASSANEZI, 2006).

A mancha preta dos citros (MPC) é considerada Praga Quarentenária A1 na União Europeia (UE), por não estar ainda presente em seus países membros. Para a comercialização de frutas cítricas para as Unidades da Federação, os frutos devem ser procedentes de pomares que estão no Sistema para o Manejo de Risco (SMR) da Praga Mancha Preta dos Citros (MPC), e com certificação de origem.

Não há tolerância dos países membros da EU a frutos com MPC. A detecção da doença em um único fruto acarreta o rechaço de todo o lote enviado, ficando assim impedido o desembarque em qualquer país da União Europeia. Portanto, uma rigorosa seleção de frutos no *packinghouse* faz-se necessária para evitar a exportação de frutos com sintomas de MPC. Trabalhos mostram que a incidência de MPC nos frutos do *packinghouse* de exportação foi decrescente em frutos analisados desde o início do processo até o final, chegando a nenhum fruto com sintoma no palete (FISCHER et al., 2008).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e os órgãos estaduais de Defesa Agropecuária estabeleceram um programa de manejo de risco da doença para atender as exigências dos países importadores europeus, publicadas na Instrução Normativa/MAPA nº 3 de 08/01/2008. Essas medidas consistem no cadastramento dos produtores, das unidades de produção (UP) e das casas de embalagem (*packinghouse*). A partir do cadastro feito, o pomar é acompanhado durante todo o ciclo de produção por um fiscal. O fiscal irá verificar se há incidência de frutos com MPC no pomar. Caso o fiscal encontre a doença, o pomar cadastrado é excluído do processo de exportação. Caso não seja detectada nas inspeções de campo, os frutos são amostrados na pré-colheita, em 1 % das plantas (um fruto/planta), e os frutos são encaminhados para laboratórios oficiais para realização do teste de indução de sintomas. Esse teste visa detectar o fungo presente no fruto, já que ele pode estar infectado e não causar sintomas, pois seu período de incubação pode chegar a 12 meses. Se o resultado do teste de indução

de sintomas for positivo, a UP correspondente é excluída do processo de exportação (DEFESA AGROPECUÁRIA, 2013).

2.3 *Packinghouse*

2.3.1 O que é um *packinghouse*?

Packinghouses são galpões de embalagem e processamento pós-colheita e são responsáveis pelo recebimento, higiene, limpeza e envio dos frutos aos centros distribuidores ou diretamente ao consumidor. Os *packinghouses*, na maioria dos casos, estão localizados estrategicamente para receber os frutos *in-natura* em pequeno intervalo de tempo entre a colheita e o recebimento, assim como processá-los e direcioná-los ao mercado consumidor.

A Região Sudeste tem uma capacidade instalada de beneficiamento de laranja *in-natura* de 70.820.00 caixas de 40,8 kg por safra, ou seja, 8.847.500 caixas de 40,8 kg por mês. A região citrícola Centro-Sul é a região que mais processa frutos entre as regiões citrícolas do Estado, totalizando 32.550.00 caixas de 40,8 Kg por safra ou 2.703.000 caixas de 40.8 kg por mês (CENSO, 2012).

Novos e sofisticados processos de beneficiamento realizados em modernos *packinghouses*, como o uso de softwares associados às imagens para eliminar frutos injuriados, não garantem a ausência da doença nos frutos destinados tanto ao mercado interno quanto ao mercado de exportação de frutas frescas, pois o aparecimento de alguns tipos de lesões pode ocorrer após o beneficiamento.

Embora trabalhos mostrem qual etapa do beneficiamento em *packinghouse* pode provocar danos aos frutos e mostrem levantamentos de outras doenças (FISCHER et al., 2009; 2011), a eficiência dos *packinghouses* na redução da MPC não é conhecida.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Avaliação da incidência e da severidade de MPC em lotes antes e após o beneficiamento em *packinghouse*

As avaliações de incidência e de severidade dos frutos foram realizadas quinzenalmente no *packinghouse* Alfa-Citrus, localizado em Engenheiro Coelho/SP, no período de abril de 2012 a maio de 2013.

2.4.1.1 *Packinghouse* ALFA-CITRUS

O *packinghouse* Alfa-Citrus recebe frutos provenientes de pomares localizados em Engenheiro Coelho, Mogi Mirim e Botucatu. O *packinghouse* entrega frutos durante todo o ano para o mercado; cerca de um milhão de caixas de frutos. Os frutos mais comercializados são das variedades 'Pera', 'Lima', 'Bahia', 'Natal', 'Valência', 'Rubi', 'Westin' e tangerinas 'Poncan', 'Cravo', 'Murcote' e 'Clemenures'.

Os pomares atendidos pelo *packinghouse* possuem sistema de irrigação, rastreabilidade e controle informatizado que permite saber como cada lote de laranjas e tangerinas estão sendo tratados. Após a colheita, os frutos são transportados do campo até o *packinghouse*. Nas máquinas do *packinghouse* os frutos passam por uma primeira seleção manual, na qual são retirados apenas os frutos podres, logo após, esses frutos são lavados com desinfestantes (hipoclorito de sódio), seguido de uma segunda seleção manual, na qual são retirados frutos impróprios para o comércio de frutas frescas. Ainda nas máquinas, os frutos são imersos em cera de carnaúba. Posterior a essa etapa, o fruto é classificado de acordo com o seu diâmetro, através de fotografias tiradas por máquinas eletrônicas. Em local isolado por barreira sanitária, o fruto é embalado em caixas ou pacotes e finalmente é distribuído diretamente para o cliente ou parceiros do *packinghouse*, como CEASA de Campinas e CEAGESP São Paulo (ALFACITRUS, 2013).

As Figuras 1 e 2 ilustram as etapas dos procedimentos realizados pelas máquinas do *packinghouse*, desde a chegada do lote até o produto final, fruto *in-natura*.

Figura 1 – Sequência do processo de beneficiamento pelo *packinghouse*, (A) caixas com os frutos na linha no início do beneficiamento, (B) primeira eliminação manual de frutos podres, (C) imersão em solução de hipoclorito de sódio, (D) esteiras para secagem por escorrimento da solução, (E) segunda eliminação manual de frutos doentes e/ou injuriados e (F), entrada na máquina de deposição de cera

Figura 2 – Continuação do processo de beneficiamento no *packinghouse*, (A) esteira após a deposição de cera, (B) terceira eliminação manual de frutos doentes e/ou injuriados, (C) mensuração do diâmetro do fruto por fotografias eletrônicas, (D) linha de separação por diâmetro do fruto, (E) saída dos frutos já classificados por diâmetro, (F) frutos processados e prontos para comercialização

2.4.1.2 Avaliações de incidência e de severidade da mancha preta dos citros

Em todas as avaliações, foram analisadas aproximadamente 20 caixas (engradados plásticos) de laranja doce (aproximadamente 22 kg cada). A variedade do fruto analisado era previamente escolhida de acordo com a demanda do mercado interno de frutas frescas do dia. O *packinghouse* segue as exigências do mercado interno de frutos, por essa razão as variedades de laranja analisadas durante os meses de avaliação eram dependentes da exigência diária dos frutos.

As 20 caixas de laranja foram escolhidas ao acaso, todos os frutos provenientes dos lotes são rastreados pelo *packinghouse*. Por esse motivo, são conhecidas informações do pomar, como por exemplo: idade do pomar, localização geográfica (latitude e longitude), espaçamento entre as plantas, chuva (mm), preço por caixa no dia que foi oferecido ao mercado, número total de pulverizações assim como o produto utilizado em cada lote.

Após escolhida a variedade de laranja e as 20 caixas do lote para análise, iniciou-se a primeira avaliação de incidência e de severidade antes do processamento pelas máquinas do *packinghouse*.

Todos os frutos provenientes do lote foram lavados em água corrente antes da avaliação. A lavagem foi feita com o auxílio de esponja para a remoção da sujeira presente. Após a lavagem, os frutos foram secos ao ar livre e em seguida a avaliação de incidência e de severidade da doença foi iniciada. O número mínimo de amostras de frutos sintomáticos dentro do lote foi estabelecido de acordo com duas metodologias: gráfico cumulativo da média e do desvio padrão e cálculo baseado em uma pré-amostra de acordo com a equação (KRANZ, 1988).

$$n = \ln(1-\alpha) / (\ln(1-P-2,58a))$$

Onde: n = número mínimo de amostra

α = nível de significância = 0,95

P = proporção da doença

a = erro padrão da média

Para o estabelecimento do tamanho da amostra, a severidade de MPC foi quantificada em 2500 laranjas provenientes de 20 engradados plásticos. Após

isso, foi calculada a média cumulativa da severidade e o desvio padrão correspondente a cada valor de média.

Para padronizar a avaliação de incidência e de severidade, foi estabelecido o critério de quantificar apenas as lesões típicas da MPC: mancha dura e mancha sardenta. Outros sintomas de MPC foram descartados nas avaliações, pois podem ser facilmente confundidos com outras doenças, pragas ou com danos mecânicos. Portanto, esses frutos de laranja com sintomas semelhantes à MPC, porém duvidosos a olho nu foram classificados como assintomáticos nas avaliações de incidência e de severidade.

A avaliação de incidência de MPC nas caixas foi realizada visualmente por quatro pessoas diferentes a cada avaliação. Os frutos dos lotes foram classificados como sintomáticos ou assintomáticos. Posteriormente, esse número era contabilizado para obtenção da incidência de MPC no lote. O valor da incidência de MPC nos frutos antes e após o beneficiamento foi transformado em porcentagem e calculado a partir do número inicial de frutos do lote. O procedimento para avaliação da incidência de MPC foi realizado da mesma forma após o beneficiamento.

A avaliação da severidade foi realizada por duas pessoas durante todas as avaliações. Utilizou-se uma escala diagramática (Figura 3) para avaliação da severidade (%) da mancha preta, pois a utilização de escala diagramática aumenta a precisão e a acurácia das estimativas da severidade (NUTTER et al., 1998).

A severidade foi quantificada em duas faces do fruto e a severidade final da doença no fruto foi calculada pela média das duas avaliações.

Figura 3 – Escala diagramática para avaliação da severidade (%) de MPC (SPÓSITO et al., 2004)

Após a avaliação de incidência e de severidade, todas as caixas analisadas com os frutos eram direcionadas ao beneficiamento normal do *packinghouse*. Para

isso, as máquinas eram interrompidas e eram processadas apenas as caixas do lote que eram analisadas. A paralização era necessária para que não houvesse mistura de frutos em análise e frutos que iriam para o mercado.

Após o beneficiamento, os frutos eram separados e a severidade era novamente quantificada. Assim, foram obtidos os valores de severidade antes e após o processamento do *packinghouse*, para posterior cálculo da sua eficiência.

2.4.1 Análise de dados

Para análise de dados, foi feito teste-t a 5 % de probabilidade para verificar se existe diferença significativa na redução da incidência e na redução de severidade entre as variedades 'Pera', 'Folha Murcha' e 'Valência'. Para isso, foi calculada a redução média da incidência para cada variedade analisada, posteriormente, as variedades foram comparadas duas a duas.

A partir dos dados de incidência e severidade obtidos, foi construído um gráfico de frequência nos intervalos de severidade da escala diagramática para os frutos analisados antes e após o processamento pelo *packinghouse*.

Para isso, os frutos provenientes da cada avaliação, separados por variedade, foram agrupados nos intervalos de severidade. O número total de frutos com MPC foram calculados em porcentagem, para assim facilitar a comparação entre as variedades. A porcentagem do número de frutos com MPC após o beneficiamento foi calculado em relação à soma de frutos mensurado antes do beneficiamento, para assim observar a redução do número de frutos.

Foi realizado o teste-t a 5 % de probabilidade para os valores de severidade após o beneficiamento em relação ao valor inicial de severidade. O cálculo foi feito para verificar se a diferença entre as severidades são significativas.

2.4.2 Frutos descartados pelo *packinghouse*

O levantamento do descarte de frutos com MPC no *packinghouse* foi realizado em uma sub-amostra do lote de laranja doce. A sub-amostra foi escolhida

ao acaso (aproximadamente 20 caixas de 22 kg cada) em um lote que apresentava incidência de MPC.

Os frutos no *packinghouse* passam por três etapas de descarte durante a passagem nas máquinas, todos os descartes são feitos manualmente. O primeiro descarte é realizado por dois funcionários e ocorre no início das máquinas, o critério de descarte são os frutos podres, esses frutos são direcionados ao lixo, não servindo para indústria de suco. O segundo descarte é feito após a imersão dos frutos em solução de hipoclorito de sódio, esse descarte é feito por quatro funcionários e tem como critério de eliminação frutos que apresentam imperfeições na casca, ou seja, frutos doentes ou danificados mecanicamente, nesta etapa, todos os frutos descartados são direcionados a uma esteira, para que sejam armazenados e posteriormente encaminhados à indústria de suco. O terceiro descarte segue os mesmos critérios do segundo descarte e apresenta a mesma finalidade.

Para a quantificação de frutos descartados no *packinghouse*, foram estabelecidos três critérios de classificação: 1) frutos danificados mecanicamente 2) frutos podres e 3) frutos com MPC. Em cada local de eliminação dos frutos foram colocados engradados plásticos e todos os funcionários da linha de beneficiamento foram informados a não descartar os frutos nas esteiras, mas sim nos engradados plásticos.

Após a passagem do lote pelas máquinas, os engradados plásticos com os frutos foram retirados do local e iniciou-se a contagem dos frutos classificando-os de acordo com os critérios estabelecidos. Esse procedimento foi realizado da mesma maneira em todos os dias de avaliação.

O levantamento de frutos descartados pelo *packinghouse* foi realizado no mês de fevereiro, março e abril de 2013. Para as duas primeiras avaliações a variedade foi 'Valência' e a última avaliação foi com a variedade 'Folha Murcha'.

2.4.3 Indução de sintomas de mancha preta dos citros

Após os frutos passarem pelo processamento normal do *packinghouse*, uma sub-amostra de 60 frutos foi escolhida. Entre eles, 30 frutos sintomáticos e 30 frutos assintomáticos de MPC, todos provenientes do mesmo lote. O critério de escolha dos frutos coletados foi frutos que apresentavam apenas sintoma de

mancha dura. A severidade e a incidência da MPC no lote foram quantificadas de forma semelhante à descrita no item 2.4.1.1 e 2.4.1.2

Para a indução de sintomas os frutos coletados no *packinghouse* foram levados ao laboratório do Instituto Biológico, localizado em Sorocaba/SP. A indução foi realizada com a colaboração do pesquisador Eduardo Feichtenberger.

Nesse processo, os frutos selecionados foram separados em grupos de 10 frutos e foram colocados em sacos rendilhados. Os frutos foram imersos por 5 minutos em solução de Ethrel (720 EC) e Imazalil (Magnate 500 EC). O Imazalil foi utilizado para evitar a infecção dos frutos por *Penicillium digitatum*, enquanto que o Ethrel foi utilizado para induzir o amadurecimento do fruto, favorecendo o aparecimento de sintomas latentes.

A solução final utilizada para 50 l de água continha 52 ml de Ethrel e 100 ml de Imazalil. Após a imersão, os frutos foram deixados à temperatura ambiente para secagem (Figura 4). Após a secagem, os frutos tratados foram incubados, por um período de 28 dias, à temperatura de 30°C, sob luz contínua. Os frutos foram virados 180° uma vez por semana para exposição homogênea dos dois lados do fruto à luz (Figura 5).

Após esse período, os frutos foram novamente avaliados para determinação da incidência e de severidade da doença na sub-amostra. A confirmação do diagnóstico foi feita via isolamento do fungo agente causal em meio de cultivo BDA. Outras possíveis podridões que apareceram durante a indução de sintomas também foram diagnosticadas por isolamento do patógeno.

O período de amostragem foi de outubro de 2012 a abril de 2013, os frutos foram coletados uma vez por mês e levados para a indução de sintomas. As variedades analisadas foram laranja 'Pera', 'Valência' e 'Folha Murcha'.

Figura 4 – Processo de indução de sintomas latentes da mancha preta dos citros: (A) imersão de laranjas em solução, de Ethrel + Imazalil (B) secagem ao ar livre após imersão

Figura 5 – Frutos armazenados em prateleiras a 30°C sob luz contínua, após a imersão em solução de Ethrel e Imazalil para indução de sintomas

2.4.5 Quantificação de picnídios em lesões novas de mancha sardenta

O Experimento foi realizado no Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba/SP. Foram utilizados 30 frutos coletados no *packinghouse* localizado na cidade de Engenheiro Coelho/SP.

Os frutos do experimento não receberam nenhum tipo de tratamento, apenas foram lavados com água corrente para remoção da sujeira proveniente do campo. Todos os frutos apresentavam sintomas de mancha dura.

Os frutos foram mantidos em três recipientes plásticos, constituindo três repetições do experimento com 10 frutos em cada repetição. Dentro dos recipientes, foi promovida a câmara úmida por meio de algodão umedecido com água destilada a uma temperatura de 25 °C. Os frutos foram mantidos nessas condições de armazenamento durante o seu tempo de prateleira, quando apresentavam contaminações eram descartados.

Os frutos foram avaliados diariamente até o aparecimento da primeira lesão de mancha sardenta. Essas lesões foram circuladas com marcadores de tinta permanente para não serem confundidas com outras lesões. O aparecimento do número de picnídios era acompanhado a cada dois dias. Para visualização dos picnídios foi utilizado estereomicroscópio.

2.4.6 Efeito de aplicação de cera de carnaúba e do fungicida Imazalil nos sintomas pós-colheita de mancha preta dos citros

O Experimento foi realizado no Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba/SP. Os frutos do experimento foram coletados no *packinghouse* localizado na cidade de Engenheiro Coelho/SP. O período de amostragem foi no mês de fevereiro de 2013, com a variedade ‘Valência’.

Foram selecionados 150 frutos sintomáticos com MPC com lesões de mancha dura, sendo que cada tratamento continha 50 frutos.

Três tratamentos foram realizados, com 50 repetições: (1) aplicação de cera de carnaúba, (2) aplicação de cera de carnaúba + fungicida Imazalil, (3) testemunha sem aplicação.

O tratamento 1 foi realizado pela imersão dos frutos na cera de carnaúba por 20 segundos a uma concentração de 12 % da cera. Após a imersão, os frutos foram deixados em ambiente ventilado para secagem. O tratamento 2 foi realizado pelas máquinas de beneficiamento do *packinghouse* Alfa-Citrus e consistiu na imersão dos frutos por 60 segundos na mistura de cera de carnaúba (12 %) + Imazalil (1000 ppm).

Após os tratamentos, todos os frutos foram levados à ESALQ/USP, e as manchas sardentas e mancha dura dos frutos foram circuladas com marcadores de tinta permanente para não serem confundidas com o aparecimento de novas lesões. Em seguida, os frutos foram colocados em recipientes plásticos (10 frutos por recipiente) e foi aspergida água destilada para formação da câmara úmida, foram mantidos a 25 °C e luz constante para favorecer o desenvolvimento da doença, essas condições foram mantidas durante todo o experimento. A cada quatro dias era contabilizado o aparecimento de novas lesões de mancha dura e de mancha sardenta nos frutos.

A contagem do número de picnídios na mancha dura previamente delimitada foi contabilizada a cada sete dias. As contagens foram feitas até o tempo útil dos frutos.

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Avaliação de incidência e severidade da mancha preta dos citros antes e após o beneficiamento em *packinghouse*

As variações da média cumulativa da severidade da doença e seu desvio padrão permitiram estabelecer a amostra mínima de 300 frutos para avaliação da severidade, que corresponde à estabilização das curvas. Pelo cálculo de n , a amostra mínima foi de 370 frutos. Por medida de segurança, estabeleceu-se 400 frutos como número mínimo de frutos sintomáticos para as avaliações (Figura 6).

Figura 6 – Média cumulativa da severidade e desvio padrão cumulativo da severidade de frutos sintomáticos avaliados no primeiro e tomados como referência

Exemplos de diferentes níveis da escala de severidade de MPC encontrados no *packinghouse* estão ilustrados na Figura 7.

Figura 7 – Frutos com sintomas de mancha dura em diferentes níveis de severidade: (A) 20 % (B) 12 % e (C) 0,5 % de severidade

As amostras coletadas no *packinghouse* tinham origem diversas, os pomares estavam localizados na região central do Estado de São Paulo, a idade dos pomares variava entre 5 a 24 anos e o espaçamento de 6,0 x 3,0 até 7,0 x 4,0 (Tabela 1).

Tabela 1 – Informações das Fazendas e Sítios de onde se localizam os pomares analisados durante 2012 e 2013

Fazendas ou Sítios	Representação	Latitude/Longitude	Espaçamento (m)	Idade do pomar (anos)
Fazenda Anhumas	FA	22°56'42.92"S/48°17'06.99"O	6,5 x 3,0	5
Fazenda Nossa Senhora Aparecida	FNSA	22°56'47.16"S/48°48'07.37"O	6,5 x 3,7	12
Fazenda São Pedro	FSP	22°54'51.38"S/48°43'44.15"O	7,0 x 4,0	24
Sítio Nova União	SNU	22°55'15.83"S/48°40'54.92"O	6,5 x 3,5	19
Sítio São Luiz	SSL	22°30'29.83"S/47°12'34.62"O	6,0 x 3,0	18

Para facilitar a imagem da localização das fazendas, foi construído um mapa com o auxílio do programa ArcGIS versão 10, utilizando as coordenadas geográficas (latitude e longitude) das fazendas (Figura 6). A Fazenda Anhumas (FA) está localizada a 20 km de Botucatu, a Fazenda Nossa Senhora Aparecida (FNSA), Fazenda São Pedro (FSP) e o Sítio Nova União (SNU) estão localizados a uma distância de aproximadamente 30 km de Botucatu. O Sítio São Luiz (SSL) é o local mais afastado dos outros pomares e está localizado na cidade de Engenheiro Coelho (Figura 8).

Figura 8 – Localização das Fazendas e Sítios dos frutos analisados ao longo de 2012 e 2013 no Estado de São Paulo

A incidência e a severidade da doença nos frutos foram avaliadas a partir de abril de 2012 até maio de 2013. Os valores de incidência de MPC antes do beneficiamento nas amostras dos lotes ao longo de 2012 e 2013 variaram de 0 a 66,08 %. Os valores mais altos e que se destacam dos outros valores foram 66,08 %, 64,65 %, 50,23, 49,48 e 43,81 %, todos para a variedade 'Valência', proveniente da FSP e do SSL, nos meses de outubro de 2012 para os dois primeiros valores e para os meses de janeiro, fevereiro e março de 2013 para os três últimos valores (Tabela 2). Levantamentos realizados em *packinghouse* com frutos destinados ao mercado interno mostram incidência média de MPC de laranja da variedade 'Pera' de 64,1 % (FISCHER et al., 2008).

Essa alta incidência pode ser atribuída à idade avançada do pomar, 18 anos para o SSL e 24 anos para a FSP. Pomares mais velhos acumulam na própria planta o inóculo para a doença. Além disso, a variedade 'Valência' é uma variedade tardia e assim apresenta um maior tempo de exposição do fruto ao inóculo da doença no campo (SPÓSITO et al., 2011).

No intervalo entre junho e setembro de 2012, os frutos mantiveram-se assintomáticos para a variedade 'Pera' que é de meia estação. Esse fato pode estar relacionado com a idade do pomar das fazendas. Os pomares da FA, apresentam 5 anos de idade, o que pode significar que esses pomares ainda estão livres da doença por serem relativamente novos. Apesar da diferença na incidência da doença, as variedades 'Pera' e 'Valência' apresentam o mesmo nível de suscetibilidade à mancha preta dos citros (SPÓSITO; BASSANEZI; AMORIM, 2004).

Os dados de incidência após o beneficiamento variaram de 0 a 57,12 % na amostra. Os maiores valores de incidência após o beneficiamento foram das mesmas amostras que apresentaram a maior incidência antes do beneficiamento, com exceção da avaliação do dia 10 de outubro (Tabela 2).

Em relação à severidade da doença, os valores variaram entre 0,19 a 1,31 %. As severidades mais altas foram de 1,31, 1,29, 1,12 e 1,1 % para as variedades 'Valência', 'Pera', 'Valência' e 'Folha Murcha', respectivamente (Tabela 2). Após o beneficiamento a severidade da doença variou entre 0,22 e 0,81 %. Os valores mais altos foram de 0,81 e 0,71 % para as variedades 'Folha Murcha' e 'Valência', respectivamente (Tabela 2). Os valores de severidade obtidos são menores quando comparados a valores de severidade realizados em avaliações rotineiras de campo, isso ocorre, pois no campo as notas de severidade são dadas a

face mais exposta aos raios solares, pois é neste local que há maior expressão dos sintomas da doença (KOTZÉ, 1981; 1988).

Foram obtidos diferentes valores de severidade da doença ao longo do ano, mesmo quando os frutos eram provenientes do mesmo pomar, isso está atrelado com a época de análise, pois diferentes fontes de inóculo são responsáveis pelo incremento ou não da doença na planta (SPÓSITO, 2011). Além disso, o manejo cultural em adição a o controle químico reflete na intensidade de sintomas de mancha preta em pomares cítricos (SCALLOPI et al, 2012) e os dois tipos de controle eram realizados nos pomares.

Alguns valores de severidade após o beneficiamento no *packinghouse* superaram os valores iniciais de severidade, como por exemplo, os valores 0,22 e 0,49 % nos dias 26 de abril e de 2012 e 16 de abril de 2013. Esse aumento da severidade pode ter ocorrido por erros dos avaliadores nas notas dadas para a severidade, já que as diferenças entre a severidade inicial e final são muito pequenas e insignificantes na escala de severidade.

A redução da incidência no lote apresentou valores mais altos nas variedades 'Valência' com 53,31 % e 'Pera' 50,50 %. Na média, excluindo os dias em que não houve incidência de frutos com MPC, a redução da incidência no lote foi de 25,02 % (Tabela 2).

As maiores reduções na severidade foram: 68,22 %, 67,06 %, 63,64 %, 59,74 % e 58,62 %. Na média, excluindo-se os valores em que a incidência foi zero, a redução da severidade nos lotes foi de 38,54 %.

Tabela 2 – Dados coletados durante os anos de 2012 e 2013. Indicando a data de avaliação, variedade analisada, localização dos pomares e os valores calculados de incidência e severidade antes e após o beneficiamento dos frutos pelo *packinghouse*

Data	Variedade	Fazenda ou Sítio	Incidência (%)		Severidade (%)		Redução da Incidência	Redução da Severidade
			Antes	Depois	Antes	Depois		
05/04/2012	'Pera'	FSP	19,6	19,2	0,87	0,36*	2,04	58,62
26/04/2012	'Folha Murcha'	SNU	3,68	2,17	0,19	0,22	41,03	-15,79
10/05/2012	'Pera'	FSP	27,27	13,5	1,29	0,41*	50,50	68,22
24/05/2012	'Folha Murcha'	SNU	1,12	0,61	0,85	0,28	45,54	67,06
31/05/2012	'Folha Murcha'	SNU	2,75	2,6	1,1	0,4*	5,45	63,64
21/06/2012	'Pera'	FA	0	0	0	0	0	0
28/06/2012	'Pera'	FA	0	0	0	0	0	0
12/07/2012	'Pera'	FA	0	0	0	0	0	0
27/07/2012	'Pera'	FA	0	0	0	0	0	0
08/08/2012	'Pera'	FNSA	0	0	0	0	0	0
22/08/2012	'Pera'	FA	0	0	0	0	0	0
06/09/2012	'Pera'	FNSA	0	0	0	0	0	0
10/10/2012	'Valência'	SSL	50,23	38,1	0,42	0,37*	24,15	11,90
17/10/2012	'Valência'	SSL	49,48	34,22	0,77	0,39*	30,84	49,35
30/10/2012	'Valência'	SSL	28,35	26,93	0,56	0,35*	5,01	37,50
13/11/2012	'Pera'	FSP	7,05	5,48	0,28	0,25	22,27	10,71
11/12/2012	'Valência'	FSP	38,02	25,21	1,01	0,48*	33,69	52,48
18/12/2012	'Valência'	FSP	51	23,81	0,77	0,31*	53,31	59,74
09/01/2013	'Valência'	FSP	66,08	44,44	0,87	0,51*	32,75	41,38
27/01/2013	'Valência'	FSP	29,68	24,68	0,47	0,32*	16,85	31,91
07/02/2013	'Valência'	FSP	43,81	36,62	1,12	0,55*	16,41	50,89
01/03/2013	'Valência'	FSP	64,65	57,12	1,31	0,71*	11,65	35,88
18/03/2013	'Valência'	FSP	32,55	19,89	0,67	0,54	38,89	19,40
16/04/2013	'Folha Murcha'	FNSA	7,38	4,86	0,44	0,49	34,15	-11,36
02/05/2013	'Folha Murcha'	SNU	1,24	1,02	0,93	0,81	17,74	12,90
16/05/2013	'Pera'	FA	0	0	0	0	0	0

(*) Valores estatisticamente diferentes em relação à severidade antes do *packinghouse* pelo teste-t a 5 % de probabilidade

Não houve diferença significativa entre as reduções médias de Incidência nas variedades 'Pera', 'Folha Murcha' e 'Valência' (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados calculados para o teste-t a 5 % de probabilidade para a comparação entre a redução média da incidência entre as variedades de laranja doce

Variedade	Redução média da Incidência	Desvio Padrão	Erro Padrão	t calculado	Comparação
'Pera'	24,935	24,336	14,050	-0,241	'Pera' x 'Folha Murcha'
'Folha Murcha'	28,782	16,774	7,501	-0,096	Folha Murcha' x 'Valência'
'Valência'	26,355	14,395	4,552	0,276	'Pera' x 'Valência'

Foi verificado pelo teste-t diferença significativa na redução média da severidade entre as variedades 'Folha Murcha' e 'Valência' (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados calculados para o teste-t a 5 % de probabilidade para a comparação entre a redução média da severidade entre as variedades de laranja doce

Variedade	Redução média da Severidade	Desvio Padrão	Erro Padrão	t calculado	Comparação
'Pera'	45,850	30,804	17,785	0,288	'Pera' x 'Folha Murcha'
'Folha Murcha'	39,104	30,334	15,167	0,558	'Folha Murcha' x 'Valência'
'Valência'	36,340	16,883	5,090	4,715*	'Pera' x 'Valência'

(*) Valores indicados indicam diferença estatística pelo teste-t a 5 % de probabilidade

As diferentes variedades de laranja amostradas mostraram semelhantes distribuições de frequências nas diferentes classes de severidade da mancha preta (Figura 8). A maioria dos frutos sintomáticos amostrados concentrou-se no intervalo de 0,5 – 1,7 % de severidade da doença, independentemente da variedade.

A eficiência do *packinghouse* na redução de frutos com MPC foi de 100 % a partir da severidade 11,6 % (Figura 9). Os frutos com alta severidade são facilmente visualizados na esteira das máquinas do *packinghouse*, assim são retirados manualmente nos pontos de seleção de frutos. No entanto, são os frutos com baixa severidade que predominam no lote e essa severidade não é detectada

nas esteiras, além disso, frutos com baixa severidade não limita a comercialização para o mercado interno.

Figura 9 – Frequência dos frutos com MPC em relação ao intervalo de severidade da escala diagramática antes e após o beneficiamento do *packinghouse*. As variedades referentes são: (A) 'Pera', (B) 'Folha Murcha' e 'Valência'

Em razão da semelhança das frequências de severidade de MPC nas diferentes classes, calculou-se a eficiência do *packinghouse* com as médias de todas as variedades agrupadas (Figura 10). Nota-se que a eficiência aumenta com o incremento na classe de severidade.

Figura 10 – Redução da incidência dos frutos com MPC em intervalos de severidade da escala diagramática. 1: 0,5-1,7; 2: 1,8-5; 3: 5,1-11,5; 4: 11,6-22; 5: 22,6-49 (%)

Observa-se que há uma relação entre a incidência da doença e a quantidade de chuva no mês relacionado (Figura 11). Sabe-se que a doença é favorecida pela alternância entre períodos de molhamento e seca, situação frequentemente observada nas estações chuvosas (KOTZÉ, 2000). Nessas condições há liberação ativa dos ascósporos e disseminação pelo vento (KIELY, 1948; KOTZÉ, 1963). Na superfície do hospedeiro e com a presença de água livre por um período de 15 h, os ascósporos podem infectar o hospedeiro por penetração direta, formando uma massa sub-cuticular. O fungo, permanece quiescente até o amadurecimento do fruto (McONIE, 1967; KOTZÉ, 2000). Além disso, é durante o período chuvoso que os conídios são dispersos, uma vez que a massa mucilaginosa é hidrossolúvel. As duas fontes de inóculo atuam, portanto, de forma aditiva na época chuvosa.

Trabalhos mostram que a incidência de frutos com MPC é menor em meses de inverno e crescente na primavera (FISCHER et al., 2008). Essa relação é verificada na Figura 11, onde os números de 6 a 10 representam as amostras analisadas no período de inverno, enquanto que os números 11 a 14 representam amostras analisadas no período da primavera.

Figura 11 – Incidência de MPC no lote e quantidade de chuva no mês de avaliação correlacionadas com os dias de avaliação

2.5.2 Frutos descartados pelo *packinghouse*

Observa-se que em todos os casos de análise houve descarte de frutos com MPC, de 16 a 87 % do total de frutos. Frutos podres também foram descartados e ficaram em patamares semelhantes nas três avaliações, de 12 a 14 % do total (Figura 12).

Os valores de frutos com danos mecânicos variaram nos três casos, na primeira avaliação apresentou um total de 41 %, na segunda avaliação não houve descarte para esse critério, ambos para a variedade 'Valência'. Para a terceira e ultima avaliação foi descartado um total de 69 % dos frutos (Figura 12).

No *packinghouse*, os frutos descartados com danos mecânicos e com MPC, são direcionados às indústrias de suco, representando na média, um total de 86 % dos frutos descartados. Os frutos podres, não são aproveitados pelas indústrias e são direcionados ao lixo.

Figura 12 – Frutos descartados pelo packinghouse, com três critérios pré-estabelecidos e analisados em duas variedades de laranja doce “Valência” e “Folha Murcha”: frutos com mancha preta dos citros (barras negras), frutos podres (barras rachuradas), frutos com danos mecânicos (barras brancas)

Na Figura 12, estão relacionadas a incidência e a severidade de MPC antes do beneficiamento (lote inteiro avaliado) em relação à porcentagem de frutos descartados com MPC pelo *packinghouse*. Observa-se que com o aumento da incidência (Figura 13A) e da severidade (Figura 13B) no lote o descarte de frutos com MPC pelo *packinghouse* também aumenta.

Figura 13 – Incidência e severidade média de mancha preta dos citros antes do beneficiamento relacionados com a taxa de descarte de frutos com MPC no packinghouse

2.5.3 Indução de sintomas

2.5.3.1 Frutos sintomáticos

Os frutos sintomáticos apresentaram aumento na severidade durante a indução de sintomas. Esse aumento, na média, foi de 26,9 % para a variedade 'Valência', 7,4 % para a variedade 'Pera' e 3,44 % para a variedade 'Folha Murcha'. A variedade 'Pera' é meia estação, enquanto que a variedade 'Valência' e 'Folha Murcha' são tardias. As variedades 'Pera' e 'Valência' possuem o mesmo nível de susceptibilidade à mancha preta dos citros (SPÓSITO et al., 2004).

A severidade dos frutos no lote do *packinghouse* antes da indução de sintomas e a severidade dos frutos após a indução de sintomas foram relacionados (Figura 14).

O maior aumento relativo foi na amostra 1 (90% da severidade) seguido da amostra 5 (23,28 %) e da 3 (de 20,9 %). As outras avaliações tiveram um pequeno aumento (amostras 2 e 7) ou mantiveram a severidade inicial (amostras 4 e 6).

Figura 14 – Severidade da mancha preta dos citros (%) de frutos sintomáticos avaliados antes e após a indução de sintomas: severidade dos frutos antes da indução de sintomas (barras negras), severidade dos frutos após a indução de sintomas (barras rachuradas). Amostra 2 representa a variedade 'Pera', amostra 7 representa a variedade 'Folha Murcha' enquanto que as demais amostras 1, 3, 4, 5 e 6 representam a variedade 'Valência'

Não foi constatada correlação entre a severidade de MPC antes do beneficiamento e o aumento da severidade dos frutos após a indução de sintomas

(Figura 15A). Também não foi constatada correlação entre a incidência no lote e o aumento da severidade dos frutos após a indução de sintomas (Figura 15B).

Figura 15 – Relação entre a severidade de mancha preta dos citros antes do beneficiamento com o aumento da severidade após a indução de sintomas (A) correlação entre a incidência de MPC antes do beneficiamento e o aumento da severidade após a indução de sintomas (B)

A visualização dos sintomas após o tratamento com Ethrel pode ser dificultada pelo crescimento de outras colônias de fungos contaminantes ou o apodrecimento dos frutos, por essa razão a mensuração de novos sintomas de MPC pode ter sido subestimada nas avaliações de severidade após a indução. Embora as amostras fossem desinfestadas antes da indução de sintomas com fungicida Imazalil, a incidência de fungos contaminantes ao final da indução de sintomas era presente em todas as avaliações. A incidência de populações de *Cladosporium* e *Penicillium* já foi reportada nas máquinas e nas instalações de *packinghouses*, além disso, populações de *P. digitatum* resistentes ao fungicida imazalil também foram detectadas (FISCHER, 2009).

Quinze frutos sintomáticos da variedade 'Valência' antes e após a indução de sintomas estão apresentados, a título de ilustração na Figura 16.

Figura 16 – Frutos da variedade ‘Valência’ antes (A) e após (B) a indução de sintomas latentes de mancha preta dos citros. Setas nas figuras representam manchas sardentas que apareceram após a indução de sintomas

2.5.3.2 Frutos assintomáticos

Na maioria das avaliações, as amostras assintomáticas apresentaram sintomas de mancha sardenta ou mancha dura após a indução de sintomas, num total de 57 % do total de amostras.

Não houve correlação entre a incidência de frutos com MPC após a indução dos sintomas e a incidência e a severidade da doença no lote antes do beneficiamento nesse experimento (Figura 17). Embora, trabalhos mostrem que maiores aumentos de incidência da MPC foram observados quando a incidência inicial era maior (FISCHER et al., 2008).

Figura 17 - Relação entre a incidência de mancha preta dos citros após a indução de sintomas com a incidência de MPC no lote analisado (A) correlação entre a incidência de MPC após a indução de sintomas e a severidade de MPC no lote analisado

Nos meses de março e abril de 2013, frutos processados no *packinghouse* apresentaram elevada incidência de *Penicillium digitatum*. Uma alta incidência do fungo foi detectada em engradados plásticos, frutos e nas máquinas do *packinghouse* (dados não apresentados). Esse problema se refletiu no processo de indução de sintomas realizados no APTA-Sorocaba, por essa razão, os resultados desses meses foram limitados devido à alta incidência do fungo. Embora os frutos tenham sido tratados com o fungicida Imazalil, isolados resistentes ao fungicida já foi relatado (FISCHER et al., 2011). Além do *P. digitatum*, outras doenças pós-colheita ocorreram durante o experimento foram podridões peduncular de lasiodiplodia e podridões de *Cladosporium*. Essas podridões já foram reladas com alta incidência na pós-colheita em frutos provenientes de pomares convencionais (FISCHER et al., 2011).

Os patógenos dos frutos contaminados foram isolados e identificados na APTA. Na Figura 18, são ilustrados alguns frutos contaminados comprometendo as amostras. Além do bolor verde, outras doenças também comprometeram a amostra.

Figura 18 - Presença de frutos com podridões pós-colheita em dois lotes de laranjas com sintomas de mancha preta dos citros provenientes do *packinghouse*. As podridões manifestaram-se durante a incubação dos frutos após o tratamento com Ethrel + Imazalil para indução de novos sintomas de mancha preta dos citros

2.5.4 Quantificação de picnídios em lesões novas de mancha sardenta

Na média das três repetições, os primeiros picnídios apareceram em cinco dias, porém o intervalo de tempo para o aparecimento de picnídios nas manchas sardentas variou de 2 a 18 dias. O número máximo de picnídios

encontrado em uma única lesão foi de 52. Porém, na média dos experimentos, cada lesão produziu 8 picnídios em um período de 38 dias.

Não foi verificado um padrão de produção dos picnídios em manchas sardentas, pois houve grande variação entre as repetições (Figura 19).

Figura 19 – Número cumulativo de picnídios por mancha sardenta durante incubação dos frutos. Cada ponto do gráfico representa a média de três repetições com 10 frutos cada repetição. Barras representam o erro padrão da média

Algumas situações que ilustram essa variação estão descritas a seguir. Há lesões que se desenvolvem e formam poucos picnídios. Em um dos frutos, acompanhado por 38 dias, o desenvolvimento dos picnídios se estabilizou no 18º dia e a partir de então, não houve aumento desse número.

Em outra lesão acompanhada 4 picnídios apareceram no 5º após a lesão de mancha sardenta, no 8º dia um novo picnídio foi detectado, e finalmente no 24º dia de avaliação foi mensurado 20 picnídios na mesma lesão, mantendo-se esse número de picnídios até o final do experimento.

Em outra lesão os 4 primeiros picnídios apareceram no 5º dia após a lesão de mancha sardenta. Outros 2 picnídios apareceram no 9º dia após o aparecimento da lesão. O total de 6 picnídios foi mantido até o final do experimento, 38 dias (Figura 20).

Figura 20 - (A) Primeiro dia de avaliação, lesão do tipo mancha sardenta sem picnídios, (B) 4 picnídios no 5º dia de avaliação, (C) 6 picnídios no 9º dia de avaliação

Os frutos permaneceram no experimento por um período de aproximadamente quarenta dias. Os frutos eram descartados semanalmente devido a contaminações. As principais doenças encontradas foram: bolor verde (*Penicillium digitatum*) e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). Todos os frutos apresentaram incidência de podridões causadas por fungos, o que limitou o experimento a quarenta dias. Essas contaminações já eram esperadas já que são comuns devido a danos pós-colheita (FISCHER et al., 2007).

2.5.5 Efeito de aplicação de cera de carnaúba e do fungicida Imazalil nos sintomas pós-colheita de mancha preta dos citros

O aumento cumulativo na quantidade de manchas sardentas nos frutos submetidos aos tratamentos com cera, com cera e imazalil e no tratamento controle está representado na Figura 25. No dia do tratamento (0), está contabilizado o total de mancha sardenta que já estava presente no fruto, a partir de então (dia 4), foram contabilizadas apenas as novas manchas dos frutos. Observa-se que no início do aparecimento dos sintomas, todos os frutos apresentavam quantidade similar de doença (entre 20 e 40 novas manchas por frutos, dados cumulativos), porém a partir do 7º dia de avaliação, o aumento no número de lesões foi distinto, mais rápido no tratamento controle (coeficiente angular da reta de 6,4 lesões novas/dia) e mais lento no tratamento com cera+imazalil (coeficiente angular da reta 1,8 lesões novas/dia) (Figura 21).

A cera de carnaúba já foi apontada com efeitos inibitórios de germinação *in vitro* de *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer*. *In vivo*, resultados mostram que a cera inibiu 50 % da germinação de esporos de *M. fructicola* e 90% da

germinação de esporos de *R. stolonifer* na superfície de nectarinas tratadas com a cera, reduzindo assim a incidência dessas doenças em frutos. Nesses casos indicados, a cera foi utilizada com o princípio protetor (GONÇALVES, 2010).

No caso deste experimento, a cera foi utilizada com princípio curativo, já que a infecção por *P. citricarpa* ocorre no campo e permanece latente nos frutos. A cera é aplicada no tratamento pós-colheita pelas máquinas do *packinghouse*, porém, mesmo com o princípio curativo, a cera de carnaúba reduziu significativamente a incidência de novas manchas sardenta nos frutos avaliados, quando comparadas ao tratamento controle.

O tratamento com cera e com fungicida foi o tratamento mais eficiente para o controle do aparecimento de mancha sardenta. A aplicação de cera nos frutos é feita durante todos os meses no ano, já a aplicação de cera e fungicida imazalil é realizada apenas períodos chuvosos pelo *packinghouse*. Nesses meses chuvosos, a incidência de podridões ocasionadas por fungos pós colheita é maior do que em meses com períodos de seca.

Figura 21 – Aumento do número de mancha sardenta em frutos com diferentes tratamentos em função do tempo (dias). Cada ponto no gráfico representa a média de lesões da mancha sardenta em um total de cinquenta frutos. Retas e equações representam a regressão linear dos pontos

Houve diferença estatística entre as taxas de progresso da doença nos três tratamentos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação entre a taxa de progresso da doença nos aparecimento de mancha sardenta nos três tratamentos

	t calculado	Taxa de progresso
Frutos sem tratamento	5,10006	6,468 a
Frutos tratados com cera	6,86309	4,0835 b
Frutos tratados com cera e com fungicida	10,9099	1,8533 c

A título de exemplo, sintomas de mancha sardenta de frutos submetidos aos 3 tratamentos estão ilustrados na Figura 22.

Figura 22 - Novas manchas sardentas estão indicadas pelas setas, (a e b), frutos do tratamento controle e (c) frutos do tratamento com cera.

Houve correlação entre a média de manchas duras no primeiro dia de avaliação e a média de manchas sardentas no ultimo dia de avaliação, ou seja, quanto maior a severidade de mancha dura inicial no fruto, maior será a severidade final de mancha sardenta (Figura 23).

Figura 23 – Correlação entre o número de mancha dura inicialmente avaliada e a média cumulativa do número de mancha sardenta avaliada no final do experimento

O aumento do número de picnídios a partir de uma lesão de mancha dura já existente nos frutos também foi mensurado durante todo o experimento. Não houve aumento do número de picnídios em várias lesões de mancha dura ou o aumento desse número de picnídios não foi significativo, independentemente do tipo de tratamento.

Isso pode ser decorrente da idade avançada das lesões. Os frutos trazidos do campo já apresentavam lesões aparentemente velhas de mancha dura e todas as lesões já continham picnídios.

O período de avaliação foi de 26 dias, devido a contaminações e/ou podridões ocorridas durante o período do experimento, várias causas eram detectadas, mas principalmente *Penicillium digitatum*, causador do bolor verde e *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose (Figura 24).

Figura 24 - Frutos contaminados com (A) bolor verde e (B) antracnose

3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que o *packinghouse* é capaz de reduzir a incidência de mancha preta dos citros no lote em até 53 %, enquanto que a redução da severidade do lote com mancha preta chegou a 68,2 %. Nota-se que a eficiência do *packinghouse* na eliminação de frutos aumenta com o incremento da severidade.

Os frutos com mancha preta dos citros descartados pelo *packinghouse* apresentaram correlação com a incidência e a severidade inicial do lote. À medida que aumenta a incidência e a severidade do lote, a taxa de descarte pelo *packinghouse* também aumenta.

O intervalo de tempo para o aparecimento de picnídios variou de 2 a 18 dias a partir do aparecimento da mancha sardenta. Na média dos experimentos, cada lesão produziu 8 picnídios em um período de 38 dias.

A aplicação de cera de carnaúba e do fungicida imazalil em frutos apresentou a menor taxa de progresso da doença, seguido dos tratamentos: cera de carnaúba e controle.

REFERÊNCIAS

AGUIAR-VILDOSO, C.I.; RIBEIRO, J.G.B.; FEICHTENBERGER, E.; GOES, A. ; SPÓSITO, M.B. **Manual Técnico de Procedimentos da Mancha Preta dos Citros**, Brasília, 2002. 72p.

AGRIANUAL 2012. **Mercados & Perspectivas**. Anuário da Agricultura. São Paulo: FNP 2012. p. 257-284.

ALFACITRUS. Disponível em: <<http://www.alfacitrus.com.br/>>. Acesso em: 26 out. 2013.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: consequências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 26, p. 119-127, 2001.

CARDOSO FILHO, J.A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Ptylosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. 145p. (Tese de Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2003.

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; ARLEU, R.J.; AGUIAR-VILDOSO, C.I. Ocorrência da pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no Estado do Espírito Santo, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, p. 205, 2003.

DEFESA AGROPECUÁRIA. Disponível em: <http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/www/programas/index.php?action=view&cod=52&ar=2&nm=Sanidade%20Vegetal>>. Acesso em: 31 out. 2013.

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

FAGAN, C.; GÓES, A. Efeito da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutos de laranja ‘Natal’ e ‘Valência’. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 26, n.1, p.122, 2000.

FEICHTENBERGER, E. Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, p. 93-108, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: Ceres, 1997. cap. 25, p. 261-296.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE, J. Doenças dos citros (*Citrus spp.*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agrômomica Ceres, 2005. v. 2, p. 475-476.

FISCHER, I.H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Caracterização de danos pós-colheita em citros procedentes de "packinghouse". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 304-310, 2007.

FISCHER, I.H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S.A.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L. Incidência de mancha preta em frutos cítricos em diferentes etapas de beneficiamento em *packinghouses* e na CEAGESP SP. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 326-330, 2008.

FISCHER, I.H.; LOURENÇO, S.A.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L. Characterisation of the fungal population in citrus packing houses. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, p. 449-460, 2009.

FISCHER, I.H.; ZANETTE, M.M.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em laranja 'Valência' e caracterização da população fúngica em pomares orgânicos e convencionais. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 390-399, 2011.

FUNDECITRUS. **Manual de pinta preta**. Araraquara: Fundecitrus, 2005. 7p.

FUNDECITRUS. **Fundo de defesa da Citricultura**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pintapreta/12>> Acesso em: 26 out 2013.

GÓES, S.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência de mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) em pomares cítricos do estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 73-75, 1993.

GÓES, A.; BALDASSARI, R.B.; FEICHTENBERGER, E.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; SPÓSITO, M.B. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Orlando, p. 1001-1002, 2000.

GÓES, A. de. Mancha preta dos citros: Situação atual e perspectivas futuras. **Ciência & Prática**, Lavras, v.1, n.1, p. 5-7, 2001.

GONÇALVES, F.P.; MARTINS, M.C.; JUNIOR, G.J.S.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Postharvest control of brown rot and Rhizopus rot in plums and nectarines using carnauba wax. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 58, p. 211-217, 2010.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* and its relation to black spot of citrus. **Proceeding of the Linnean Society of New South Wales**, v. 93, p. 249-292, 1948.

KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial and nonparasitic disease and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.) **The Citrus Industry** Davis: University of California, 1978. v.4. p. 1-66.

KOTZÉ, J.M. **Studies on the black spot disease of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely with particular reference to its epiphytology and control at Lebata**. 1963. (PhD thesis) University of Pretoria, Pretoria, South Africa; 1963.

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

KOTZÉ, J.M. Black spot. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of Citrus Diseases**, Saint Paul, p. 10-12, 1988.

KOTZÉ, J.M. Black spot. In: TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. (Ed.). **Compendium of Citrus Diseases**, Saint Paul, 2000. p. 23-25.

KRANZ, J. Measuring Plant Disease. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. **Experimental Technique in Plant Disease Epidemiology**, Berlin, p. 35-50, 1988.

MARQUES, J.P.R.; SPÓSITO, M.B.; MELLO, A.F.S.; AMORIM, L.; MONDIN, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Histopathology of black spot symptoms in sweet oranges. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, p. 439-448, 2012.

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.

NUTTER Jr., F.W.; MILLER, D.L.; WEGULO, S.N. Do standard diagrams improve the accuracy and precision of disease assessment?. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7., 1998. **Proceedings...** Edinburgh, v.2, p.2.1.16, 1998.

OEPP/EPPO. Diagnostic protocols for regulated pests. *Guignardia citricarpa*. **Bulletin of The Oepp/Eppo**, Paris, v. 33, p. 271-280, 2003.

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L. A mancha preta dos citros causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 455, 1980.

ROSSETO, M.P. **Resistência varietal e manejo de mancha-preta dos citros**. 2009. 65p Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical, Tecnologia de Produção Agrícola) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2009.

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

SCHUMBER, 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.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; GÓES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. **Mancha Preta dos Citros: epidemiologia e manejo**. 30, n. 1/2, p. 45-64, 2009.

SILVA, S.X.B.; SANTANA, O.S.; NUNES, C.C.S.; FERREIRA, R.G.; SANTOS-FILHO, H.P.; VILDOSO, C.I.A. Serviço de defesa agropecuária da bahia relata primeira ocorrência de *Guignardia citricarpa*. **Tropical Plant Pathology**, In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Manaus, 2012.

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.

SPÓSITO, M.B. Mancha ou pinta-preta dos citros. In: ZAMBOLIM, L.; BASSANEZI, R.B. (Ed.). **Doenças quarentenárias dos citros**. Viçosa, p. 93-108, 2006.

SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M, R.: CZERMAINSKI, A. B.C. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 31, p. 1546-1552, 2011.

TIMMER, L.W. Disease of fruit and foliage. In: TIMMER, L.W. ; DUNCAN, L.W. (Ed.) *Citrus health Management*, Saint Paul, p. 107-115, 1999.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of Citrus Diseases**. 2nd . ed. Saint. Paul: APS Press, 2000. 92p.

ZAMBOLIN, L.; BASSANEZI, R. B. **Doenças Quarentenária dos Citros**. Viçosa:Universidade Federal de Viçosa,2006. 194p.