

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

**Caracterização do *mating type*, otimização na produção de ascósporos e influência da temperatura e molhamento na germinação de esporos de *Phyllosticta citricarpa***

**Leonardo Aparecido Brandão da Silva**

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

**Piracicaba  
2022**

**Leonardo Aparecido Brandão da Silva**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Caracterização do *mating type*, otimização na produção de ascósporos e efeito da temperatura e molhamento na germinação de esporos de *Phyllosticta citricarpa***

Orientador:  
Dr. **GERALDO JOSÉ DA SILVA JUNIOR**

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

**Piracicaba**  
**2022**

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

Silva, Leonardo Aparecido Brandão

Caracterização do *mating type*, otimização na produção de ascósporos e efeito da temperatura e molhamento na germinação de esporos de *Phyllosticta citricarpa* / Leonardo Aparecido Brandão da Silva - - Piracicaba, 2022.

72 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Citrus* spp. 2. *Mating type* 3. Mancha preta dos citros 4. Inóculos I.  
Título

*Ao meu tio, João Bosco Brandão (in memoriam). Sem seu apoio, não teria chegado até aqui.*

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e força, que não me permitiram desistir do meu sonho de me tornar um grande cientista e continuar minha jornada mesmo nas tempestades.

À minha família, em especial aos meus pais, Sebastião e Raimunda, meus irmãos, Jorge, Elício, Malú e Marinete, primos e tios, que sempre acreditaram em mim.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Geraldo José da Silva Junior, por todo o conhecimento compartilhado, dedicação e paciência que teve comigo na orientação dos meus passos e por servir como uma referência de pesquisador para mim.

À Rosana Gonçalves, pela ajuda durante toda a execução dos experimentos e momentos bons no Fundecitrus, bem como a toda equipe de Doenças Fúngicas (Rafaele, Aline, Fabiano, David e Mateus) e demais funcionários do Fundecitrus, pelo companheirismo e apoio durante a condução dos experimentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Amorim, pela coorientação e ensinamentos passados durante toda essa jornada.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) pelo suporte técnico e financeiro.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, onde foram realizadas as fotos no MEV, que obtivemos com a ajuda de Manoel, Silvia e Gleice, amigos do laboratório de epidemiologia

Ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP por conceder o espaço físico e intelectual para a realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro durante 24 meses do mestrado.

À minha namorada, Yajahaira, que me deu momentos de alegria e diversão e me ajudou em momentos difíceis.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia e do Laboratório de Epidemiologia (Ana Laura, Ana Botelho, Daiana, Fernanda, Jéssica e Lorraine), pelo companheirismo, momentos bons e ajuda durante esse tempo.

Ao setor de assistência social da ESALQ, que permitiu minha moradia na vila estudantil da pós-graduação, uma vez que apenas com a bolsa não seria possível cobrir todas as despesas durante o mestrado.

A todos os amigos de Piracicaba, da pós-graduação e também da graduação, e aos amigos distantes que mantiveram contato comigo durante esse período, em especial o Prof. Dr. Alexandre Capucho, da UNIVASF, que me introduziu na Fitopatologia.

*“A nossa maior glória não reside no fato  
de nunca cairmos, mas sim em  
levantarmo-nos sempre depois de cada  
queda.”*

Oliver Goldsmith

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.1. Cultura dos citros.....	11
1.2. Histórico da pinta preta dos citros.....	12
1.3. Etiologia e epidemiologia da pinta preta dos citros.....	13
1.4. Manejo da pinta preta dos citros.....	16
1.5. Objetivos.....	18
Referências.....	18
2. CARACTERIZAÇÃO DO <i>MATING TYPE</i> E OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ASCÓSPOROS DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> .....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	26
2.1. Introdução.....	26
2.2. Material e Métodos.....	29
2.2.1. Obtenção e seleção dos isolados de <i>P. citricarpa</i> .....	29
2.2.2. Identificação dos <i>mating type</i> .....	30
2.2.3. Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de ascósporos.....	31
2.2.4. Produção de ascósporos sob diferentes temperaturas.....	33
2.3. Resultados.....	33
2.3.1. Identificação e frequência do <i>mating type</i> de isolados de <i>P. citricarpa</i> no estado de São Paulo.....	33
2.3.2. Produção de ascósporos em diferentes meios de cultivo.....	35
2.3.3. Produção de ascósporos em diferentes temperaturas.....	38
2.4. Discussão.....	41
Referências.....	45
3. GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E PERÍODOS DE MOLHAMENTO E PATOGENICIDADE DE ASCÓSPOROS E CONÍDIOS DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> EM FRUTOS.....	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
3.1. Introdução.....	52

3.2. Material e Métodos.....	54
3.2.1. Obtenção e seleção dos isolados de <i>P. citricarpa</i> .....	54
3.2.2. Preparo da suspensão de conídios.....	55
3.2.3. Germinação de conídios de <i>P. citricarpa</i> em diferentes temperaturas e períodos de molhamento.....	55
3.2.4. Caracterização de sintomas de pinta preta em frutos de laranja doce inoculados com ascósporos e conídios.....	57
3.3. Resultados.....	58
3.4. Discussão.....	63
Referências.....	66
APÊNDICE.....	69



## RESUMO

### Caracterização do *mating type*, otimização na produção de ascósporos e efeito da temperatura e molhamento na germinação de esporos de *Phyllosticta citricarpa*

A pinta preta dos citros, causada por *Phyllosticta citricarpa*, possui dois tipos de inóculo: os ascósporos e os conídios. Os ascósporos são disseminados pelo vento e mais relacionados com a introdução da doença em novas áreas e os conídios disseminados por água, mais associados com o incremento da doença na copa das plantas. Apesar da importância dos ascósporos no ciclo da pinta preta, pesquisas com esse inóculo são escassas devido à dificuldade de produzi-los. Em 2017, um protocolo de produção de ascósporos *in vitro* por meio de cruzamentos de isolados de *mating type* compatíveis foi publicado. Assim, se tornou possível estudar os fatores que influenciam na produção e germinação de ambos os esporos. Esse estudo foi conduzido com o objetivo de: i) determinar a frequência dos dois *mating type* de isolados de *P. citricarpa* obtidos do parque citrícola paulista (SP); ii) quantificar a produção de ascósporos em diferentes meios de cultivo e temperaturas; iii) avaliar o efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento sobre a germinação de conídios e iv) caracterizar sintomas de pinta preta em frutos de laranja doce inoculados com conídios e ascósporos. O *mating type* de 137 isolados de *P. citricarpa* obtidos de 1998 até 2021 foi identificado por meio da PCR duplex. A produção de ascósporos de cinco cruzamentos de *MATI-1* e *MATI-2* foi avaliada em meios de cultivo BDA, ½ BDA, extrato de malte ágar (EMA), aveia ágar e citros ágar. O meio BDA foi selecionado para avaliar a produção de ascósporos de três cruzamentos nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30°C. Os ascósporos foram quantificados semanalmente até 56 dias após os cruzamentos. A germinação de conídios foi avaliada em diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C) e períodos de molhamento (12, 24, 36 e 48 horas). Frutos de laranja ‘Valência’ foram inoculados com 10<sup>3</sup> conídios ou ascósporos e os sintomas de pinta preta foram caracterizados durante 360 dias. A proporção do *MATI-1* e *MATI-2* foi significativamente similar a 1:1 em SP. Ascósporos foram produzidos em meio BDA, ½ BDA e EMA, com pico de produção de 10<sup>4</sup> ascósporos/mL no BDA e EMA até 21 dias. Os ascósporos foram produzidos nas temperaturas de 15°C, 20°C e 25°C, com picos de 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> e 10<sup>3</sup> ascósporos/mL aos 42-49, 35 e 21 dias para as três temperaturas, respectivamente. A produção de ascósporos foi similar para todos os cruzamentos testados. O modelo beta-monomolecular foi ajustado aos dados de germinação de conídios em diferentes temperaturas e molhamentos. Os conídios germinaram de 9°C a 40°C com pico em 25°C e pelo menos 36 horas de molhamento. Os frutos inoculados com conídios e ascósporos apresentaram sintomas de falsa melanose e mancha dura. Esse estudo mostra que a os ascósporos podem ser formados em todas as regiões de SP, a produção desses esporos pode ser afetada por diferentes fatores *in vitro* e eles são patogênicos em laranja e os resultados serão úteis para direcionar futuros trabalhos relacionados com epidemiologia e manejo da pinta preta com o uso dos dois tipos de inóculo do patógeno.

Palavras-chave: *Citrus* spp.; *Mating type*; Mancha preta dos citros; Inóculos.

## ABSTRACT

### **Mating type characterization, ascospores production optimization and effect of temperature and wetness period on germination of *Phyllosticta citricarpa* spores**

Citrus black spot (CBS), caused by *Phyllosticta citricarpa*, has two types of inoculum: ascospores and conidia. Ascospores are spread by wind and associated to the disease introduction in CBS-free areas, while conidia are spread by water and related to the increase of CBS in the tree canopy. Despite ascospore importance in CBS cycle, there are few studies with them due to the difficulty to produce ascospores. In 2017, a protocol was developed to produce ascospores *in vitro* through crosses among isolates from compatible mating type. Thus, factors that influence the production and germination of both spores may be studied. This study aimed to: i) determine both mating type frequency of *P. citricarpa* isolates obtained from São Paulo citrus belt (SP); ii) quantify ascospores production in different culture media and temperatures; iii) assess the effect of different temperatures and wetness periods on conidial germination, and iv) characterize CBS symptoms on sweet orange fruit inoculated with conidia and ascospores. The mating type of 137 *P. citricarpa* isolates obtained from 1998 to 2021 was identified through duplex PCR. Ascospores production was assessed in PDA, ½ PDA, malt extract agar (MEA), oatmeal agar and citrus agar culture media by using five crosses of *MATI-1* and *MATI-2* from different SP regions. PDA culture medium was selected to assess ascospore production at 10, 15, 20, 25 and 30°C temperatures by using three crosses. Ascospores were quantified weekly until 56 days after crosses. Conidial germination was assessed at different temperatures (10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40°C) and wetness periods (12, 24, 36 and 48 hours). ‘Valencia’ sweet orange fruit was inoculated with  $10^3$  conidia or ascospore and CBS symptoms were characterized during 360 days. The proportion of *MATI-1* and *MATI-2* was significantly similar to 1:1 in SP. Ascospore production was observed in PDA, ½ PDA and malt extract agar, with a peak production of  $10^4$  ascospores/mL in PDA and EMA until 21 days. Ascospores were produced in temperatures of 15°C, 20°C and 25°C, with peaks of  $10^2$ ,  $10^3$  and  $10^3$  ascospores/mL at 42-49, 35 and 21 days, respectively. Ascospore production was similar for all crosses. Beta-monomolecular model was fitted to the conidial germination at different temperatures and wetness periods. Conidia germinated from 9°C to 40°C with a peak at 25°C and at least 36 h of wetness. Fruit inoculated with conidia or ascospore had false malanose and hard spot symptoms. This study shows that ascospore may be formed in all SP regions, production of these spores may be affected by different *in vitro* factors and they infect sweet orange fruit. The results will be useful for future research related to epidemiology and management of CBS with the use of both kind of *P. citricarpa* spores.

**Keywords:** *Citrus* spp.; Mating type; Citrus black spot; Inocula.



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Cultura dos citros

Os citros são espécies de vegetais que pertencem à família Rutaceae, sendo os principais gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* spp. São arbustos ou árvores que variam de 1,5 a 10 metros de altura, folhagem geralmente verde-escuro e abundante, presença frequente de espinhos nos ramos, folhas e frutos com glândulas de óleo visíveis a olho nu e flores brancas ou rosadas e aromáticas polinizadas principalmente por abelhas. Seus frutos são de tamanho médio a grande e do tipo baga ou hespéride, com coloração verde quando imaturos e laranja a amarela quando maduros, doces-ácidos a ácidos e ricos em ácido cítrico (GIRARDI et al., 2021).

A produção global dos principais grupos de citros (laranjas-doces, tangerinas e híbridos, limas-ácidas, limões, pomelos e toranjas) foi estimada em 143 milhões de toneladas em 2019. A China é o principal produtor de citros, seguida do Brasil e da Índia, segundo e terceiro maiores produtores mundiais de citros, respectivamente. Entretanto, a posição muda de acordo com o grupo de citros considerado, com o Brasil liderando a produção mundial de laranja doce, a China como o maior produtor de tangerinas e a Índia de limas e limões (GIRARDI et al., 2021).

A citricultura é um importante setor agrícola para o Brasil do ponto de vista econômico e social. Em 2020 foi responsável por uma área colhida de 572.698 hectares de laranja e uma produção de 16,7 milhões de toneladas (FAO, 2021). O país se destaca como o maior produtor e exportador mundial do fruto e suco de laranja doce, respectivamente (CITRUS BR, 2020). A produção total de laranjas doces atende tanto o mercado de frutas frescas quanto a indústria de produção de suco. O maior cinturão citrícola do país engloba o Estado de São Paulo, o triângulo mineiro e o sudoeste de Minas Gerais, cuja estimativa de safra de 2021/22 nessa região foi de 12 milhões de toneladas (294,17 milhões de caixas) (FUNDECITRUS, 2021). As duas variedades de laranjeira doce mais plantadas nesse cinturão citrícola são: ‘Valência’, ‘Pêra’, ‘Hamlim’ e ‘Natal’, ocupando 90% da área cultivada (FUNDECITRUS, 2021).

O setor citrícola brasileiro apresenta histórico de sucesso na superação de problemas fitossanitários (AMORIM; REZENDE; BERGAMIM FILHO, 2018). Porém, algumas doenças ainda afetam a qualidade da produção e causam queda prematura de frutos. No levantamento realizado pelo Fundecitrus de 2020 a 2021, a queda prematura de frutos representou 21,60% da produção e deste valor 8,76% foram devido a doenças. Dentre as doenças, destacam-se o huanglongbing (3,71%), causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter*, a pinta preta (2,98%), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, a leprose (1,70%), causada pelo vírus *Citrus leprosis virus* (CiLV) e o cancro cítrico (0,37%), causado pela bactéria *Xanthomonas citri*

subsp. *citri*, que tiveram as maiores porcentagens de taxa de queda na safra 2019/20 (FUNDECITRUS, 2021). Desse modo, a pinta preta pode ser considerada uma das mais importantes doenças fúngicas, pois esteve entre as três maiores causas bióticas de queda durante cinco safras seguidas (2016/17 a 2020/21), principalmente em pomares mais velhos, que compõem a maioria dos pomares paulistas (MOREIRA et al., 2022). Os danos da pinta preta incluem a queda prematura dos frutos e as lesões na casca que afetam o comércio dos frutos para a indústria e mercado de frutas frescas, respectivamente. Os sintomas são os mais variados: mancha dura, mancha sardenta, mancha virulenta, falsa melanose, mancha rendilhada e mancha trincada (SILVA JUNIOR et al., 2016a). A queda do fruto está relacionada com a severidade da pinta preta. Frutos com mais de 4% de área da casca lesionada têm maior probabilidade de se desprender do pedúnculo e cair prematuramente (MACHADO et al., 2021).

## 1.2. Histórico da pinta preta dos citros

A pinta preta teve seu primeiro relato e descrição em 1895 na Austrália, especificamente na região costeira de New South Wales (BENSON, 1895). Posteriormente, foi relatada na África do Sul em 1929, na província de Natal, e desde então vem causando prejuízos à citricultura desse país (DOIDGE, 1929). A doença está presente em diversas partes do mundo, distribuída pelos continentes asiático, africano, americano e a Oceania (KOTZÉ, 2000). Em países nos quais o verão é quente e seco e o inverno é instável e úmido, como a maior parte da Europa, sudoeste da Austrália, região do Cabo na África do Sul, centro do Chile e na Califórnia, a pinta preta não é observada, pois essas condições são desfavoráveis ao desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, da doença (YONOW et al., 2013).

O primeiro relato da pinta preta no Brasil ocorreu em pomares comerciais no estado do Rio de Janeiro no ano de 1980 (ROBBS et al., 1995). Em seguida foi relatada no sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, em 1986 (FEICHTENBERGER, 1996). No estado de São Paulo, o maior produtor nacional de laranja e suco (CITRUS BR, 2020), o primeiro relato da pinta preta ocorreu em 1992 em limoeiros verdadeiros e laranjeiras doce de maturação tardia (GOES; FEICHTENBERGER, 1993). Na década de 2000, a pinta preta foi relatada em diversos estados brasileiros produtores de citros. Na região sudeste a doença foi relatada em 2001 em Minas Gerais (BALDASSARI et al., 2004) e em 2002 no Espírito Santo (COSTA et al., 2003). Em 2004 foi relatada em Santa Catarina (ANDRADE et al., 2004) e no Paraná (CAIXETA et al., 2005). No centro-oeste, foi relatada em 2001 no estado de Goiás e em Mato Grosso e Mato Grosso do Sul em 2008 (SILVA JUNIOR et al., 2016a). No norte teve seu primeiro relato em 2003 no Amazonas (GASPAROTTO et al., 2004) e em 2008 em Rondônia (VIEIRA JÚNIOR

et al., 2010). No nordeste, teve relato apenas no estado da Bahia em 2008 (SILVA et al., 2013). Em outros estados importantes produtores de citros do nordeste e da região norte, como Sergipe e Pará, respectivamente, a doença ainda não foi relatada (SILVA JUNIOR et al, 2016a).

### 1.3. Etiologia e epidemiologia da pinta preta dos citros

A pinta preta é causada pelo ascomiceto *Phyllosticta citricarpa* McAlpine (Van de Aa, 1973), nome atribuído à fase assexuada do fungo após o fim da nomenclatura dupla dos fungos (HAWKSWORTH et al., 2011). A fase sexuada é denominada na literatura como *Guignardia citricarpa* (KIELY, 1948). Outras espécies do mesmo gênero, como *P. citrimaxima*, *P. citriasiana*, *P. citrichinaensis* e *P. paracitricarpa* foram relatadas causando sintomas atípicos de pinta preta em algumas espécies de citros (WULANDARI et al., 2009; WIKKEE et al., 2013; WANG et al., 2012; GUARNACCIA et al., 2017). *P. citrimaxima* e *P. citriasiana* foram isolados de “tan spot” em folhas e frutos de *Citrus maxima* na Ásia (WULANDARI et al., 2009; WIKKEE et al., 2013). *P. citrichinaensis* foi identificada e encontrada causando manchas irregulares e sardenta em folhas e frutos de citros na China (WANG et al., 2012) e a espécie *P. paracitricarpa* foi isolada e identificada no mesmo país de lesões necróticas em folhas de laranja doce inoculadas (GUARNACCIA et al., 2017). As demais espécies do gênero, tais como *P. capitalensis*, são descritas como endofíticas ou saprófitas em citros (GUARNACCIA et al., 2019). Apesar dessa diversidade, a espécie *P. citricarpa* foi encontrada em maior proporção em folhas caídas em decomposição em pomares australianos por meio de análise com PCR em tempo real (TRAN et al, 2020).

As espécies *P. citricarpa* (patogênica) e *P. capitalensis* (endofítica) são as mais encontradas pelo mundo e são morfológicamente idênticas (GUARNACCIA et al., 2019). Antes do advento de técnicas moleculares na década de 1990 e devido à semelhança morfológica, houve confusão devido à presença de *P. capitalensis* em plantas assintomáticas, o que foi resolvido apenas com testes de patogenicidade e observação de diferenças em aspectos da colônia, como crescimento mais rápido de *P. capitalensis* em relação a *P. citricarpa* (McONIE, 1964a). O mesmo ocorreu em estudos utilizando armadilhas do tipo caça-esporo (McONIE, 1964b), cujos resultados devem ser analisados com cautela, já que ascósporos da espécie endofítica podem ter sido capturados nessas armadilhas convencionais. Um estudo conduzido em pomares paulistas mostrou que é possível utilizar mudas de citros como armadilhas para coletar esporos sexuais e assexuais de *P. citricarpa* no campo com posterior quantificação do inóculo via PCR em tempo real (FIALHO, 2021).

Um aspecto importante que diferencia essas duas espécies é o mecanismo de reprodução

sexuada. *P. citricarpa* apresenta heterotalismo, ou seja, para ocorrer a produção de ascósporos é necessária a presença de dois indivíduos com *mating type* compatíveis, ao passo que *P. capitalensis*, por apresentar homotalismo, um mesmo indivíduo isoladamente pode produzir ascósporos (TRAN et al., 2018; GUARNACCIA et al., 2019). Análises evolutivas das regiões gênicas responsáveis por essa característica mostraram que *P. citricarpa* evoluiu do homotalismo para o heterotalismo (PETTERS-VANDRESEN et al., 2020). No Brasil, até o momento apenas um estudo foi conduzido visando identificar a proporção do *mating type* de *P. citricarpa*, utilizando principalmente isolados provenientes do estado do Paraná e encontrando ambos os *mating type*, *MAT1-1* e *MAT1-2* (AMORIM et al., 2016).

O patógeno produz assexuadamente os conídios ou picnidiósporos. Esses esporos são produzidos em corpos de frutificação denominados picnídios, os quais são observados como pontos escuros em lesões do tipo mancha dura, mancha sardenta e mancha virulenta e também podem ser observados nas folhas em decomposição no solo (KOTZÉ, 1981; KOTZÉ, 2000). Os conídios são principalmente dispersos por respingos de água, principalmente por escorrimento do topo para a base da planta, pois ao serem liberados dos picnídios são envoltos por uma mucilagem que se dissolve apenas em água, cuja função é impedir a dessecação (SPÓSITO et al., 2011; KOTZÉ 2000). Sua capacidade de dispersão se restringe em torno de 80 cm da fonte de inóculo, que pode ser frutos temporões, ramos velhos e folhas (SPÓSITO et al., 2011). Por ser a água o principal agente de dispersão, a incidência de frutos doentes é maior no terço médio e inferior da copa (SPÓSITO et al., 2008). Alguns estudos sugerem ser o inóculo responsável pelo aumento da severidade da doença, particularmente em áreas onde há a remoção das folhas caídas (SPÓSITO et al., 2011).

Os esporos sexuados de *P. citricarpa* são os ascósporos, considerados importantes para a introdução da doença em áreas livres, uma vez que podem ser dispersos pelo vento bem como por material propagativo infectado (SILVA JUNIOR et al., 2016a). Os ascósporos são produzidos em folhas caídas em decomposição no solo e ejetados a uma altura de 1 cm do ostíolo do pseudotécio, que é formado na parte da folha voltada para a superfície (KIELY, 1948; KOTZÉ 1963). Os ascósporos são produzidos após eventos de chuva, devido à necessidade de água para sua liberação do pseudotécio (REIS et al., 2006). A dispersão é mais ampla em relação aos conídios, podendo alcançar distâncias estimadas em 24 metros quando levados pelo vento. Essa dispersão varia com a idade da planta e densidade de plantio (SPÓSITO et al., 2007). Para a produção dos ascósporos, além da presença de indivíduos de *mating type* compatíveis, há a necessidade de alternância de períodos de molhamento e secagem das folhas caídas (KOTZÉ, 2000). Sua importância na sobrevivência do patógeno se deve à capacidade de resistir a

temperaturas que variam de 7 °C a 35 °C (LEE; HUANG, 1973).

A importância dos ascósporos no aumento da intensidade da pinta preta no pomar é contraditória e precisa ser investigada, pois alguns estudos mostram falta de correlação significativa e positiva entre sua quantidade e o aumento da doença (TRAN et al., 2020; REIS et al., 2006). Outra evidência que questiona a importância dos ascósporos no aumento na intensidade da pinta preta foi encontrada em estudo recente, no qual mais esporos foram encontrados dentro da copa das plantas do que fora, o que pode estar associado à maior quantidade de conídios na copa, bem como foi encontrado maior quantidade de esporos coletados nas mudas usadas como armadilhas nas épocas com maior quantidade de chuvas e molhamento foliar, fatores importantes para a liberação, dispersão e germinação de conídios (FIALHO, 2021).

Ambos os esporos, após a germinação e formação do apressório, penetram na cutícula por meio do *peg* de infecção e formam uma massa micelial na região subcuticular (McONIE, 1967). A germinação e formação de apressório de conídios de *P. citricarpa* podem ocorrer numa faixa de temperatura de 10 a 40 °C, porém o período de molhamento é a variável ambiental que mais influencia a formação do apressório *in vitro* (NORONHA, 2002). No entanto, esse estudo utilizou porcentagem relativa de germinação e para uma maior acurácia e precisão na estimativa da germinação a partir de modelos de superfície de resposta é necessário se utilizar dados reais de germinação. Em outro trabalho foi obtida a germinação real de conídios de *P. citricarpa* em diferentes temperaturas e períodos de molhamento (WANG; DEWDNEY, 2019). Entretanto, os autores não obtiveram a equação de superfície de resposta. Desse modo, os resultados não podem ser utilizados em sistemas de previsão de doença, que utilizam geralmente mais de uma variável para estimar a germinação (GENT et al., 2013; SHTIENBERG, 2013). Além disso, dada a presença de ascósporos nos pomares brasileiros, torna-se necessário também realizar estudos desse tipo com esse inóculo, mas para isso há necessidade de se aprimorar as metodologias de produção *in vitro* de ascósporos desenvolvidas recentemente (TRAN et al., 2017).

Os sintomas geralmente aparecem após longo período de incubação, que pode variar de 35 a 180 dias para lesões do tipo falsa melanose, ou de 100 a 341 dias para lesões de mancha dura e sardenta, a depender do diâmetro do fruto e da concentração de conídios inoculada no fruto (FRARE, 2015). Em condições de campo, o período de incubação também é influenciado pelo diâmetro do fruto, concentração de conídios e momento da inoculação (FIALHO et al., 2022). Os menores períodos de incubação foram observados na maior concentração de conídios utilizada: 121-192 dias, enquanto na menor concentração foi de 231-299 dias (FIALHO et al.,



2022). Para ascósporos não há estudos caracterizando os sintomas em variedades comerciais de laranja doce, apenas em frutos de Tangor ‘Murcott’ (TRAN et al., 2018).

#### 1.4. Manejo da pinta preta dos citros

O manejo da pinta preta consiste no uso de diversos métodos de controle, embora o químico seja o mais utilizado devido à sua eficácia e retorno econômico (SILVA JUNIOR et al., 2016a). No Brasil, para os pomares destinados à produção de suco concentrado para exportação, os grupos químicos disponíveis de acordo com a classificação do FRAC (FRAC, 2022) são as estrobilurinas ou inibidores da quinona externa (QoI): piraclostrobina, azoxistrobina e trifloxistrobina, e os multissítios (M) à base de cobre: oxiclureto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso (SILVA JUNIOR et al., 2016a).

O período de maior suscetibilidade dos frutos às infecções por *P. citricarpa* é de outubro a março (LANZA et al., 2018; FIALHO et al., 2022). Assim, o período de proteção dos frutos se inicia com duas aplicações de cobre, a primeira na fase de 2/3 de pétalas caídas e a segunda 21-28 dias após, pois também auxiliam no controle de outras doenças fúngicas dos citros, como a melanose e verrugose (TIMMER; ZITKO, 1996). O cobre pode ser utilizado a cada 21 dias até os frutos atingirem 5 cm de diâmetro quando o controle do cancro cítrico também é requerido. A aplicação de produtos à base de cobre geralmente é realizada com 30-40 mg de cobre metálico/m<sup>3</sup> de copa, dose estabelecida por volume de copa das plantas (*tree row volume*- TRV) (FERREIRA et al., 2022). As estrobilurinas são aplicadas para o controle da pinta preta a cada 35-42 dias, desde o início do período chuvoso (meados de novembro) e se estendem, associadas ou não com os cobres, até o fim do período chuvoso (março/abril) com aproximadamente três a quatro aplicações por safra (LANZA et al., 2018). A dose utilizada é de 2,8 mg de estrobilurina/m<sup>3</sup> de copa em calda contendo óleo mineral ou vegetal na concentração de até 0,25% v/v, principalmente nos pomares mais velhos e de variedades tardias para aumentar a eficácia do controle (SILVA JUNIOR et al., 2021). O volume de calda recomendado para o manejo de pinta preta é de 75 mL/m<sup>3</sup> de copa (SILVA JUNIOR et al., 2016a,b).

Outros métodos de controle são utilizados no manejo da pinta preta, como o cultural, genético e biológico. Visando a exclusão do patógeno, tem-se medidas como plantio de mudas sadias provenientes de viveiros certificados e retirada de folhas e restos vegetais de caminhões antes de entrar no pomar (SILVA JUNIOR et al., 2016a). A erradicação do patógeno pode ser realizada por meio da aceleração da decomposição das folhas caídas no solo pelo uso de rastelos mecânicos com trinchas (SCALOPPI et al., 2012), aplicação de uréia ou nitrato de cálcio nas

mesmas (BELLOTTE et al., 2009) e cobertura dessas folhas com a vegetação da entrelinha cortada por meio de roçadeiras ecológicas, que servem como barreira física (ROSSÊTTO, 2009). Medidas culturais também podem auxiliar na redução da doença e seus danos, como adubação equilibrada das plantas, evitar o estresse hídrico (KOTZÉ, 1963), uso da irrigação por gotejamento para evitar molhamento das folhas caídas (ALCOBA et al., 2001), eliminação de frutos temporões e colheita antecipada (KOTZÉ, 1981) e eliminar ramos velhos por meio da poda (NOZAKI, 2007).

O controle biológico da pinta preta ainda é pouco praticado em pomares comerciais, devido à eficácia relativamente baixa em comparação ao controle químico. No entanto, esse quadro pode ser modificado com os resultados de mais pesquisas. As espécies endofíticas *P. capitalensis* e *P. paracapitalensis* mostraram redução na incidência e severidade da pinta preta quando inoculadas quatorze dias antes de inocular *P. citricarpa* em frutos de laranja (TRAN et al., 2019). Nas condições brasileiras foi encontrada inibição *in vitro* de 30% no crescimento micelial de *P. citricarpa* causada por isolados de *Bacillus* sp., e, em condições de campo, plantas da variedade Valência pulverizadas com alguns isolados de *B. subtilis* apresentaram índice de doença menor que a testemunha (KUPPER et al., 2020). O uso de *B. subtilis* e leite cru também mostraram maior eficácia no controle da pinta preta dos citros em pomar de produção orgânica quando comparados ao uso de *Trichoderma* sp. e biofertilizante (BERNARDO; BETTIOL, 2010).

A maioria das espécies de citros são suscetíveis à pinta preta em diferentes níveis, com relato apenas da lima ácida ‘Tahiti’ e da laranja azeda como resistentes, porém, esta última pode apresentar severidade muito baixa de sintomas (SILVA JUNIOR et al., 2016a). Na Austrália, por meio de inoculações de frutos de diversas espécies de citros, foi encontrada suscetibilidade em laranjas doces, limões e tangerinas, ao passo que a laranja azeda, os pomelos e as limas foram consideradas resistentes (MILES et al., 2019). As diferentes variedades de laranja doce apresentam a mesma suscetibilidade à pinta preta, porém as mais tardias podem apresentar maior severidade da doença devido ao maior tempo de exposição do fruto ao patógeno (SPÓSITO; BASSANEZI; AMORIM, 2004). Materiais geneticamente modificados com a supressão do gene da limoneno sintase apresentaram redução da severidade da pinta preta em frutos inoculados em condições controladas. Também foi demonstrada a importância do limoneno na formação de picnídios em condições *in vitro* (RODRÍGUEZ et al., 2018).

## 1.5. Objetivos

Os objetivos desse estudo foram: (i) identificar a frequência do *MAT1-1* e *MAT1-2* em isolados de *P. citricarpa* coletados de diferentes regiões citrícolas do estado de São Paulo; (ii) avaliar a produção de ascósporos *in vitro* em diferentes meios de cultivo; (iii) avaliar a produção de ascósporos em temperaturas entre 10°C e 30°C; (iv) avaliar o efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de conídios.

## Referências

- ALCOBA, N.; VIGIANI, A. R.; BEJARANO, N.; ALVAREZ, S.; BONILLO, M.; SERRANO, M.; RIVERA, A.; VIGIANI, A. M. Influencia del tipo de riego en la sobrevivência de *Guignardia citricarpa* Kiely, hongo responsable de la mancha negra de los cítricos. **Servicios de Publicaciones Electrónicas del Programa de Asesoramiento en Riegos**. España. 2001. Disponível em: <<http://par.cebas.csic.es/publi/170700.html>> . Acesso em: 29 ago. 2020.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. 561 p.
- AMORIM, R.; SAVI, D. C.; FERREIRA-MABA, L.; ALUIZIO, R.; GOULIN, E. H.; TAKITA, M. A.; MACHADO, M. A.; GLIENKE, C. MAT gene idiomorphs suggest a heterothallic sexual cycle in the citrus pathogen *Phyllosticta citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, n. 2, p. 325-337, 2016.
- ANDRADE, T.; THEODORO, G.F.; GOES, A.; BALDASSARI, R.B. Mancha preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado de Santa Catarina. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.126, 2004.
- BALDASSARI, R.B.; REIS, R.F.; GOES, A. Relato de mancha preta dos citros em pomares do Estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.126, 2004.
- 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**, v. 34, n. 2, p. 71-76, abr. 2009.
- BENSON, A.H. Black spot of the orange. **Agric. Gaz. N.S.W.**, n. 4, p. 249–252, 1895.
- BERNARDO, E.R.A.; BETTIOL, W. Biocontrol and alternative products for managing citrus black spot in organic cropping systems. **Trop. Plant Pathol.**, v.35, n.1, p.37-42, 2010.
- CAIXETA, M.P.; CORAZA NUNES, M.J.; VIDA, J.B.; NUNES, W.N.; TESSMANN, D.J.; ZANUTO, C.A.; MULLER, G.R. Ocorrência da pinta preta dos citros (*Guignardia citricarpa*) no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.136, 2005.
- CITRUS BR. **Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos**. 2020. Disponível em: <<http://citrusbr.com/economia>> Acesso em: 27 mar. 2021.

- COSTA, H.; VENTURA, J.A.; ARLEU, R.J.; AGUILAR -VILDOSO, C.I. Ocorrência da pinta preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.205, 2003
- DOIDGE, E.M. Some diseases of citrus prevalent in South Africa. **South African Journal Science**, v.26, p.320-325, 1929.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FaoStat**. 2021. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat>> Acesso em: 16 jun. 2022.
- FEICHTENBERGER, E. Mancha preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, v.17, p.93-108, 1996.
- FERREIRA, D. H.; MOREIRA, R. R.; SILVA JUNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Copper rate and spray interval for joint management of citrus canker and citrus black spot in orange orchards. **European Journal of Plant Pathology**, v. 163, n. 4, p. 891-906, 2022.
- FIALHO, R. O. **Inoculum monitoring, fruit susceptibility to infection and fungicide efficacy for citrus black spot control during fruit development in sweet orange orchards**. 2021. 107 f. Tese (Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.
- FIALHO, R. O.; MOYO, P.; FOURIE, P. H.; LANZA, F. E.; MACHADO, F. J.; AMORIM, L.; SILVA-JUNIOR, G. J. Citrus black spot intensity and yield losses on sweet orange are affected by *Phyllosticta citricarpa* inoculum concentration and fruit developmental stage. **Plant Pathology**, v. 0, p. 1-13, 2022.
- FRAC. **Fungicide Resistance Action Committee** – Search by FRAC Mode of Action Groups for Recommendations. 2022. Disponível em: < <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/by-frac-mode-of-action-group> > Acesso em: 4 dez. 2022.
- FRARE, G. F. **Influência da idade do fruto no período de incubação e na expressão de diferentes tipos de sintomas da mancha preta do citros**. 2015. 77 f. Tese de doutorado (Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- FUNDECITRUS, 2021. **Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: retrato dos pomares em março de 2021**. Fundo de Defesa da Citricultura... [et al.]. – Araraquara,SP : Fundecitrus, 2021. 142p.
- GASPAROTTO, L.; GOES, A.; PEREIRA, J. C. R.; BALDASSARI, R.B. Ocorrência da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado de Amazonas. **Summa Phytopathologica**, v.30, p.126, 2004.
- GENT, D. H.; MAHAFFEE, W. F.; Mc ROBERTS, N.; PFENDER, W. F. The use and role of predictive systems in disease management. **Annual review of phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 267-289, 4 ago. 2013.

- GIRARDI, E. A.; JUNIOR, J. P.; SOBRINHO, J. T.; FILHO, W. S. S.; PASSOS, O. S.; CRISTOFANY-YALI, M.; SEMPIONATO, O. R.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C.; JUNIOR, D. M.; BASSANEZI, R. B.; GARCIA, L. A. P.; AYRES, A. J. **Guia de reconhecimento dos citros em campo: um guia prático para o reconhecimento em campo de variedades de laranja-doce e outras espécies de citros cultivadas no estado de São Paulo e Triângulo Mineiro**. 1. ed. Araraquara, SP, 2021. 158 p.
- GOES, A. de; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.138, 1993. Suplemento. /Apresentado ao 26., Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Aracajú, 1993 – Resumo/
- GUARNACCIA, V.; GEHRMANN, T.; SILVA-JUNIOR, G. J.; FOURIE, P. H.; HARIDAS, S.; VU, D.; SPATAFORA, J.; MARTIN, F. M.; ROBERT, V.; GRIGORIEV, I. V. *Phyllosticta citricarpa* and sister species of global importance to Citrus. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 12, p. 1619-1635, 2019.
- GUARNACCIA, V.; GROENEWALD, J.Z.; LI, H.; GLIENKE, C.; CARSTENS, E.; HATTINGH, V.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W.. First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe. **Studies In Mycology**, v. 87, p. 161-185, 2017.
- HAWKSWORTH, D.L.; CROUS, P.W.; REDHEAD, S.A.; REYNOLDS, D.R.; SAMSON, R.A.; SEIFERT, K.A.; TAYLOR, J.W.; WINGFIELD, M.J. The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. **IMA Fungus: The Global Mycological Journal**, v.2, n.1, p.105–112, 2011.
- KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* and its relation to black spot of citrus. **Proc. Linn. Soc. of New South Wales**, v. 73, p. 249-292, 1948.
- KOTZÉ, J.M. **Black spot**. In L. W. Timmer, S. M. Garnsey, & J. H. Graham (Eds.), *Compendium of citrus diseases*. 2nd ed. St. Paul: APS Press. pp. 23–25. 2000.
- KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.65, n. 12, p.945- 950, 1981.
- KOTZÉ, J.M. **Studies on the black spot disease of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely**, with particular reference to its epiphytolthogy and control at Lebata. 143f. PhD Thesis. Pretoria: University of Pretoria, South Africa, 1963.
- KUPPER, K. C.; MORETTO, R. K.; FUJIMOTO, A. Production of antifungal compounds by *Bacillus* spp. isolates and its capacity for controlling citrus black spot under field conditions. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 0-7, 2020.
- LANZA, F. E.; METZKER, T. G.; VINHAS, T.; BEHLAU, F.; SILVA JUNIOR, G. J. Critical Fungicide Spray Period for Citrus Black Spot Control in São Paulo State, Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 2, p. 334-340, 2018.

- LEE, Y.S.; HUANG, C.S. Effect of climatic factors on the development and discharge of ascospores of the citrus black spot fungus. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, v.22, n.2, p.135–144, 1973.
- MACHADO, F. J.; LANZA, F. E.; FERRETTI, M. O.; FIALHO, R. O.; BEHLAU, F.; SILVA-JUNIOR, G. J. Citrus black spot severity related to premature fruit drop in sweet orange orchards. **Plant Pathology**, v. 71, n. 2, p. 400-410, 2021.
- McONIE, K. C. Apparent absence of *Guignardia citricarpa* Kily from localities where citrus black spot is absent. **S. Afr. J. Agric. Sci.**, v.7, p. 347-354. 1964a.
- McONIE K.C. Germination and infection of citrus by ascospore of *G. citricarpa*, in relation to control of black spot. **Phytopathology**, v.57, p.743-746,1967.
- McONIE, K.C. Orchard development and discharge of ascospores of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. **Phytopathology**, v. 54, p. 1448-1453, 1964b.
- MILES, A. K.; SMITH, M. W.; TRAN, N. T.; SHUEY, T. A.; DEWDNEY, M. M.; DRENTH, A. Identification of Resistance to Citrus Black Spot Using a Novel In-field Inoculation Assay. **Hortscience**, v. 54, n. 10, p. 1673-1681, 2019.
- MOREIRA, R. R.; MACHADO, F. J.; LANZA, F. E.; TROMBIN, V. G.; BASSANEZI, R. B.; MIRANDA, M. P.; BARBOSA, J. C.; SILVA JUNIOR, G. J.; BEHLAU, F.. Impact of diseases and pests on premature fruit drop in sweet orange orchards in São Paulo state citrus belt, Brazil. **Pest Management Science**, v. 78, n. 6, p. 2643-2656, 2022.
- NORONHA, M. A.. **Escala diagramática para avaliação da mancha preta em folhas de citros e efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* McAlp (Van De Aa)]**. 2002. 67 f. Dissertação (Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- NOZAKI, M. H. **Produção de estruturas reprodutivas e efeito do ambiente nos tipos de sintomas produzidos por *Guignardia citricarpa* em *Citrus* spp.** 2007. 85 f. Tese de Doutorado (Produção vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.
- PETTERS-VANDRESEN, D.A.L.; ROSSI, B.J.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W.; MACHADO, M.A.; STUKENBROCK, E.H.; GLIENKE, C.. Mating-type locus rearrangements and shifts in thallism states in Citrus-associated *Phyllosticta* species. **Fungal Genetics And Biology**, v. 144, p. 103444, 2020.
- REIS, R.F.D.; TIMMER, L.W.; GOES, A. Effect of temperature, leaf wetness and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.1, p. 29-34, 2006.
- ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M. **A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do Estado do Rio de Janeiro**. Guaratiba, EMBRAPA/CTAt, 1995, 5p. (Comunicado Técnico, 19).

- RODRÍGUEZ, A.; KAVA, V.; LATORRE-GARCÍA, L.; SILVA, G. J. da; PEREIRA, R. G.; GLIENKE, C.; FERREIRA-MABA, L. S.; VICENT, A.; SHIMADA, T.; PEÑA, L. Engineering d-limonene synthase down-regulation in orange fruit induces resistance against the fungus *Phyllosticta citricarpa* through enhanced accumulation of monoterpene alcohols and activation of defence. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 9, p. 2077-2093, 2018.
- ROSSÊTTO, M. P. **Resistência varietal e manejo da pinta preta dos citros**. 2009. 75 f. Dissertação (Agricultura Tropical e subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, IAC, Campinas, 2009.
- SCALOPPI, E. M. T.; AGUIAR, R. L.; GOES, A. de; SPÓSITO, M. B. Efeito do manejo cultural e químico na incidência e severidade da mancha-preta dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 102-108, 2012.
- SHTIENBERG, D. Will decision-support systems be widely used for the management of plant diseases? **Annual review of phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 1-16, 4 ago. 2013.
- SILVA JUNIOR, G.J.; FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; GOES, A. **Pinta preta: a doença e seu manejo**. Araraquara, SP: Fundecitrus, 2016a. 208p.
- SILVA JUNIOR, G. J.; MORAES, M. R.; MOREIRA, R. R.; BEHLAU, F. Tree age and cultivar-oriented use of mineral oil added to fungicide tank mixture for the control of citrus black spot in sweet orange orchards. **Pest Management Science**, v. 78, n. 2, p. 488-498, 8 out. 2021.
- SILVA JUNIOR, G.J.; SILVA SCAPIN, M.; SILVA, F.P.; SILVA, A.R.P.; BEHLAU, F.; RAMOS, H.H. Spray volume and fungicide rates for citrus black spot control based on tree canopy volume. **Crop Protection**, v.85, p.38-45, 2016b.
- SILVA, S.X.B.; NUNES, C.C.S.; SANTANA, O.S.; GUIMARÃES, R.S.; SANTOS FILHO, H.P.; AGUILAR VILDOSO, C.I. Serviço de vigilância ativa da defesa agropecuária detectou nova ocorrência fitossanitária na citricultura baiana. **Bahia Agrícola**. v.9, p.30-37, 2013.
- SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. **Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 103-108, 2008.
- 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**, v.30, n.12, p.1.546-1.552, 2011.
- SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; RIBEIRO Jr, P.J.; BASSANEZI, R.B.; KRAISNKI, E.T. Spatial patterns of trees affected by black spots in citrus groves in Brazil. **Plant Disease**, v. 91, n. 1, p. 36-40, 2007.

- SPÓBITO, M.B.; BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L. Resistência à mancha preta dos citros avaliada por curvas de progresso da doença. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 532-537, 2004.
- TIMMER L.W.; ZITKO S.E. Evaluation of copper fungicides and rates of metallic copper for control of melanose on grapefruit in Florida. **American Phytopathological Society**, v.80, n.2, p.166-169, 1996.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; DIETZGEN, R. G.; DEWDNEY, M. M.; ZHANG, K.; ROLLINS, J. A.; DRENTH, A. Sexual Reproduction in the Citrus Black Spot Pathogen, *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology**, v. 107, n. 6, p. 732-739, 2017.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; DIETZGEN, R. G.; SHUEY, T. A.; MUDGE, S. R.; PAPACEK, D.; CHANDRA, K. A.; DRENTH, A. Inoculum Dynamics and Infection of Citrus Fruit by *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology**, v. 110, n. 10, p. 1680-1692, 2020.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; SMITH, M. W.; DIETZGEN, R. G.; DRENTH, A. Pathogenicity of *Phyllosticta citricarpa* Ascospores on *Citrus* spp. **Plant Disease**, v. 102, n. 7, p. 1386-1393, 2018.
- VAN DE Aa, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Stud. Mycol.** v.5, p. 1–110. 1973.
- WANG, X.; CHEN, G.; HUANG, F.; ZHANG, J.; HYDE, K. D.; LI, H. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. **Fungal Diversity**, v. 52, n. 1, p. 209-224, 2012.
- WANG, N.; DEWDNEY, M. M. The Effects of Nutrition and Environmental Factors on Conidial Germination and Appressorium Formation of *Phyllosticta citricarpa*, the Causal Agent of Citrus Black Spot. **Phytopathology**, v. 109, n. 4, p. 650-658, 2019.
- WIKKE, 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**, v. 76, p. 1-29, 2013.
- WULANDARI, N. F.; TO-ANUN, C.; HYDE, K. D.; DUONG, L. M.; DE GRUYTER, J.; MEFFERT, J. P.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. **Fungal Diversity**, v.34, p.23-39, 2009.
- YONOW, T.; HATTINGH, V.; DE VILLIERS, M. CLIMEX modelling of the potential global distribution of the citrus black spot disease caused by *Guignardia citricarpa* and the risk posed to Europe. **Crop Protection**, v.44, p.18-28, 2013.





## 2. CARACTERIZAÇÃO DO MATING TYPE E OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ASCÓSPOROS DE *Phyllosticta citricarpa*

### Resumo

O fungo *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros, é heterotático e possui micélio auto-estéril, requerendo a participação de talos compatíveis dos *mating type* *MATI-1* e *MATI-2* para que a reprodução sexuada ocorra. Na literatura há poucos estudos de aspectos básicos dos ascósporos devido à dificuldade de se produzir os mesmos *in vitro*. A maioria dos estudos tem sido relacionados com o monitoramento de ascósporos com armadilhas caça-esporos. Em 2017, uma metodologia de produção *in vitro* de ascósporos foi desenvolvida, que possibilitou realizar estudos com ascósporos. Portanto, levantamentos da presença dos *mating type* nas diferentes regiões de São Paulo, bem como a otimização da produção de ascósporos de *P. citricarpa* se mostram necessários para o melhor entendimento das epidemias de pinta preta. Os objetivos deste estudo foram: (i) determinar a frequência dos *mating types* de isolados de *P. citricarpa* do cinturão citrícola paulista e, (ii) quantificar a produção de ascósporos em diferentes meios de cultivo e temperaturas ao longo do tempo. O experimento de identificação do *mating type* foi conduzido com 137 isolados monospóricos obtidos de frutos sintomáticos das três regiões citrícolas de SP. O *mating type* foi identificado por meio de PCR duplex. A produção dos ascósporos foi avaliada nos meios extrato de malte ágar (EMA), BDA, ½ BDA, aveia ágar e citros ágar. Dez isolados foram repicados e após 14 dias foram cruzados dois a dois usando-se o método da suspensão e obtendo-se cinco cruzamentos. Os ascósporos ejetados foram coletados das tampas das placas e quantificados semanalmente de 7 até 35 dias após os cruzamentos. O efeito das temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30°C sobre a produção de ascósporos de três cruzamentos foi avaliado em meio BDA até 56 dias. Os experimentos foram conduzidos em duplicata. Como resultados, as proporções dos *mating type* de isolados obtidos de 1998 até 2021 em SP foram significativamente iguais a 1:1 nas diferentes regiões. A produção de ascósporos atingiu pico médio de 8.000 ascósporos/placa aos 14 dias em EMA, 7.000 ascósporos/placa aos 21 dias em BDA e 2.770 ascósporos/placa aos 21 dias em ½ BDA. Embora alguns ascósporos tenham sido encontrados em tampas de placas com citros e aveia ágar, a produção foi insignificante. A produção de ascósporos ocorreu nas temperaturas de 15°C, 20°C e 25°C, entre 42-56, 28-42 e 14-28 dias após os cruzamentos, respectivamente. Pico de 1.800 ascósporos/placa foi observado aos 21 dias a 25°C, 1.200 ascósporos/placa aos 35 dias a 20°C e 700 ascósporos/placa aos 42-49 dias a 15°C. Não houve diferença na produção de ascósporos entre os diferentes cruzamentos dos *mating types*. Os resultados evidenciam que os dois esporos podem ser formados no parque citrícola, uma vez que ambos *mating types* estão presentes nas diferentes regiões de citros. Os dados gerados servirão como base para estudos relacionados com ascósporos, uma vez que se identificou o meio de cultivo e a temperatura ideais para a produção desses esporos sexuais.

Palavras-chave: Pinta preta dos citros; ciclo primário; *Phyllosticta citricarpa*; *Mating type*; Condições ambientais.

## Abstract

*Phyllosticta citricarpa*, causal agent of citrus black spot (CBS), is heterothallic and it has self-sterile mycelia, requiring the presence of compatible thallus from mating type *MATI-1* and *MATI-2* to the sexual reproduction occurrence. There are few studies in literature regarding basic aspects of sexual spores (ascospores) due to the difficulty to produce them *in vitro*. Most studies are related to ascospore monitoring with spore traps. In 2017, an *in vitro* ascospore production methodology was developed, which enabled to perform assays with ascospores. Therefore, surveys of both mating types in different regions of São Paulo citrus belt (SP), as well as the optimization of *P. citricarpa* ascospore production are necessary to understand CBS epidemics. The aims of this study were to: (i) determine the mating type frequency from *P. citricarpa* isolates obtained in SP citrus belt and (ii) quantify ascospore production in different culture media and temperatures over time. The mating type identification experiment was performed with 137 single spore isolates obtained from symptomatic fruit from the three citrus producing regions of SP. *Mating type* was identified by duplex PCR. Ascospore production was assessed in malt extract agar (MEA), PDA, ½ PDA, oatmeal agar and citrus agar culture media. Ten isolates were subcultured and, after 14 days, they were crossed two by two using the spermatia suspension method and obtaining five crosses. Ejected ascospores were collected in the plastic dish lids and quantified weekly from seven to 35 days after crosses. Temperature effect of 10, 15, 20, 25 e 30°C over ascospore production of three crosses was assessed in PDA culture media until 56 days. As results, the *mating types* proportion of isolates obtained from 1998 to 2021 in each SP region were significantly similar to 1:1. Ascospore production reached a mean peak of 8.000 ascospores per dish at 14 days in MEA, 7.000 ascospores per dish at 21 days in PDA, and 2.770 ascospores per dish at 21 days in ½ PDA. Although a few ascospores were found in dish lids with citrus and oatmeal agar, production was insignificant. Ascospore production occurred at 15°C, 20°C and 25°C temperatures, among 42-56, 28-42 and 14-28 days after crosses, respectively. A peak of 1.800 ascospores per dish was observed at 21 days and 25°C, 1.200 ascospores per dish at 35 days and 20°C, and 700 ascospores per dish at 42-49 days and 15°C. Production peak of 10<sup>4</sup> ascospores/mL was observed after 21 days at 25°C, whereas at 15°C and 20°C, it occurred at 42-49 and 35 days, respectively. There was no difference in ascospore production among *mating type* crosses. The results shows that both spores may be produced in SP citrus belt, as both mating types are present in the citrus producing regions. The data obtained may serve as background for studies related to ascospores, since the ideal culture media and temperature for production of this kind of spore were identified.

Keywords: Citrus black spot; Primary cycle; *Phyllosticta citricarpa*; Mating type; Environmental conditions.

## 2.1 Introdução

O patógeno *P. citricarpa* produz dois tipos de inóculo: os ascósporos e conídios. Os ascósporos, produzidos apenas nas folhas caídas em decomposição, são responsáveis tanto pelo ciclo primário, quanto pelos secundários uma vez que podem ser dispersos via folhas contaminadas por longas distâncias ou entre plantas de um pomar pelo vento. Os conídios são responsáveis pelos ciclos secundários da doença e são liberados e dispersos pela água (SPÓSITO et al., 2007; SPÓSITO et al., 2011; SILVA JUNIOR et al., 2016).

Os conídios são produzidos assexuadamente e são facilmente encontrados em folhas, frutos e ramos (TRAN et al., 2020), enquanto os ascósporos, produzidos sexuadamente, somente são formados se houver a presença de isolados de *mating type* compatíveis, o *MATI-1* e o *MATI-2*, visto que *P. citricarpa* é um fungo heterotálico (GUARNACCIA et al., 2019). Esse aspecto pode ser uma vantagem evolutiva, dado que essa espécie evoluiu do homotalismo para o heterotalismo (PETTERS-VANDRESEN et al., 2020). A presença de ambos os *mating type* de fitopatógenos heterotálicos é importante pois influencia variabilidade genética do patógeno, afetando a sensibilidade a fungicidas, como ocorreu para *Phytophthora infestans* (DRENTH; TURKENSTEEN; GOVERS, 1993) e a resistência de cultivares, como no caso de *Verticillium dahliae* (SUASTE-DZUL et al., 2022). No caso de *Phyllosticta citricarpa*, a presença de ambos os *mating type* também afeta a dispersão (SPÓSITO et al., 2007) e a sobrevivência do patógeno em folhas caídas em decomposição (SILVA JUNIOR et al., 2016). A análise molecular dos *mating type* de isolados de *P. citricarpa* obtidos principalmente do estado do Paraná mostrou a proporção de 1:1 entre *mating type* compatíveis (AMORIM et al., 2016). Em pomares de citros na Flórida foi encontrado apenas um *mating type* (*MATI-2*) em diferentes isolados de *P. citricarpa*, representando uma população clonal, enquanto na Austrália a proporção dos diferentes *mating type* foi também de 1:1 (WANG et al., 2016). Em Cuba foi realizado estudo semelhante buscando identificar a proporção dos diferentes *mating type* em pomares de laranja doce, tangerina e toranja. O resultado foi semelhante ao da Flórida, ou seja, apenas o *MATI-2* foi encontrado (SERRA et al., 2022). No entanto, não há estudos avaliando a proporção dos dois *mating type* de isolados obtidos do estado de São Paulo e nem para suas diferentes regiões, visto se tratar do maior produtor nacional de citros (FUNDECITRUS, 2021). A avaliação da proporção dos *mating type* em diferentes regiões de uma mesma área foi realizado apenas em trabalho realizado na China, que avaliou a proporção do *mating type* de isolados de *P. citriasiana*, agente causal de *tan spot* em pomelos (ZENG et al., 2021).

A produção de conídios de *P. citricarpa* para uso experimental está consolidada e os mesmos podem ser obtidos de diferentes formas. A mais comum é a adição de água destilada estéril sobre a colônia do patógeno crescida em BDA por 21 dias a 25°C com posterior raspagem superficial dessa colônia e filtragem dessa suspensão em gaze estéril. Com esse método pode-se produzir litros de suspensão na concentração de  $10^5$  conídios/mL com poucas placas contendo colônias esporulando. Outros meios e condições de incubação têm sido utilizados, como discos de folhas de citros autoclavadas e depositadas sobre meio ágar-água 3% a 25°C sob luz contínua (NORONHA, 2002) ou ½ BDA a 24°C sob fotoperíodo de 12 horas (WANG; DEWDNEY, 2019). As avaliações de germinação de conídios em laboratório geralmente são realizadas com

concentrações de  $10^4$  conídios/mL, enquanto a inoculação do patógeno via conídios em plantas são realizadas com  $10^5$  conídios/mL (FRANCO et al., 2020; FRARE et al., 2019; SAVI et al., 2018; TRAN et al., 2018; WANG; DEWDNEY, 2019). No entanto, a produção de ascósporos possui lacunas que precisam ser preenchidas em aspectos como a quantidade de ascósporos produzidos por cada metodologia, quando se inicia e termina a produção e como se comporta ao longo do tempo tal produção sob diferentes condições de cultivo e cruzamentos.

Os estudos publicados envolvendo ascósporos de *P. citricarpa* utilizaram esse tipo de inóculo proveniente de condições naturais, ou seja, folhas caídas em decomposição (McONIE, 1967) ou proveniente do ar para estudos de monitoramento (FOURIE et al., 2013). Porém, os ascósporos de *P. citricarpa* são morfologicamente similares aos das espécies endofíticas do gênero *Phyllosticta*, como *P. capitalensis*, a mais abundante entre elas (GUARNACCIA et al., 2019). Isso pode ter acarretado conclusões equivocadas em diferentes estudos de monitoramento de ascósporos no campo. Além disso, os sintomas de pinta preta observados por McOnie (1967), após inocular frutos e caule de limão, podem estar não somente associados com ascósporos, mas também com conídios, os quais são também produzidos e em maior proporção nas folhas caídas em decomposição, como descrito por Tran et al. (2020).

O primeiro ensaio que supostamente produziu ascósporos *in vitro* foi conduzido utilizando-se discos ou suspensão de micélio em meios de cultivo contendo folhas de limão e extrato de malte (MORAN LEMIR et al., 2000). Entretanto, apenas um isolado foi utilizado nesse estudo e não pode ser descartada a possibilidade de ser *P. capitalensis*, espécie homotática que produz ascósporos sem a necessidade de cruzar com isolados de *mating type* compatível (TRAN et al., 2017). Outro estudo avaliou a produção de ascósporos de diferentes cruzamentos de isolados de *mating type* compatíveis sobre folhas de citros depositadas em diferentes meios de cultivo (meio citros, ágar água 1,5%, aveia ágar, aveia ágar mais biotina e um meio completo) em duas temperaturas: 25°C e 28°C, mas não houve sucesso (AMORIM et al., 2016), o que poderia ser explicado pela incompatibilidade vegetativa comprovada em estudo posterior (TRAN et al., 2017).

O primeiro trabalho com uma metodologia robusta de produção de ascósporos de *P. citricarpa* foi conduzido por Tran et al. (2017). Esse estudo descreve uma metodologia eficiente de produção de ascósporos *in vitro* sem a presença de tecido do hospedeiro, bem como demonstra a compatibilidade sexual dos isolados de *mating type* compatíveis, a recombinação genética após os cruzamentos e a importância das espermácias na fertilização. A metodologia, denominada sanduíche, consistiu em colocar discos de micélio do isolado de um *mating type* sobre a colônia de outro isolado de *mating type* compatível, com posterior observação de

ascósporos ejetados na tampa das placas após duas semanas. A metodologia foi posteriormente modificada por Tran et al. (2018) para avaliar a patogenicidade de conídios e ascósporos de *P. citricarpa* em folhas e frutos de citrange Troyer. O método consistiu em adicionar água destilada estéril sobre a colônia de um isolado de *P. citricarpa* crescida em ½ BDA por duas semanas para liberação dos conídios e espermiócitos. Essa suspensão foi adicionada a outra placa contendo colônia de outro isolado de *mating type* compatível e os ascósporos foram observados na tampa da placa após duas semanas. Entretanto, ambos os estudos não tiveram como objetivo avaliar as condições que influenciam e permitem maior eficiência na produção dos ascósporos. O meio de cultivo e a temperatura podem ser considerados entre os principais fatores que influenciam a produção de esporos assexuados (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Em trabalhos anteriores aos de Tran et al. (2017), nos quais não se obteve sucesso na produção de ascósporos *in vitro*, esses dois fatores foram bem estudados na tentativa de ver seu efeito na produção de ascósporos de *P. citricarpa* (AMORIM et al., 2016; MORAN LEMIR et al., 2000; TIMOSSI et al., 2013). Outro fator que pode influenciar no comportamento da produção de ascósporos é o cruzamento utilizado, devido à variabilidade intrínseca de cada isolado.

Portanto, a identificação do *mating type* de isolados de *P. citricarpa* no estado de São Paulo é necessária, pois se supõe que ambos os *mating type* ocorram e, conseqüentemente, ambos os esporos sexuais e assexuais sejam produzidos nos pomares paulistas. Ascósporos de *Phyllosticta* foram coletados em armadilhas caça-esporos em pomares paulistas; entretanto, não há comprovação de que seriam ascósporos de *P. citricarpa* (REIS et al., 2006). Embora os estudos tenham mostrado como se produz ascósporos, ainda não se sabe o potencial de produção em diferentes condições de cultivo. Nesse contexto, os objetivos do presente estudo foram: identificar a frequência e verificar a proporção do *mating type* de 137 isolados monospóricos obtidos das três regiões do estado de São Paulo e avaliar a produção ao longo do tempo de ascósporos de diferentes cruzamentos de *Phyllosticta citricarpa* em diferentes meios de cultura e temperaturas.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Obtenção e seleção dos isolados de *P. citricarpa***

Um total de 137 isolados monospóricos de *P. citricarpa* foram obtidos de frutos sintomáticos de laranja doce coletados em pomares de três regiões citrícolas do estado de São Paulo (Apêndice). O patógeno foi obtido por isolamento indireto, que consistiu em desinfestar fragmentos de lesões de frutos por meio imersão em água destilada estéril por 2 minutos, em álcool 70% por 2 minutos, em hipoclorito de sódio por até 18 minutos e novamente em água

destilada estéril por 2 minutos. Os fragmentos desinfestados foram depositados sobre papel filtro estéril e posteriormente transferidos para placas contendo meio BDA acrescido de estreptomicina.

Culturas monospóricas dos isolados obtidos foram obtidas por meio da deposição de gotas de 50 µL de suspensão de  $10^3$  conídios/mL e posterior distribuição das mesmas sobre meio BDA. Após 24 a 36 horas, um conídio germinado foi coletado utilizando-se agulha acoplada ao microscópio óptico e transferido para placas contendo BDA. A identificação da espécie dos isolados monospóricos foi realizada pela observação borda amarela da colônia no meio aveia ágar e por meio de PCR de parte da região ITS e do gene do fator de alongação 1- $\alpha$  (MILES et al., 2013; BAAYEN et al., 2002). Os isolados monospóricos foram preservados em papel de filtro seco congelado (SILVA JUNIOR et al., 2016).

### 2.2.2 Identificação dos *mating type*

O micélio de colônias crescidas em BDA por 14 dias foi macerado em nitrogênio líquido até se obter 100 mg de micélio para se extrair o DNA. A extração foi realizada pela adição de 800 µL de tampão de extração (NaCl 0,25 M; EDTA 0,25 M; Tris-HCl 0,2 M pH 8,0; Sulfato Dodecil de Sódio - SDS 2%) nos microtubos com posterior vórtex; transferência dos microtubos para banho-maria a 65°C durante 40 minutos; adição de 400 µL de acetato de potássio 5M e homogeneização; incubação em gelo por 30 minutos; centrifugação a 12.000 rotações por minuto (rpm) e a 22°C por 10 minutos com posterior transferência do sobrenadante para novos microtubos; adição 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneização; repetição do passo da centrifugação, transferência e tratamento do sobrenadante nas mesmas condições anteriores por mais duas vezes e transferência da fase superior para novos microtubos e adição 1,5 µL de RNase (10 mg/L). Incubação a 37°C por 60 minutos, adição de 1 mL de etanol absoluto gelado e armazenamento a -80°C por uma hora para a precipitação do DNA. Posteriormente, centrifugou-se a 12.000 rpm por 20 minutos na temperatura de 4°C, descartou-se a fase líquida e adicionou-se 1 mL de etanol 70% gelado e fez-se a última centrifugação sob as mesmas condições por 10 minutos com descarte da fase líquida e posterior secagem do *pellet* em *speed vac*. O DNA foi hidratado com 80 µL de água. A quantidade (ng/µL) e pureza do DNA extraído foram verificadas no Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®).

A PCR foi realizada com um mix de volume final de 20 µL, que consistiu dos seguintes componentes: 13,8 µL de água livre de nuclease, 2 µL de tampão 1x Tris-HCl, 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (2mmol), 0,6 µL de dNTP's (0,15 mmol), 0,6 µL dos dois pares de primers (0,3 µmol) e 0,4 µL da Taq polimerase (2v) e 1 µL (100 ng) do DNA extraído. Os pares de primers utilizados foram

os desenhados por Wang et al.(2016), porém utilizados em PCR duplex. Como controles positivos foram utilizados dois isolados de *P. citricarpa*, um caracterizado previamente como *MATI-1* e outro como *MATI-2*. O controle negativo consistiu de DNA extraído de folha de laranja sadia e o NTC do mix sem adição de DNA. A reação da PCR foi realizada nas seguintes condições: pré-aquecimento a 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão 1x TAE usando a tensão de 110 V, com posterior visualização em aparelho transluminador com luz UV, utilizando-se brometo de etídio. O marcador utilizado foi o 1 Kb Plus da Invitrogen®.

A análise da proporção dos *mating type* foi realizada com o teste Qui-quadrado para verificar se a frequência de *MATI-1* e *MATI-2* é igual ou diferente de 1:1. O teste Qui-quadrado foi realizado a 5% de significância, sendo a hipótese nula a de que a proporção entre os dois *mating type* é igual a 1:1 (WANG et al., 2016). A proporção foi determinada para todos os isolados do parque citrícola paulista e também para isolados das regiões sul, centro e norte de São Paulo.

### **2.2.3 Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de ascósporos**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e em esquema fatorial duplo (5 x 5), com o primeiro fator composto por cinco meios de cultivo (batata dextrose ágar -BDA, ½ BDA, aveia ágar, meio citros ágar e extrato de malte ágar) e o segundo fator composto por cinco cruzamentos dos seguintes isolados: cruzamento 1 (GPF09GC.Trat. x TQ6), cruzamento 2 (P12GC x Sete Lagoas 6), cruzamento 3 (TQ 8 x GPF10GC.Trat.), cruzamento 4 (MG06GC x GPF30GC.Trat.) e cruzamento 5 (LRS 42/12 x Cambuhy 4) (Apêndice).

O meio BDA consistiu de 39g de meio/L (Difco®) e o ½ BDA consistiu de 19,5g de meio/L. O meio aveia ágar consistiu de 40 g/L de aveia em flocos finos (Apti®) e 14 g/L de ágar (Dinâmica®). O meio extrato de malte ágar consistiu de 25 g/L de extrato de malte (Difco®) e 20 g/L de ágar. O meio citros ágar foi preparado com 28 g/L de folhas de laranjeira ‘Valência’, 20 g/L de dextrose anidra (glucose) (Dinâmica®) e 15 g/L de ágar (AMORIM et al.,2016). Para produzir este meio, folhas de laranjeira ‘Valência’ foram coletadas em pomar, previamente lavadas em água destilada e maceradas com pistilo em almofariz contendo água destilada. Essa solução foi adicionada em um Erlenmeyer juntamente com os demais ingredientes para posterior autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

A replicagem foi realizada transferindo-se o isolado doador e receptor das espermácias



para placas de plástico (90x15 mm) contendo 15 mL de um dos cinco meios de cultivo e as placas foram mantidas em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 14 dias, o cruzamento dos isolados de *mating type* compatíveis foi realizado com a metodologia adaptada de Tran et al. (2018). Essa consistiu da adição de 5 mL de água destilada estéril sobre a colônia do isolado doador de espermiócitos crescido no meio a ser testado. A superfície da colônia foi raspada levemente utilizando-se alça de Drigalsky estéril para liberação das espermiócitos. Após 5 minutos a suspensão resultante foi pipetada e adicionada sobre as colônias dos isolados receptores de espermiócitos crescidos em 15 mL de um dos cinco meios de cultivo, sendo realizada uma leve raspagem da suspensão na superfície para molhar toda a superfície da colônia.

As placas com os isolados de *MATI-1* e *MATI-2* cruzados nos diferentes meios de cultivo foram armazenadas em temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. A cada sete dias após os cruzamentos, as tampas das placas foram retiradas para quantificação dos ascósporos ejetados e depois da coleta foram substituídas por outras esterilizadas. Em cada tampa foi adicionado 1 mL de Tween 20 na concentração de 0,02% para remoção dos ascósporos com o auxílio da alça de Drigalski (TRAN et al., 2018). Foi utilizada uma alíquota de 200 µL da suspensão de ascósporos coletada para a estimativa da concentração de ascósporos na câmara de Neubauer sob microscópio óptico. A estimativa da concentração de ascósporos nos diferentes meios de cultivo foi realizada até 35 dias após o cruzamento dos isolados. A área abaixo da curva de progresso da produção de ascósporos (AACPA) foi calculada para cada tratamento (CAMPBELL; MADDEN, 1990). O experimento foi repetido duas vezes.

Os dados da AACPA e da produção de ascósporos ao longo do tempo foram avaliados quanto à normalidade da distribuição e homogeneidade das variâncias dos erros pelos testes de Shapiro – Wilk e de Bartlett a 5% de significância, respectivamente. Como não foram atendidas essas pressuposições da análise de variância (ANAVA), mesmo após utilizar a transformação de Box-Cox, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar diferença e ao teste de comparação de medianas de Dunn, ambos a 5% de significância.. Análise de sobrevivência foi realizada para se identificar o início da produção de ascósporos, que foi considerado como o evento ou desfecho pela análise de Kaplan-Meier a 5% de significância. O teste de Log-Rank foi utilizado para verificar a diferença entre as curvas de sobrevivência e o de Holm-Sidak para comparar o tempo médio de sobrevivência entre as curvas, ambos a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas no programa Minitab 14. Os gráficos foram realizados no programa Sigmaplot 12.

#### **2.2.4 Produção de ascósporos sob diferentes temperaturas**

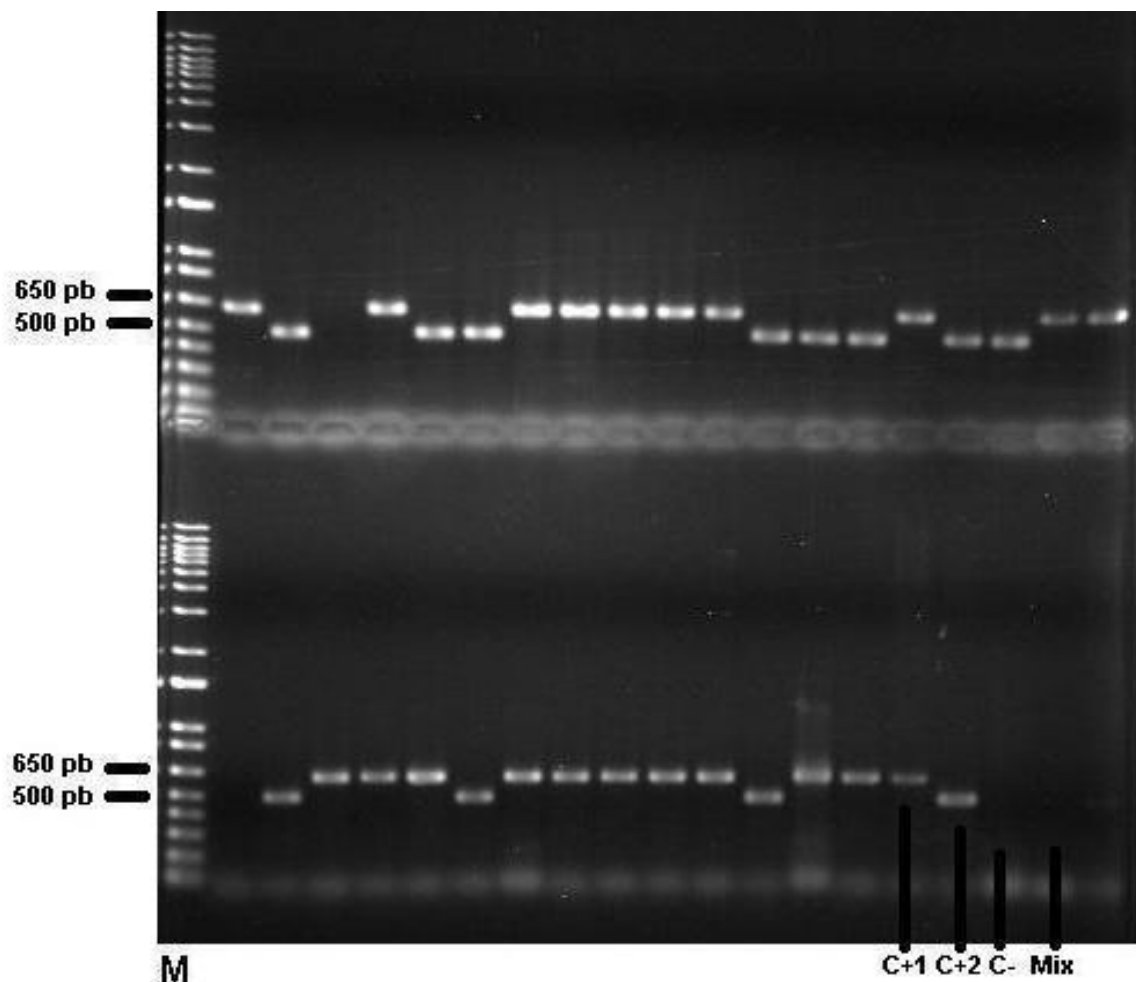
O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e em esquema fatorial duplo (5 x 3), com o primeiro fator composto por cinco temperaturas (10, 15, 20, 25 e 30°C) e o segundo fator pelos cruzamentos 2, 4 e 5 descritos anteriormente. Cada tratamento foi avaliado em seis repetições, sendo cada placa considerada uma repetição. As temperaturas das câmaras de crescimento foram registradas de hora em hora com termohigrômetros modelo LogBox-RHT-LCD (Novus®) durante o experimento para se obter a temperatura média e a variação. Os isolados foram cultivados por 14 dias em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas em meio de cultivo BDA (Difco®).

Os cruzamentos foram realizados com a mesma metodologia do experimento anterior. Após os cruzamentos, as placas foram transferidas para as câmaras com as diferentes temperaturas. A produção de ascósporos foi avaliada semanalmente até 56 dias após os cruzamentos. O experimento foi repetido duas vezes. A metodologia e análises estatísticas da produção de ascósporos foi a mesma utilizada no experimento de meios de cultivo.

### **2.3 Resultados**

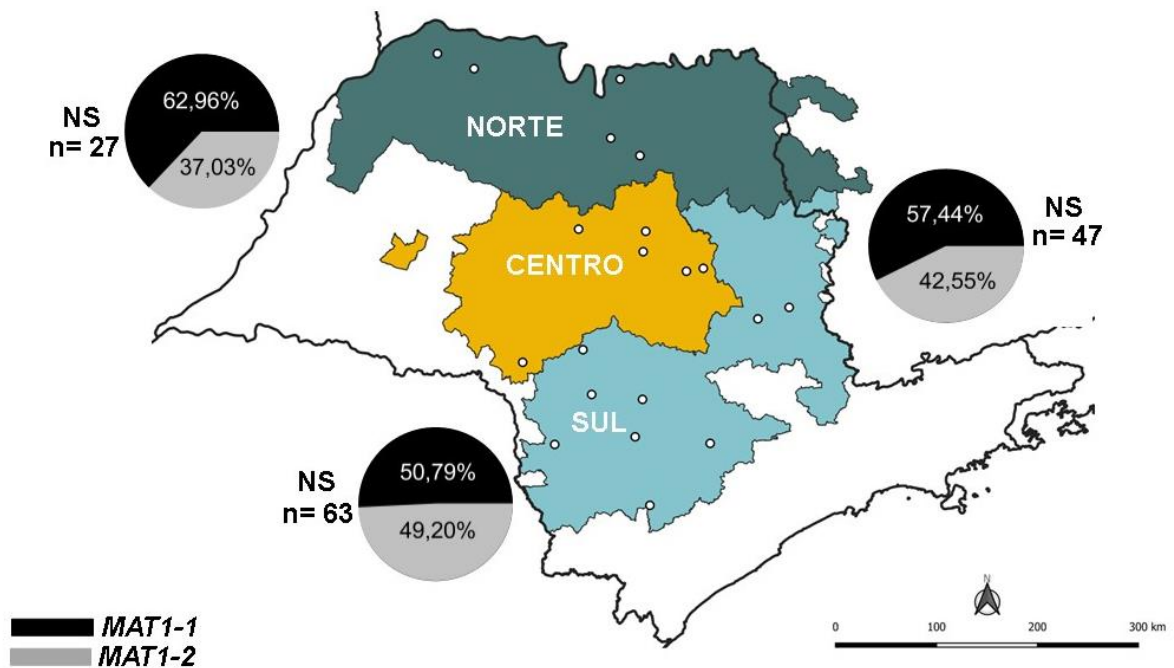
#### **2.3.1 Identificação e frequência do *mating type* de isolados de *P. citricarpa* no Estado de São Paulo**

O protocolo proposto com reação de PCR duplex foi eficiente na identificação dos *MATI-1* e *MATI-2*. Os 76 isolados referentes ao *MATI-1* apresentaram bandas de 630 pb, enquanto os 61 isolados de *MATI-2* formaram bandas de 500 pb (Fig. 1). Os pares de primers foram específicos e não se anelaram formando dímeros como observado pela formação de bandas específicas para os controles positivos e ausência no controle negativo e NTC (Fig. 1).



**Figura 1.** Resultado da PCR duplex em gel de eletroforese, utilizando-se os pares de primers Gcmat-1-56f e Gcmat1-686r para o *MATI-1* (630 pb) e Gcmat2-686f e Gcmat2-1185r para o *MATI-2* (500 pb) (WANG et al., 2016). C+1= controle positivo 1, C+2= controle positivo 2, C-= controle negativo, Mix= NTC, M= marcador (1Kb Plus, Invitrogen®).

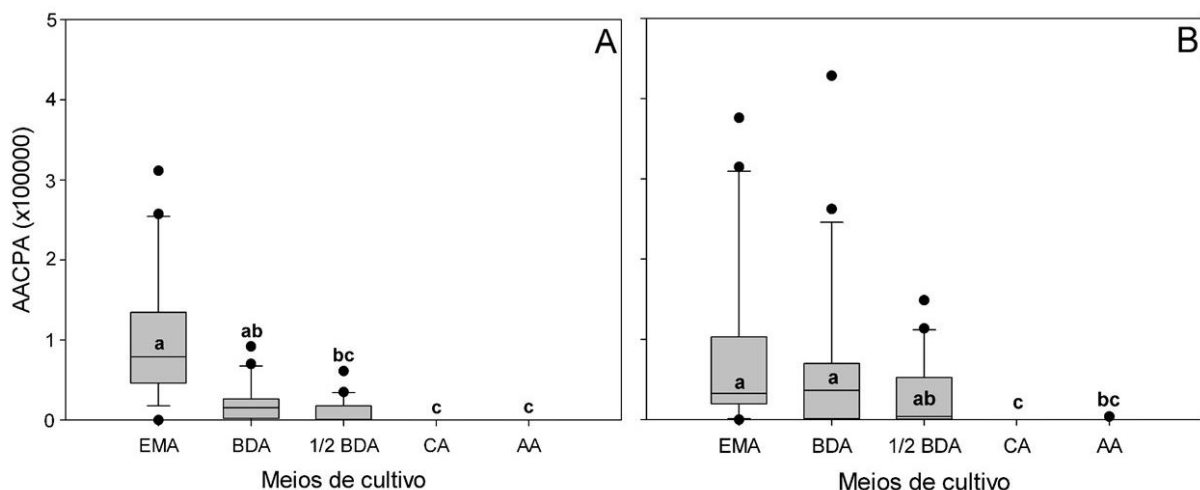
A proporção dos dois *mating type* dos isolados de todo o cinturão foi significativamente igual a 1:1 ( $p > 0,05$ ;  $\chi^2$  calculado: 1,64 <  $\chi^2$  tabelado: 3,84; GL=1), sendo 55% para o *MATI-1* (n=76) e de 45% para o *MATI-2* (n=61). O mesmo resultado foi obtido na comparação de proporções entre *mating types* em cada uma das três regiões de coleta de isolados no parque citrícola paulista. As frequências do *MATI-1* e *MATI-2* foram significativamente similares na região Norte ( $\chi^2$  calculado=1,81), com 63% (n=17) e 37% (n=10), no Centro ( $\chi^2$  calculado=1,04) com 51% (n=32) e 49% (n=31) e no Sul ( $\chi^2$  calculado=0,02) com 57% (n=27) e 43% (n=20) para os dois *mating types*, respectivamente (Fig. 2).



**Figura 2.** Frequência e proporção do *mating type* de isolados de *Phyllostica citricarpa* em diferentes regiões do cinturão citrícola do estado de São Paulo e coletados entre 1998 e 2021. NS: não significativo e as proporções dos dois *mating types* são significativamente iguais (1:1) pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância. “n” representa o número de isolados analisados de cada região. Círculos brancos no mapa representam os municípios onde foram coletados os isolados.

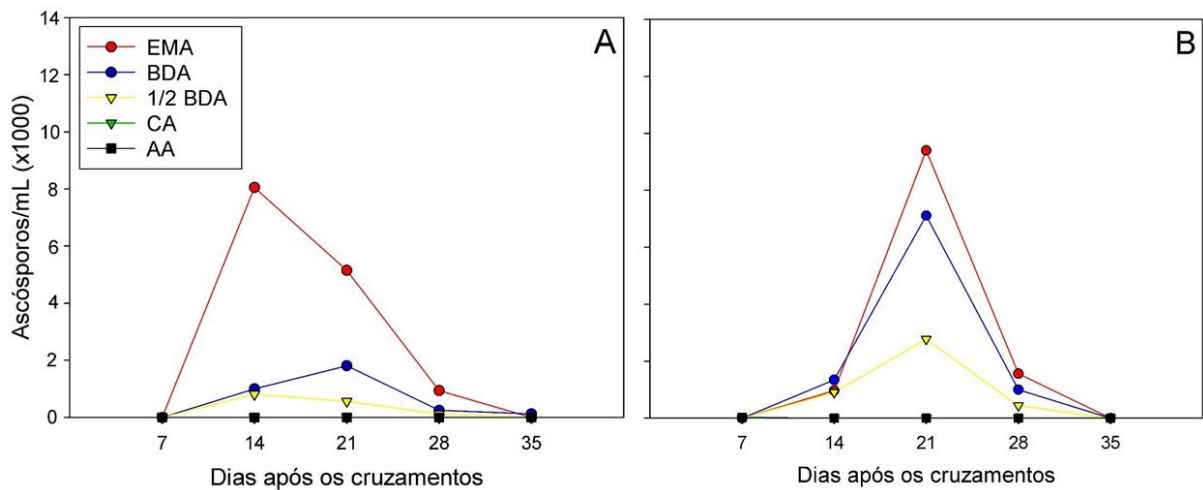
### 2.3.2 Produção de ascósporos em diferentes meios de cultivo

A produção de ascósporos *in vitro* ocorreu apenas nos meios BDA,  $\frac{1}{2}$  BDA e EMA para os cinco cruzamentos de isolados *MATI-1* e *MATI-2*. A produção de ascósporos nesses três meios variou de zero a  $5,6 \times 10^4$  ascósporos/placa ao longo dos 35 dias de avaliação após os cruzamentos. No primeiro experimento, a produção de ascósporos apresentou mediana da AACPA no meio EMA igual a 78.750, significativamente similar à mediana de 15.312 observada para o meio BDA, mas diferente de 0, valor estimado para o meio  $\frac{1}{2}$  BDA. Nos meios aveia ágar e citros ágar não foram produzidos ascósporos (Fig. 3A). No segundo experimento, as medianas da AACPA dos meios EMA (32.567), BDA (36.456) e  $\frac{1}{2}$  BDA (3.885) não diferiram entre si. A mediana da AACPA em aveia ágar e citros ágar foi similar a zero, uma vez que não foram produzidos ascósporos (Fig. 3B). Não houve diferença significativa na produção de ascósporos entre os diferentes cruzamentos em ambos os experimentos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 3.** Área abaixo da curva de produção de ascósporos (AACPA) estimada 35 dias após cinco cruzamentos de isolados de *Phyllosticta citricarpa* de *mating type* compatíveis em diferentes meios de cultivo (EMA: extrato de malte ágar; BDA: batata dextrose ágar; 1/2 BDA: BDA diluído pela metade; CA: citros ágar. AA: aveia ágar) avaliados em dois experimentos (A e B). Medianas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Dunn a 5% de significância.

No primeiro experimento, a presença de ascósporos nas tampas das placas foi observada 14 dias após os cruzamentos com pico médio de 8.050 ascósporos/placa de meio EMA. Neste mesmo meio, houve ejeção média de 5.150 e 938 ascósporos/placa aos 21 e 28 dias, respectivamente (Fig.4A). No meio BDA, houve produção média de 1.000 ascósporos/placa aos 14, pico de 1.812 esporos aos 21 e produção bem reduzida (250 ascósporos/placa) aos 28 dias. Em 1/2 BDA, pico médio de 812,5 ascósporos/placa foi observado na avaliação de 14 dias após os cruzamentos, e média de menos de 600 ascósporos foram observados nas placas após 21 e 28 dias. No segundo experimento, os picos de produção de ascósporos ocorreram nos três meios de cultivo na avaliação com 21 dias, sendo 9.402, 7.111 e 2.770 os valores médios de ascósporos observados para EMA, BDA e 1/2 BDA, respectivamente. Aos 14 e 28 dias, a produção média nos três meios foi inferior a 2.000 ascósporos/placa (Fig. 4B).

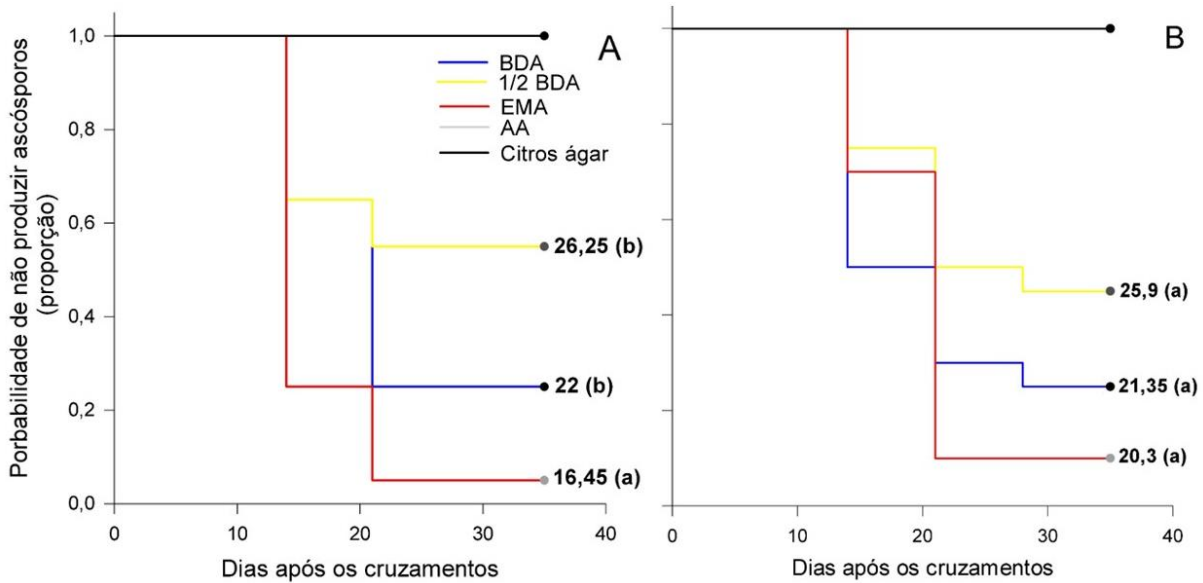


**Figura 4.** Produção média de ascósporos de *Phyllosticta citricarpa* por placa durante 35 dias após cinco cruzamentos de isolados de de *mating type* compatíveis em diferentes meios de cultivo (EMA: extrato de malte ágar; BDA: batata dextrose ágar; 1/2 BDA: BDA diluído pela metade) avaliados em dois experimentos (A e B).

Nos dois experimentos, a probabilidade de não produzir ascósporos foi igual a 100% para os meios aveia ágar e citros ágar até o fim das avaliações aos 35 dias (Fig. 5A e B). No primeiro experimento, a probabilidade de não produzir ascósporos no meio 1/2 BDA foi de 65% aos 14 dias, reduziu para 55% aos 21 dias e se manteve até os 35 dias de avaliação. No meio BDA, a probabilidade de não produzir ascósporos foi de 65% aos 14 dias, reduzindo para 25% aos 21 dias e se mantendo até o final das avaliações, enquanto no EMA foi de 25% aos 14 dias, com redução para 5% de 21 a 35 dias (Fig. 5A).

No segundo experimento, a probabilidade de não se produzir ascósporos no meio 1/2 BDA foi de 75% aos 14 dias, reduzindo para 50% aos 21 dias e para 45% de 28 a 35 dias após os cruzamentos, respectivamente. No meio BDA, a probabilidade foi de 50% aos 14 dias, 30% aos 21 dias e 25% de 28 a 35 dias, enquanto no EMA foi de 70% aos 14 dias, caindo para 10% aos 21 dias e se mantendo assim até o final das avaliações (Fig. 5B).

O tempo médio estimado pela análise de sobrevivência para iniciar a produção de ascósporos no meio EMA foi de 16,45 dias no primeiro experimento e diferiu significativamente de 22 e 26,25 dias estimados para BDA e 1/2 BDA, respectivamente. No outro experimento, os tempos médios variaram de 20,30 a 25,90 dias para os três meios e não diferiram entre si pelo teste de Holm-Sidak (Fig. 5A e B).



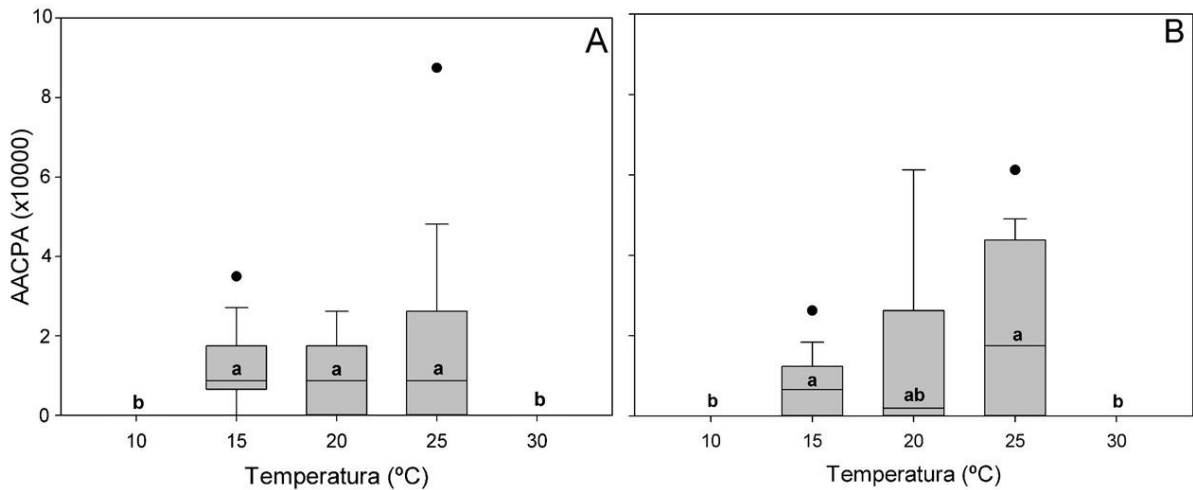
**Figura 5.** Estimativa das curvas de Kaplan-Meier pela análise de sobrevivência, descrevendo a probabilidade (proporção) de não haver ascósporos em placas contendo cruzamentos de isolados de *Phyllosticta citricarpa* em diferentes meios de cultivo (EMA: extrato de malte ágar; BDA: batata dextrose ágar; 1/2 BDA: BDA diluído pela metade) avaliados em dois experimentos (A e B). Valores do tempo médio para iniciar a produção de ascósporos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Holm-Sidak a 5% de significância.

No meio EMA, 75% das placas produziram ascósporos aos 14 dias, enquanto 20% iniciaram na avaliação de 21 dias e os 5% restantes não produziram ascósporos. Para o meio BDA, 35% das placas iniciaram a produção de ascósporos aos 14 dias, 40% aos 21 dias e 25% não produziram em nenhum momento, enquanto no meio 1/2 BDA, 35% e 10% das placas iniciaram a produção aos 14 dias e 21 dias, respectivamente. No segundo experimento, 30% e 60% das placas iniciaram a produção aos 14 e 21 dias, respectivamente no meio EMA. Para os meios BDA e 1/2 BDA, a produção iniciou aos 14, 21 e 28 dias após os cruzamentos para, respectivamente, 50%, 20% e 0,5% das placas com BDA e 25%, 25% e 0,5% com 1/2 BDA.

### 2.3.3 Produção de ascósporos em diferentes temperaturas

A produção de ascósporos *in vitro* foi similar para os três cruzamentos de isolados de *MATI-1* e *MATI-2* avaliados nos dois experimentos ( $p > 0,05$ ). A produção ocorreu nas temperaturas de 15°C, 20°C e 25°C para todos os cruzamentos de isolados de *MATI-1* e *MATI-2* avaliados, não sendo observados esporos sexuais de *P. citricarpa* nas temperaturas mais extremas testadas de 10°C e 30°C (Fig. 6). A produção de ascósporos nas temperaturas de 15°C a 25°C variou ao longo dos 56 dias de avaliação de zero a 3.800 ascósporos/placa. No primeiro experimento, as medianas da AACPA nas temperaturas de 15°C, 20°C e 25°C foram todas iguais a 8.750, e não diferiram entre si, mas foram diferentes dos valores medianos estimados para

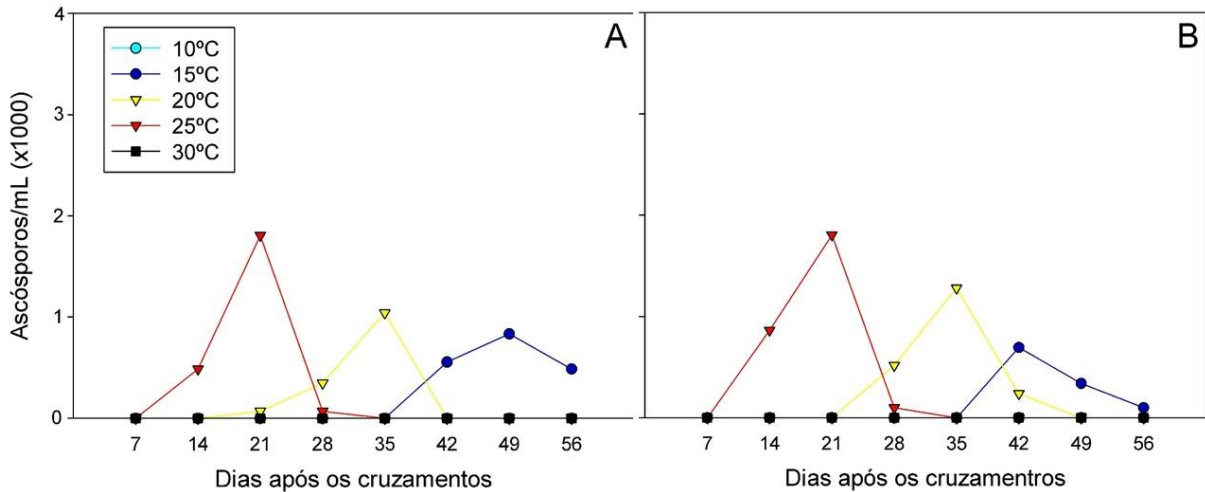
10°C e 30°C, nas quais não foram produzidos ascósporos (Fig. 6A). No segundo experimento também não houve diferenças significativas entre as medianas da AACPA para as temperaturas de 15°C, 20°C e 25°C, que foram de 6.562, 1.942 e 17.500, respectivamente (Fig. 6B).



**Figura 6.** Área abaixo da curva de produção de ascósporos (AACPA) estimada 56 dias após três cruzamentos de isolados de *Phyllosticta citricarpa* de *mating type* compatíveis em diferentes temperaturas avaliadas em dois experimentos (A e B). Medianas seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Dunn a 5% de significância.

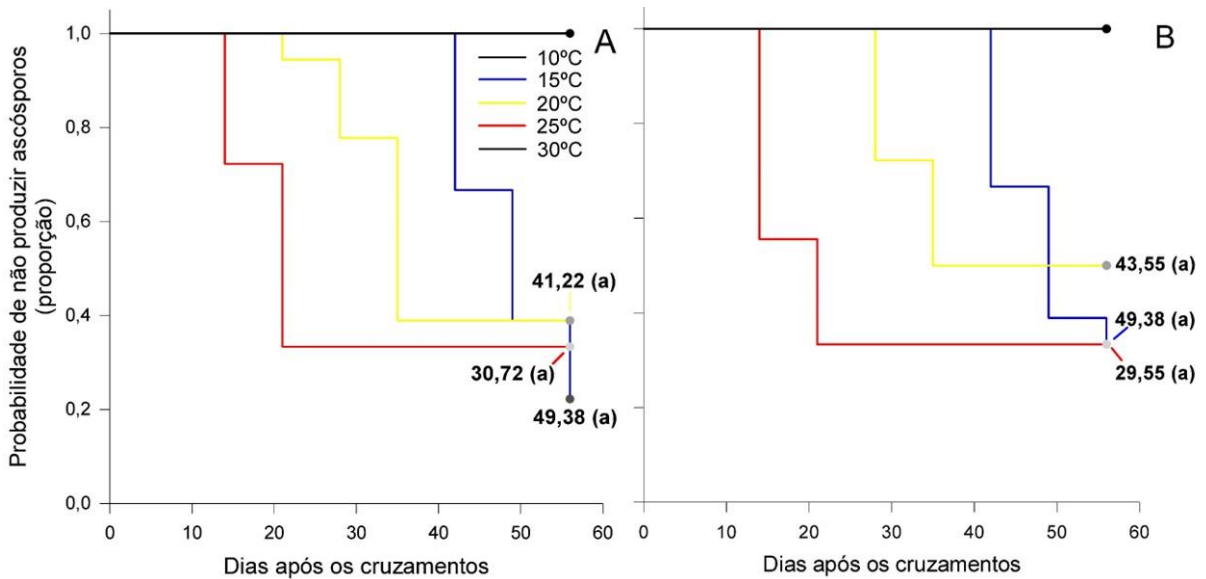
Nos dois experimentos, a presença de ascósporos ejetados nas tampas das placas contendo BDA foi inicialmente observada a 25°C na avaliação do 14º dia após os cruzamentos (486 e 864 ascósporos/placa nos experimentos 1 e 2, respectivamente) e picos médios de 1.805 (experimento 1) e 864 (experimento 2) ascósporos/placa aos 21 dias nessa temperatura (Fig. 7A). Na temperatura de 20°C, a produção iniciou com média de 347 e 516 ascósporos/placa aos 28 dias e picos médios de 1.041 e 1.280 ascósporos/placa aos 35 dias no primeiro e segundo experimento, respectivamente. A produção de ascósporos iniciou mais tardiamente (aos 42 dias) e em menor quantidade na temperatura de 15°C quando comparada com as temperaturas de 20°C e 25°C, com picos médios de 555 ascósporos/placa aos 49 dias, no primeiro experimento, e de 694 ascósporos/placa aos 42 dias, no segundo experimento (Fig. 7B).





**Figura 7.** Produção média de ascósporos de *Phyllosticta citricarpa* por placa durante 56 dias após três cruzamentos de isolados de *mating type* compatíveis em diferentes temperaturas avaliadas em dois experimentos (A e B).

A análise de sobrevivência mostrou que a probabilidade de não produzir ascósporos foi igual a 100% para as temperaturas de 10°C e 30°C até a última avaliação aos 56 dias nos dois experimentos realizados (Fig. 8). A probabilidade de não produzir ascósporos a 15°C nos dois experimentos foi de 66% aos 42 dias e 39% aos 49 dias, reduzindo para 22% (experimento 1) ou 33% (experimento 2) aos 56 dias. Na temperatura de 20°C, a probabilidade foi de 94% e 77% aos 21 e 28 dias, respectivamente, atingindo 39% de 35 a 56 dias no primeiro experimento, enquanto que no outro experimento foi de 72% aos 28 dias e 50% de 35 a 56 dias após os cruzamentos. Na temperatura de 25°C, a probabilidade de não encontrar ascósporos nas placas foi de 72% a 55% aos 14 dias, com redução para 33% de 21 a 56 dias nos dois experimentos (Fig. 8).



**Figura 8.** Estimativa das curvas de Kaplan-Meier pela análise de sobrevivência, descrevendo a probabilidade (proporção) de não haver ascósporos em placas contendo cruzamentos de isolados de *Phyllosticta citricarpa* em diferentes temperaturas avaliadas em dois experimentos (A e B). Valores do tempo médio para iniciar a produção de ascósporos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Holm-Sidak a 5% de significância

Na temperatura de 25°C foram observadas 27,77% das placas com ascósporos aos 14 dias, enquanto 38,88% delas iniciaram a produção na avaliação de 21 dias e o restante não produziu ascósporos no primeiro experimento. A 20°C, média de 5,55%, 16,66% e 38,88% das placas continham ascósporos nas avaliações de 21, 28 e 35 dias, enquanto na temperatura de 15°C, ascósporos foram observados mais tardiamente aos 42, 49 e 56 dias em 33,33%, 27,77% e 16,66% das placas, respectivamente. No segundo experimento, 44,44% e 22,22% das placas mantidas a 25°C iniciaram a produção aos 14 e 21 dias, respectivamente, e as demais não produziram ascósporos, ao passo que a 20°C, os esporos foram observados nas tampas de 27,77% 22,22% das placas aos 28 e 35 dias, respectivamente. Na temperatura de 15°C, a produção novamente foi observada nas avaliações com 42, 49 e 56 dias após os cruzamentos para, respectivamente, 33,33%, 27,77% e 5,55% das placas.

## 2.4 Discussão

A distribuição dos *mating type* de *P. citricarpa* foi caracterizada para as diferentes regiões produtoras de citros do estado de São Paulo e a proporção de 1:1 do *MATI-1* e *MATI-2* foi encontrada para os quase 140 isolados coletados nas últimas décadas em pomares comerciais de laranja doce do principal parque citrícola brasileiro. Em laboratório, os experimentos conduzidos com diferentes meios de cultivo e temperatura mostraram que a produção artificial de ascósporos atinge picos de até  $10^3$  ascósporos/placa entre 14 e 21 dias

após cruzamento dos *mating types* com a utilização dos meios EMA ou BDA em temperatura em torno de 25°C.

A proporção similar de isolados de *MATI-1* e *MATI-2* já havia sido relatada no Brasil com isolados coletados majoritariamente no estado do Paraná e alguns de São Paulo (AMORIM et al., 2016), bem como na África do Sul, Austrália e China (CARSTENS et al., 2017). A presença de ambos os *mating types* em proporções similares nas regiões Norte, Centro e Sul do parque citrícola paulista relatada em nosso estudo demonstra que a reprodução sexuada de *P. citricarpa* pode ocorrer em todas essas regiões e que ascósporos capturados em estudos conduzidos com armadilhas caça-esporos podem ter sido deste patógeno e não somente da espécie endofítica *P. capitalensis* (REIS et al., 2006; FIALHO, 2021). Por outro lado, em pomares de citros da Flórida (EUA) e de Cuba, apenas o *MATI-2* foi identificado nas populações de *P. citricarpa* (WANG et al., 2016; SERRA et al., 2021) e ascósporos ainda não encontrados nessas regiões produtoras de citros.

A presença do *MATI-1* e *MATI-2* nos pomares de citros tem impacto direto no manejo da pinta preta, uma vez que os esporos sexuais e assexuais se disseminam de formas diferentes. Os conídios produzidos assexuadamente se dispersam a curtas distâncias por respingos de chuva e o padrão de distribuição espacial da pinta preta nos pomares apenas com esse inóculo tende a ser mais agregado (SPÓSITO et al., 2008;2011). A produção exclusiva de esporos assexuais ocorre na Flórida, o que explicaria a presença de sintomas de pinta preta em pomares localizados em menos de 60 km<sup>2</sup> ao redor de Immokalee uma década após o primeiro relato da doença neste condado (SCHUBERT et al., 2012; IFAS, 2022). Em regiões citrícolas do Brasil, África do Sul e Austrália, nas quais os ascósporos são produzidos (AMORIM et al., 2016; CARSTENS et al., 2017) e disseminados pelo vento a maiores distâncias (SPÓSITO et al., 2007), a pinta preta tende a se espalhar para áreas mais distantes do local onde o patógeno foi introduzido inicialmente. No Brasil, a doença foi relatada em 1980 no Rio de Janeiro, 1986 no Rio Grande do Sul e em 1992 em São Paulo, de onde se espalhou para todas as regiões produtoras na década seguinte à sua introdução (SILVA JUNIOR et al., 2016). Nessas regiões com a presença de dois *mating types*, o manejo deve incluir medidas que atuem sobre as folhas caídas no solo, de forma a interferir na sobrevivência e reprodução sexuada de *P. citricarpa* e reduzir a disseminação dos ascósporos para outras plantas e pomares vizinhos.

A ocorrência dos dois *mating types* e reprodução sexuada pode favorecer o surgimento de isolados com menor sensibilidade a fungicidas em função do aumento da variabilidade genética (BRENT; HOLLOMON, 2007). Na literatura há relatos de redução de sensibilidade de *P. citricarpa* para o grupo químico de fungicidas metil benzimidazol carbamato (MBC) em

regiões produtoras do Brasil e da África do Sul (HERBERT, 1985; RODRIGUES et al., 2007), nas quais os dois *mating types* foram reportados (AMORIM et al., 2016; CARSTENS et al., 2017). Em outros patossistemas, como é o caso de *Phytophthora infestans* em tomateiro e batateira, a introdução do *mating* A2 afetou a sensibilidade da população de isolados desse oomiceto ao fungicida metalaxyl (DRENTH; TURKENSTEEN; GOVERS, 1993).

A produção de ascósporos de *P. citricarpa* foi caracterizada em nosso estudo para diferentes meios de cultivo comumente descritos na literatura para o cultivo desse patógeno. Os meios de cultivo podem ser formulados de diferentes formas, sejam os sintéticos ou os naturais, o que afeta tanto o crescimento quanto a esporulação dos fungos em condições laboratoriais (DHINGRA; SINCLAIR, 1995; RODRIGUES et al., 2010; SCHISLER, 1991). Porém, a influência dos meios de cultivo sobre a produção de esporos sexuais ainda é pouco estudada (BARNETT; LILLY, 1956; PRUSSIN et al., 2014; PFENDER, 1987). Pesquisas realizadas com o gênero *Phyllosticta* demonstraram ser possível produzir ascósporos em diferentes meios de cultivo em laboratório (MORAN LEMIR et al., 2000; AMORIM et al., 2016). Entretanto, alguns desses trabalhos foram realizados com a espécie endofítica *P. capitalensis*, que é reportada como sendo homotática. Como a espécie patogênica *P. citricarpa* é heterotática, apenas em 2017, por meio de cruzamentos de *mating types* diferentes em meio de cultivo ½ BDA, foi possível obter ascósporos *in vitro* (TRAN et al., 2017). Nossos resultados demonstram que é possível potencializar essa produção em meio EMA, embora a quantidade de ascósporos produzida na maioria das tampas das placas contendo esse meio não tenha ultrapassado  $10^4$  (10.000 ascósporos). Essa reduzida quantidade de ascósporos produzida por placa em relação a de conídios pode dificultar a condução de pesquisas com inoculação da fase sexuada deste patógeno, as quais têm sido realizadas com  $10^5$  (100.000) conídios produzidos facilmente em poucas placas com meio BDA (FIALHO et al., 2021).

Os meios EMA e BDA foram selecionados para esse estudo por serem os principais utilizados para o crescimento de *P. citricarpa* em laboratório. Embora esses dois meios tenham sido os melhores para produção de ascósporos em comparação com ½ BDA, aveia ágar e citros ágar, não houve uma produção homogênea em todas as placas. A produção e liberação de ascósporos se mostrou variável mesmo em condições controladas, já que algumas placas apresentaram picos de produção aos 14 dias e outras apenas com 28 dias. Essa variação dificultou o ajuste dos dados ao modelo beta-generalizado, inicialmente planejado com o objetivo de estimar a temperatura ótima. Esse fator também pode dificultar a realização de pesquisas que demandem a produção de ascósporos em grandes quantidades. Essa variação na produção de ascósporos pode ter ocorrido por diferentes motivos, incluindo a viabilidade das

espermácias das colônias utilizadas ou outros fatores ainda desconhecidos que podem ser investigados em trabalhos futuros.

Em pomares de citros, a ejeção de ascósporos ocorre apenas nas folhas caídas no solo e em condições de alternância de molhamento e secagem (KIELY, 1948; KOTZÉ 1963; KOTZÉ, 2000). O meio citros ágar foi escolhido por utilizar folhas do hospedeiro, já que em outros trabalhos realizados com diferentes patógenos visando induzir a produção de esporos, o uso de tecido do hospedeiro ou o próprio órgão do hospedeiro foi uma estratégia comum (DHINGRA; SINCLAIR, 1995; MORAN LEMIR et al., 2000; CARVALHO et al., 2008; AMORIM et al., 2016). Como o meio de cultivo é submetido a um processo de esterilização (autoclavagem), degradação de componentes importantes presentes na folha pode ter ocorrido e inibido a produção de ascósporos. O meio aveia ágar foi escolhido por ser utilizado na identificação de *P. citricarpa* e o fungo apresentar maior crescimento micelial em comparação ao meio BDA (BAAYEN et al., 2002; BALDASSARI; WICKERT; GOES, 2007), porém, nenhum ascósporo foi encontrado nas tampas das placas contendo esse meio. Estudos futuros poderiam ser realizados com outros meios de cultivo e/ou outras condições de estresse a fim de estabelecer um protocolo de produção de mais ascósporos de forma mais homogênea e em concentrações mais elevadas.

A temperatura tem sido reportada como um fator que afeta a produção de esporos sexuais *in vitro* e *in vivo* (WAUGH et al., 2003; DUFAULT et al., 2006). Em nosso estudo, a faixa de temperatura para a produção de mais de 500 ascósporos/placa foi de 15°C a 25°C. Essas temperaturas estão dentro da faixa de 13,4°C e 37,2°C, consideradas como temperaturas mínima e máxima, respectivamente, nas quais ascósporos de *P. citricarpa* foram capturados em pomares na África do Sul, sendo a mediana estimada em 23,6°C (FOURIE et al., 2013). No estado de São Paulo, os esporos de *P. citricarpa* são produzidos em maior quantidade durante o verão, período em que as temperaturas são mais altas (média de 23°C a 26°C) comparadas com outono e inverno que apresentam médias inferiores a 23°C (FIALHO, 2021). Em nosso estudo, a produção de ascósporos foi avaliada com temperatura constante ao longo do dia; porém, em condições de campo há variação da temperatura ao longo do dia. A produção máxima de ascósporos na temperatura média de 25°C ocorreu aproximadamente na metade do tempo em comparação com a de 15°C. Pesquisas futuras poderiam ser realizadas com base em dados meteorológicos de diferentes regiões citrícolas do mundo a fim de estabelecer o potencial de produção e liberação de ascósporos nas mesmas. Além da temperatura, outros fatores como intensidade luminosa, métodos de cruzamento, umidade relativa e tipos de estresse poderiam ser analisados em estudos com produção de esporos sexuais desse patógeno.

A produção de ascósporos em todos os experimentos com diferentes meios de cultivo e temperaturas foi semelhante para todos os cruzamentos com isolados de regiões citrícolas distintas de SP. Foram utilizados cruzamentos com isolados das regiões Centro e Sul do cinturão citrícola, que apresentam condições climáticas semelhantes, sendo verão quente e chuvoso e inverno seco e frio, com cerca de 1300-1600 mm de chuva anuais (ALVARES et al., 2013), o que pode explicar a produção similar de ascósporos nas diferentes temperaturas.

Nossos resultados mostraram que os dois esporos de *P. citricarpa* podem ser formados no parque citrícola de SP, uma vez que ambos *mating types* estão presentes nas diferentes regiões de citros. A produção *in vitro* de ascósporos de *P. citricarpa* se mostrou viável, porém mais variável e em menor quantidade comparada com a produção de conídios. A produção de ascósporos desse patógeno pode ser otimizada por meio de cruzamento de isolados dos *mating types* *MATI-1* e *MATI-2* com a técnica da suspensão de espermácias em meio EMA ou BDA, sob temperatura de 25°C com coleta de ascósporos entre 14 e 28 dias após os cruzamentos. Portanto, essas informações obtidas aqui serão úteis para a realização de pesquisas que envolvam ambos os inóculos de *P. citricarpa* a fim de melhor compreender o ciclo e otimizar o manejo da pinta preta.

## Referências

- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 1 dez. 2013.
- AMORIM, R.; SAVI, D. C.; FERREIRA-MABA, L.; ALUIZIO, R.; GOULIN, E. H.; TAKITA, M. A.; MACHADO, M. A.; GLIENKE, C. MAT gene idiomorphs suggest a heterothallic sexual cycle in the citrus pathogen *Phyllosticta citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, n. 2, p. 325-337, 2016.
- AYLOR, D. E. The Aerobiology of Apple Scab. **Plant Disease**, v. 82, n. 8, p. 838-849, ago. 1998.
- BARNETT, H. L.; LILLY, V. G. Factors Affecting the Production of Zygosporangia by *Choanephora Cucurbitarum*. **Mycologia**, v. 48, n. 5, p. 617-627, 1956.
- BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; AA, H. A. van D.; WEERDT, M. de; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI, W.; BLANCO, C. G. Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, n. 5, p. 464-477, maio 2002.

- 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**, v. 120, n. 2, p. 103-110, 22 nov. 2007.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: consequências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 119-127, 2001.
- BRENT, K. J.; HOLLomon, D. W. **Fungicide Resistance in crop pathogens: how can it be managed?** 2. ed. Brussels: Newline Graphics, 2007. 60 p.
- CARVALHO, D. D. C.; ALVES, E.; BATISTA, T. R. S.; CAMARGOS, R. B.; LOPES, E. A. G. L. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 792-798, 2008.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 523 p.
- CARSTENS, E.; LINDE, C. C.; SLABBERT, R.; MILES, A. K.; DONOVAN, N. J.; LI, H.; ZHANG, K.; DEWDNEY, M. M.; ROLLINS, J. A.; GLIENKE, C.. A Global Perspective on the Population Structure and Reproductive System of *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology**, v. 107, n. 6, p. 758-768, jun. 2017.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.
- DRENTH, A.; TURKENSTEEN, L. J.; GOVERS, F.. The occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in the Netherlands; significance and consequences. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 3, p. 57-67, 1993.
- DUFAULT, N. S.; WOLF, E. D. de; LIPPS, P. E.; MADDEN, L. V.. Role of Temperature and Moisture in the Production and Maturation of *Gibberella zea* Perithecia. **Plant Disease**, v. 90, n. 5, p. 637-644, maio 2006.
- IFAS. **Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida**. 2022. Disponível em: < <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/CG088> > Acesso em: 10 dez. 2022.
- FOURIE, P.; SCHUTTE, T.; SERFONTEIN, S.; SWART, F. Modeling the Effect of Temperature and Wetness on *Guignardia pseudothecium* Maturation and Ascospore Release in Citrus Orchards. **Phytopathology**, v. 103, n. 3, p. 281-292, 2013.
- FRANCO, D.; GOES, A.; PEREIRA, F. D. Sources and concentrations of cupric fungicides for the control of citrus black spot. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 1, p. 1-8, 2020.
- FRARE, G. F.; SILVA JUNIOR, G. J.; LANZA, F. E.; BASSANEZI, R. B.; RAMIRES, T. G.; AMORIM, L. Sweet Orange Fruit Age and Inoculum Concentration Affect the Expression of Citrus Black Spot Symptoms. **Plant Disease**, v. 103, n. 5, p. 913-921, 2019.

- FUNDECITRUS, 2021. Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: retrato dos pomares em março de 2021. **Fundo de Defesa da Citricultura...** [et al.]. – Araraquara, SP : Fundecitrus, 2021. 142p.
- GUARNACCIA, V.; GEHRMANN, T.; SILVA-JUNIOR, G. J.; FOURIE, P. H.; HARIDAS, S.; VU, D.; SPATAFORA, J.; MARTIN, F. M.; ROBERT, V.; GRIGORIEV, I. V. *Phyllosticta citricarpa* and sister species of global importance to Citrus. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 12, p. 1619-1635, 2019.
- HERBERT, J. A.. A Strain of *Guignardia citricarpa*, the Citrus Black Spot Pathogen, Resistant to Benomyl in South Africa. **Plant Disease**, v. 69, n. 11, 1985.
- KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* and its relation to black spot of citrus. **Proc. Linn. Soc. of New South Wales**, v. 73, p. 249-292, 1948.
- 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.** 143f. PhD Thesis. Pretoria: University of Pretoria, South Africa, 1963.
- KOTZÉ, J.M. Black spot. In L. W. Timmer, S. M. Garnsey, & J. H. Graham (Eds.), **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. St. Paul: APS Press. pp. 23–25. 2000.
- MILES, A. K.; TAN, Y. P.; TAN, M. K.; DONOVAN, N. J.; GHALAYINI, A.; DRENTH, A. *Phyllosticta* spp. on cultivated Citrus in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, n. 4, p. 461-467, 2013.
- McONIE K.C. Germination and infection of citrus by ascospore of *G. citricarpa*, in relation to control of black spot. **Phytopathology**, v.57, p.743-746,1967.
- MONDAL, S. N.; HOWD, D. S.; BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W. Mating and Pseudothecial Development in *Mycosphaerella citri*, the Cause of Citrus Greasy Spot. **Phytopathology**, v. 94, n. 9, p. 978-982, 2004.
- MORAN L. A., S. M.; BUCHENAUER, H.; CANTON, N. *In vitro* production of ascospores and pathogenicity of *Guignardia citricarpa*, causal agent of citrus black spot. **Summ. Phytopathol.** v.26, p.374-376, 2000.
- NORONHA, M. A.. **Escala diagramática para avaliação da mancha preta em folhas de citros e efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* McAlp (Van De Aa)].** 2002. 67 f. Dissertação (Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- PETTERS-VANDRESEN, D.A.L.; ROSSI, B.J.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W.; MACHADO, M.A.; STUKENBROCK, E.H.; GLIENKE, C.. Mating-type locus rearrangements and shifts in thallism states in Citrus-associated *Phyllosticta* species. **Fungal Genetics And Biology**, v. 144, 2020.



- PFENDER, W. F.. Production of Pseudothecia and Ascospores by *Pyrenophora tritici-repentis* in Response to Macronutrient Concentrations. **Phytopathology**, v. 77, n. 8, p. 1213, 1987.
- PRUSSIN, A. J.; SZANYI, N. A.; WELLING, P. I.; ROSS, S. D.; SCHMALE, D. G. Estimating the Production and Release of Ascospores from a Field-Scale Source of *Fusarium graminearum* Inoculum. **Plant Disease**, v. 98, n. 4, p. 497-503, abr. 2014.
- REIS, R.F.D.; TIMMER, L.W.; GOES, A. Effect of temperature, leaf wetness and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.1, p. 29-34, 2006.
- RODRIGUES, M. B. C.; ANDREOTE, F. D.; SPÓSITO, M. B.; AGUILLAR-VILDOSO, C. I.; ARAĐJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 323-327, mar. 2007.
- RODRIGUES, T.T.M.S; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; MIZUBUTI, E.S.G. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 4, p. 203-212, ago. 2010.
- SAVI, D. C.; SHAABAN, K. A.; GOS, F. M. W.; THORSON, J. S.; GLIENKE, C.; ROHR, J. Secondary metabolites produced by *Microbacterium* sp. LGMB471 with antifungal activity against the phytopathogen *Phyllosticta citricarpa*. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 3, p. 453-460, 2018.
- SERRA, W; ÁLVAREZ, M. B. L.; RODRÍGUEZ, D. G.; ALONSO-OLIVA, E.; LIORRENTE, A. S.; GUARNACCIA, V.; CARSTENS, E.; ROLLINS, J. A.; THUIS, S.; VANGROSVELD, J.; LEÓN, A. M. M. Polyphasic identification and *MAT1-2* isolates of *Phyllosticta citricarpa* in Cuba. **European Journal of Plant Pathology**, 2022.
- SCHISLER, D. A.. Influence of Nutrition During Conidiation of *Colletotrichum truncatum* on Conidial Germination and Efficacy in Inciting Disease in *Sesbania exaltata*. **Phytopathology**, v. 81, n. 4, p. 458, 1991.
- 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**, v. 96, n. 8, p. 1225-1225, ago. 2012.
- SILVA JUNIOR, G.J.; FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; GOES, A. **Pinta preta: a doença e seu manejo**. Araraquara, SP: Fundecitrus, 2016. 208p.
- SOARES-COLLETTI, A. R.; ALVARES, C. A.; SENTELHAS, P. C. An agro-climatic approach to determine citrus postbloom fruit drop risk in Southern Brazil. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 6, p. 891-905, 2016.
- SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. **Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 103-108, 2008.

- 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**, v.30, n.12, p.1.546-1.552, 2011.
- SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; RIBEIRO Jr, P.J.; BASSANEZI, R.B.; KRAISNKI, E.T. Spatial patterns of trees affected by black spots in citrus groves in Brazil. **Plant Disease**, v. 91, n. 1, p. 36-40, 2007.
- TIMOSSI, A. J.; GOES, A.; KUPPER, K. C.; BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F. . Influência da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 489-494, 2003.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; DIETZGEN, R. G.; DEWDNEY, M. M.; ZHANG, K.; ROLLINS, J. A.; DRENTH, A. Sexual Reproduction in the Citrus Black Spot Pathogen, *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology**, v. 107, n. 6, p. 732-739, 2017.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; DIETZGEN, R. G.; SHUEY, T. A.; MUDGE, S. R.; PAPACEK, D.; CHANDRA, K. A.; DRENTH, A. Inoculum Dynamics and Infection of Citrus Fruit by *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology**, v. 110, n. 10, p. 1680-1692, 2020.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; SMITH, M. W.; DIETZGEN, R. G.; DRENTH, A. Pathogenicity of *Phyllosticta citricarpa* Ascospores on *Citrus* spp. **Plant Disease**, v. 102, n. 7, p. 1386-1393, 2018.
- WANG, N.; DEWDNEY, M. M. The Effects of Nutrition and Environmental Factors on Conidial Germination and Appressorium Formation of *Phyllosticta citricarpa*, the Causal Agent of Citrus Black Spot. **Phytopathology**, v. 109, n. 4, p. 650-658, 2019.
- WANG, N.; ZHANG, K.; HUGUET-TAPIA, J. C.; ROLLINS, J. A.; DEWDNEY, M. M. Mating Type and Simple Sequence Repeat Markers Indicate a Clonal Population of *Phyllosticta citricarpa* in Florida. **Phytopathology**, v. 106, n. 11, p. 1300-1310, 2016.
- WAUGH, M. M.; KIM, D. H.; FERRIN, D. M.; STANGHELLINI, M. E.. Reproductive Potential of *Monosporascus cannonballus*. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 45-50, jan. 2003.
- YONOW, T.; HATTINGH, V.; DE VILLIERS, M. CLIMEX modelling of the potential global distribution of the citrus black spot disease caused by *Guignardia citricarpa* and the risk posed to Europe. **Crop Protection**, v.44, p.18-28, 2013.
- ZENG, Y.; XIONG, Tao; LIU, B.; CARSTENS, E.; CHEN, X.; XU, J.; LI, H. Genetic Diversity and Population Structure of *Phyllosticta citriasiana* in China. **Phytopathology**, p. 1-12, 2021.



### 3 GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E PERÍODOS DE MOLHAMENTO E E CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS CAUSADOS POR ASCÓSPOROS EM FRUTOS

#### Resumo

*Phyllosticta citricarpa* produz ascósporos e conídios no campo e a infecção dos tecidos de citros por esses esporos são dependentes de condições climáticas favoráveis. A temperatura e o período de molhamento são variáveis importantes relacionadas aos processos de infecção deste patógeno em citros. Porém, ainda há poucos estudos na literatura relacionados com a definição das condições ótimas para a germinação dos esporos e posterior infecção, bem como relacionadas com a caracterização dos sintomas gerados após colonização dos tecidos por ambos esporos em laranjas doces. Os objetivos deste estudo foram: (i) avaliar a influência de diferentes temperaturas e períodos de molhamento na germinação e formação de apressório de conídios de *P. citricarpa* e, (ii) caracterizar os sintomas de pinta preta em frutos de laranja doce inoculados com conídios e ascósporos. A germinação de conídios foi avaliada por meio do preparo da suspensão de  $10^4$  conídios/mL em água estéril acrescida de 2% de suco de laranja. Gotas de 50  $\mu$ L da suspensão foram depositadas em tampas de placas de poliestireno armazenadas em temperaturas de 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C. A germinação dos conídios e a formação de apressórios foram avaliadas após 12, 24, 36 e 48 horas de molhamento. Cada repetição consistiu de uma placa contendo três gotas. O experimento foi realizado em duplicata. Os sintomas de pinta preta foram caracterizados por meio da inoculação de frutos de laranja doce 'Valência' em casa de vegetação. A inoculação de *P. citricarpa* foi realizada com suspensão de  $10^3$  ascósporos ou conídios/mL preparadas em água estéril. Os ascósporos foram produzidos pelo método da suspensão de espermácias cruzando um isolado de *MATI-1* com outro *MATI-2*. O controle consistiu de frutos inoculados com água. A germinação dos esporos na superfície dos frutos foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV). O modelo beta-monomolecular foi ajustado aos dados de germinação de conídios em diferentes temperaturas e períodos de molhamento. As temperaturas mínima, ótima e máxima para a germinação de conídios estimadas pelo modelo foram em 8,38°C, 24,58°C e 40,6°C, respectivamente, enquanto para a formação de apressórios foi de 9,63°C, 24,85°C e 40,6°C com dados agrupados dos dois experimentos. A germinação incrementou à medida que o molhamento foi aumentado até pelo menos 36 horas de molhamento. Ambos os esporos germinaram e formaram apressório na superfície dos frutos de laranja doce quando observados no MEV. O sintoma de falsa melanose apareceu nos frutos inoculados com conídios a partir de 127 dias e para ascósporos com 178 dias, já a mancha dura foi observada nos frutos inoculados com conídios apenas 324 dias e ascósporos 378 dias após inoculação. A equação de superfície de resposta obtida com dados de germinação nesse estudo poderá ser empregada no desenvolvimento de sistemas de suporte à decisão no manejo da pinta preta, enquanto a similaridade dos sintomas causados por ascósporos e conídios evidencia a dificuldade de diferenciar no pomar a infecção e o dano de cada inóculo nos pomares.

Palavras-chave: Pré-penetração; Microscópio eletrônico de varredura; Pinta preta; *Citrus sinensis*; Superfície de resposta.

## Abstract

*Phyllosticta citricarpa* produces ascospores and conidia in the field and the tissue infection by these spores depend on the favourable climatic conditions. Temperature and wetness period are important variables related to *P. citricarpa* infectious process on citrus species. However, there are few studies in literature related to the definition of optimal conditions for spore germination and infection, as well to the characterization of symptoms after tissue colonization by both spores in sweet orange. The study aimed to: (i) assess the influence of different temperatures and wetness period on *P. citricarpa* conidial germination and apressorium formation and (ii) characterize the symptoms in sweet orange fruit inoculated with conidia and ascospores. Conidial germination was assessed by preparing a  $10^4$  conidia/mL suspension in sterilized water containing 2% of orange juice. Drops of 50  $\mu$ L from suspension were placed in polystyrene dish lids stored in temperatures of 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C and 40°C. Conidial germination and apressorium formation were assessed after 12, 24, 36 and 48 wetness hours. Each replicate consisted of a dish containing three drops. The experiment was repeated twice. CBS symptoms were characterized by the inoculation of 'Valencia' sweet orange fruit in greenhouse. The inoculation of *P. citricarpa* was performed with a  $10^3$  ascospores or conidia/mL suspension prepared with sterilized water. Ascospores were produced using spermatia suspension method by crossing isolates of *MATI-1* and *MATI-2*. Control treatment consisted of fruit inoculated with water. Spore germination on the fruit surface was observed through scanning electron microscope (SEM). Beta-monomolecular model was fitted to the data of conidial germination in different temperatures and wetness periods. Minimum, optimum and maximum temperature for conidial germination were estimated at 8.38°C, 24.58°C and 40.6°C, respectively, whereas for the apressorium formation were 9.63°C, 24.85°C and 40.6°C, using pooled data from both experiments. Conidial germination increased as the wetness period increased up to 36 h. Both spores germinated and formed apressorium on surface of sweet orange fruit when observed in SEM. False melanose symptom appeared on fruit inoculated with conidia after 127 days and with ascospores 178 days after inoculation, and hard spots were observed on fruit inoculated with conidia and ascospores only 324 and 378 days after inoculation, respectively. The response surface equation obtained with germination data of this study may be used in the elaboration of a decision support system for CBS management, while the symptom similarity caused by ascospores and conidia demonstrate the difficulty to differentiate the infection and losses caused by each inoculum in the orchard.

Keywords: Pre-penetration; Scanning microscope; Citrus black spot; *Citrus sinensis*; Response surface.

### 3.1. Introdução

A pinta preta, causada por *P. citricarpa*, pode formar até seis diferentes tipos de sintomas em frutos da maioria das espécies comerciais de citros, sendo eles falsa melanose, mancha rendilhada, trincada, dura sardenta e virulenta (SILVA JUNIOR et al., 2016). As infecções dos frutos e formação desses sintomas pode ocorrer por meio dos conídios (esporos assexuados produzidos em vários órgãos) e dos ascósporos (esporos sexuados produzidos nas folhas de citros caídas no solo)(SILVA JUNIOR et al., 2016; TRAN et al., 2020). A formação de sintomas de pinta preta nos frutos depende de vários fatores, dentre eles a suscetibilidade

dos materiais, a pressão de inóculo e as condições climáticas durante o processo de infecção e colonização (FRARE et al., 2019; FIALHO et al., 2022). Nas condições do Brasil e de outros países do hemisfério sul, as infecções geralmente ocorrem durante a primavera-verão (outubro a março), quando os frutos de citros ainda estão verdes, as temperaturas são mais elevadas e as chuvas são mais intensas (FIALHO et al., 2022; YONOW et al., 2013).

Diferentes fatores ambientais podem afetar o processo de infecção de esporos de fungos fitopatogênicos em tecidos do hospedeiro (AMORIM; REZENDE; BERGAMIM FILHO, 2018). Os fatores que mais influenciam essa etapa do ciclo da relação patógeno-hospedeiro e mais estudados na literatura são a temperatura e o período de molhamento (BONDE et al., 2007; LIMA et al., 2011; RASERA et al., 2022; A GUZMAN-PLAZOLA; DAVIS; MAROIS, 2003). Para o patossistema *P. citricarpa*-citros, o efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de conídios foi avaliado em poucos estudos (NORONHA, 2002; WANG; DEWDNEY, 2019). No Brasil, apenas um estudo foi realizado para avaliar a germinação de conídios de *P. citricarpa* em água estéril sob diferentes condições de temperatura e molhamento e foram encontrados percentuais altamente variáveis e inferiores a 40% de esporos germinados (NORONHA, 2002). A adição de suco de laranja na suspensão de esporos contribuiu para aumentar as taxas de germinação para valores superiores a 60% em pesquisa realizada nos EUA (WANG; DEWDNEY, 2019).

Esses estudos que relacionam a germinação de conídios de *P. citricarpa* com os fatores ambientais podem ser úteis para entender a influência do clima na intensidade da doença nas diferentes regiões produtoras de citros no mundo (REIS et al., 2006; FIALHO et al., 2022). Adicionalmente, podem ser utilizados também para compreender a importância de cada tipo de inóculo sob diferentes condições climáticas (YONOW et al., 2013), bem como o momento ideal para se realizar determinadas medidas de controle (AMORIM; REZENDE; BERGAMIM FILHO, 2018).

A aplicação de fungicidas durante o desenvolvimento dos frutos, principal medida de manejo da pinta preta, pode ser otimizada por meio de sistemas de suporte à decisão (*Disease Support system*, DSS) (GENT et al., 2013; SHTIENBERG, 2013). Em citros, o DSS da podridão floral, causada por espécies de *Colletotrichum*, foi desenvolvido a partir de modelo de germinação de conídios que utiliza a temperatura e período de molhamento como variáveis principais (LIMA et al., 2011). A equação foi obtida pela superfície de resposta da germinação dos conídios do patógeno *in vitro* sob diferentes temperaturas (15°C a 35°C) e períodos de molhamento (12 a 72 horas) e depois validada em casa de vegetação (GONÇALVES et al., 2021) e no campo (GAMA et al., 2019).

Estudos comparativos entre ascósporos e conídios de *P. citricarpa* foram iniciados apenas após o estabelecimento do protocolo de produção dos ascósporos *in vitro* (TRAN et al., 2018). Nesse trabalho, os dois tipos de esporos foram inoculados em folhas de citrange ‘Troyer’ e frutos de Tangor ‘Murcott’. Os autores não encontraram diferenças significativas na incidência e severidade da pinta preta quando compararam ascósporos e conídios. Entretanto, ainda há poucos estudos relacionados com a descrição e caracterização dos sintomas originados por infecções dos dois esporos em órgãos de outras espécies comerciais de citros. Em estudos realizados com outros patossistemas, Morais et al.(2015) observaram que os ascósporos de *Zymoseptoria tritici*, agente causal da mancha de septoria do trigo, originaram sintomas mais tardiamente quando inoculados em folhas em comparação com os conídios. A inoculação de ascósporos de *Ascochyta rabiei*, causador da queima de ascochyta em grão-de-bico, na concentração de  $2 \times 10^4$  ascósporos/mL em folhas originaram mais lesões comparado com inoculação de conídios na mesma concentração (TRAPERO-CASAS; KAISER, 2007). Por outro lado, inoculação de ascósporos e conídios de *Giberella zeae* apresentaram incidência e severidade similares de sintomas de queima de giberela em trigo (MITTER et al., 2006).

Portanto, torna-se necessário elaborar um modelo para explicar a influência da temperatura e molhamento na germinação dos esporos de *P. citricarpa* utilizando uma metodologia que permita obter resultados mais homogêneos e reprodutíveis com altas taxas de germinação. Além disso, há pouca informação na literatura relacionada aos tipos de sintomas formados por cada inóculo de *P. citricarpa* em frutos de laranjas doce, uma vez que a maioria dos estudos com inoculações tem sido realizados apenas com conídios. Assim, os objetivos desse estudo foram ajustar um modelo para a germinação e formação de apressórios de conídios de *P. citricarpa* em função de diferentes temperaturas e períodos de molhamento e caracterizar os sintomas de pinta preta em frutos de laranja ‘Valência’ inoculados com ascósporos e conídios em casa de vegetação.

## **3.2. Material e Métodos**

### **3.2.1. Obtenção dos isolados de *P. citricarpa***

Os experimentos foram conduzidos com os dois isolados monospóricos de *P. citricarpa* utilizados no cruzamento 5 descrito no item 2.2.3, ambos provenientes da região central do cinturão citrícola paulista e previamente preservados em papel filtro congelado (SILVA JUNIOR et al., 2016). A identificação da espécie dos isolados foi realizada pela observação do aspecto amarelado da borda da colônia crescida no meio aveia ágar após 14 dias e por meio da amplificação de parte da região ITS e do gene do fator de alongação 1- $\alpha$ .

utilizando-se PCR convencional (MILES et al., 2013; BAAYEN et al., 2002). A identificação do *mating type MATI-1* do isolado LRS 42/12 e do *MATI-2* do isolado Cambuhy 4 foi realizada como descrito no item 2.2.2.

### 3.2.2. Preparo da suspensão de conídios

A suspensão de conídios foi preparada utilizando colônias do LRS 42/12 de *MATI-1* crescidas em 15 mL do meio BDA por três semanas a 25°C e 12 horas de luz. A obtenção da suspensão de conídios seguiu metodologia semelhante à de Wang e Dewdney (2019), com algumas modificações. A suspensão foi preparada em água destilada estéril acrescida de 2% de suco processado de laranja da variedade Valência e 0,02% de Tween 20. O suco apresentava as seguintes características: °Brix = 12,49; acidez(%) = 1,07; Ratio = 11,68; pH = 3,65; vitamina C = 492 mg/L. A solução resultante foi esterilizada com o uso de filtro de membrana de 0,2- $\mu$ m (Corning®). A suspensão foi preparada com discos de micélio removidos das colônias, depositados em tubos contendo a solução de suco a 2% e a concentração de conídios ajustada para 10<sup>4</sup> conídios/mL. Três alíquotas de 50  $\mu$ L da suspensão foram depositadas, de forma equidistante, em tampas de placas de poliestireno. Algodão umedecido com água foi depositado no centro da placa para simular câmara úmida e não secar as gotas. As placas foram vedadas com parafilm® e depositadas em caixas do tipo Gerbox® contendo papel filtro umedecido para evitar a evaporação das gotas.

### 3.2.3. Germinação de conídios de *P. citricarpa* em diferentes temperaturas e períodos de molhamento

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e em esquema fatorial duplo (7 x 4), com o primeiro fator composto por sete temperaturas (10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C) e o segundo fator por quatro períodos de molhamento (12, 24, 36 e 48 horas). O ensaio foi conduzido com quatro repetições por tratamento e cada repetição consistiu de uma placa com três gotas de suspensão de conídios.

A germinação dos conídios foi interrompida após as 12, 24, 36 ou 48 horas de molhamento, adicionando-se 20  $\mu$ L de lactoglicerol às gotas de suspensão. A germinação dos conídios foi mensurada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes com adição de 10  $\mu$ L de corante safranina às gotas para melhorar a visualização das estruturas do fungo. A porcentagem de germinação e formação de apressório de 100 conídios foi avaliada em cada gota. O conídio foi considerado como germinado quando o tubo germinativo apresentou comprimento igual ou maior que seu comprimento ou quando foi visualizado o apressório. A



temperatura e umidade ao longo do experimento foram registradas de hora em hora com o auxílio dos termohigrômetros modelo RHT-LCD (Novus®). A média da temperatura em cada BOD registrada pelo termo-higrômetro foi utilizada na obtenção das equações da superfície de resposta da germinação e formação de apressório em função da temperatura e período de molhamento. O experimento foi repetido duas vezes.

Análises de regressão não lineares foram realizadas para se ajustar os dados dos dois experimentos separadamente ou combinados. Os dados da germinação e formação de apressório nos diferentes períodos de molhamento foram ajustados ao modelo monomolecular, descrito pela equação:

$$Y(PM) = Y_{opt} - (Y_{opt} - y_0) * \exp(-r * PM) \quad (\text{eq. 1})$$

em que  $Y(PM)$  representa a germinação em proporção,  $Y_{opt}$  é a germinação máxima,  $y_0$  é a germinação no molhamento zero,  $r$  é a taxa de progresso da germinação e  $PM$  é o período de molhamento (BERGAMIM FILHO, 2018).

Os dados da germinação e formação de apressório nas diferentes temperaturas foram ajustados ao modelo beta-generalizado, descrito pela equação:

$$Y(T) = Y_{opt} * \left( \left( \frac{T - T_{min}}{T_{opt} - T_{min}} \right)^{b_1 * \frac{T_{opt} - T_{min}}{T_{max} - T_{opt}}} \right) * \left( \frac{T_{max} - T}{T_{max} - T_{opt}} \right)^{b_1} \quad (\text{eq. 2})$$

em que  $Y(T)$  é a germinação em proporção,  $Y_{opt}$  é a germinação ótima,  $T_{min}$ ,  $T_{opt}$  e  $T_{max}$  são as temperaturas mínima, ótima e máxima de germinação, respectivamente,  $T$  é a temperatura ajustada e  $b_1$  indica a amplitude da curva em sua faixa assintótica (BASSANEZI et al., 1998). As equações dos dois modelos foram multiplicadas para se obter a equação da superfície de resposta. Os parâmetros estimados da germinação de conídios e formação apressórios foram comparados pelo teste  $t$  de Student a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (<http://www.r-project.org/>) e Statistica v.10 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA) para estimar os parâmetros das equações. Os gráficos foram realizados no programa SigmaPlot 12.

### 3.2.4. Caracterização de sintomas de pinta preta em frutos de laranja doce inoculados com ascósporos e conídios

O experimento de caracterização de sintomas de pinta preta em frutos de laranja doce inoculados com conídios e ascósporos foi realizado em casa de vegetação no Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), em Araraquara/SP. Os conídios foram obtidos de colônias do isolado LRS 42/12 crescidas por 21 dias a 25°C conforme procedimento descrito no item anterior. Os ascósporos foram produzidos por meio de cruzamento do isolado LRS 42/12 (*MATI-1*) e Cambuhy 4 (*MATI-2*). Colônias dos isolados de *MATI-1* e *MATI-2* crescidas por 14 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas no meio extrato de malte ágar foram cruzadas utilizando-se o método da suspensão de espermácias (TRAN et al., 2018), com o isolado de *MATI-2* sendo o doador e o *MATI-1* o receptor das espermácias. Após 21 dias dos cruzamentos, os ascósporos ejetados para as tampas foram coletados por meio da adição de 1 mL de água destilada estéril contendo 0,02% de Tween 20, seguido de raspagem da tampa com alça de Drigalski. A suspensão de ascósporos resultante foi quantificada em câmara de Neubauer.

Frutos com diâmetro médio de 1,5 cm de plantas de laranja doce ‘Valência’ com quatro anos de idade foram utilizados para as inoculações de conídios e ascósporos. Os tratamentos consistiram em frutos inoculados com conídios ou ascósporos. Frutos não inoculados foram usados como controles. O experimento foi conduzido com 10 repetições, sendo cada fruto considerado uma repetição. Os frutos foram inoculados com  $10^3$  esporos/mL, em função da dificuldade de se produzir ascósporos em concentrações superiores. As inoculações foram realizadas com pulverizadores manuais de 500 mL de capacidade, borrifando os frutos com a suspensão de esporos até o ponto de escorrimento. Os frutos foram mantidos em câmara úmida por 48 horas.

A comprovação da germinação de ambos esporos na superfície de frutos de laranja foi realizada por meio de imagens capturadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia Eletrônica Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima da ESALQ-USP. Frutos de laranja ‘Valência’ foram inoculados em casa de vegetação no Fundecitrus com suspensão de conídios ou ascósporos utilizando a metodologia de Frare et al.(2019), pela qual 200 µL de suspensão na concentração de  $10^4$  esporos/mL foi depositada em orifício de 1 cm de diâmetro no centro de espuma adesiva colada ao fruto.

A casca do fruto (flavedo) da região inoculada com conídios ou ascósporos foi removida com um bisturi e adicionada em solução fixadora de Karnovsky durante sete dias. O procedimento para a montagem e visualização no MEV consistiu na desidratação etílica, na

qual os fragmentos foram depositados em sequência em béqueres contendo soluções de álcool nas concentrações de 10, 30, 50, 70, 90 e 100% por 15 minutos em cada, com posterior secagem em ponto crítico com CO<sub>2</sub> e finalizando com a metalização da amostra em ouro (KITAJIMA; LEITE, 1999).

### 3.3. Resultados

A assíntota máxima de proporção de esporos germinados para a análise conjunta dos dois experimentos foi de 0,92 e diferiu significativamente da assíntota de 0,67 observada para a formação de apressórios estimadas pelo modelo beta-monomolecular (Tabela 1). As temperaturas mínimas estimadas para a germinação dos conídios para os dois experimentos e para a análise conjunta foram, respectivamente, de 8,75°C, 8,68°C e 8,38°C, enquanto para a formação de apressórios foi de 9,76°C, 9,56°C e 9,63°C. A temperatura máxima estimada foi de 40,6°C, enquanto a temperatura ótima variou de 24,45 a 24,94°C para ambos experimentos e variáveis analisadas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros estimados e coeficiente de determinação ajustado (R<sup>2</sup>) do modelo beta-monomolecular ajustado aos dados de germinação e formação de apressório de conídios de *Phyllosticta citricarpa* em diferentes períodos de molhamentos e temperaturas, dado pela equação:  $Z(T,PM) = Y_{opt} * (((T - T_{min}) / (T_{opt} - T_{min}))^{b_1} * (T_{opt} - T_{min}) / (T_{max} - T_{opt})) * (((T_{max} - T) / (T_{max} - T_{opt}))^{b_1}) * (Y_{opr} - Y_{opr0}) * \exp(-r * PM)$ , em que Z é a germinação ou formação de apressório em proporção, T é a temperatura e PM é o período de molhamento.

Variáveis	Parâmetros <sup>a</sup>							R <sup>2</sup>
	$Y_{opt}$	$T_{min}$	$T_{opt}$	$T_{max}$	$b_1$	$y_0$	$r$	
<i>Germinação de esporos</i>								
Experimento 1	0,86	8,75	24,45	40,60	1,70	-0,60	0,058	0,93
Experimento 2	0,93	8,68	24,60	40,60	1,67	-0,65	0,055	0,95
Análise conjunta	0,92	8,38	24,58	40,60	1,75	-0,63	0,053	0,94
<i>Formação de apressório</i>								
Experimento 1	0,65	9,76	24,75	40,60	2,22	-0,16	0,041	0,91
Experimento 2	0,70	9,56	24,94	40,60	2,19	-0,27	0,043	0,91
Análise conjunta	0,67	9,63	24,85	40,60	2,21	-0,20	0,042	0,79

<sup>a</sup>Parâmetros da função beta generalizada multiplicada pelo modelo monomolecular.

A germinação de conídios de *P. citricarpa* e a formação de apressórios aumentou à medida que o molhamento foi aumentado até 48 horas, com taxas máximas observadas nas temperaturas ótimas (Fig. 1). A germinação de conídios atingiu pico em torno de 36 h de molhamento e depois estabilizou até as 48h (Fig. 1A, C e E), enquanto a formação de apressórios aumentou durante as 48 horas de molhamentos (Fig. 1B, D e F). A equação obtida da germinação em função da temperatura e do período de molhamento a partir dos dados combinados dos dois experimentos usando o modelo beta-monomolecular foi:

$$Z(T, PM) = 0,92 * \left( \left( \frac{T-8,38}{16,2} \right)^{1,769} \right) * \left( \left( \frac{40,6-T}{15,92} \right)^{1,75} \right) * (0,92 - 1,56 * \exp(-0,053 * PM))$$

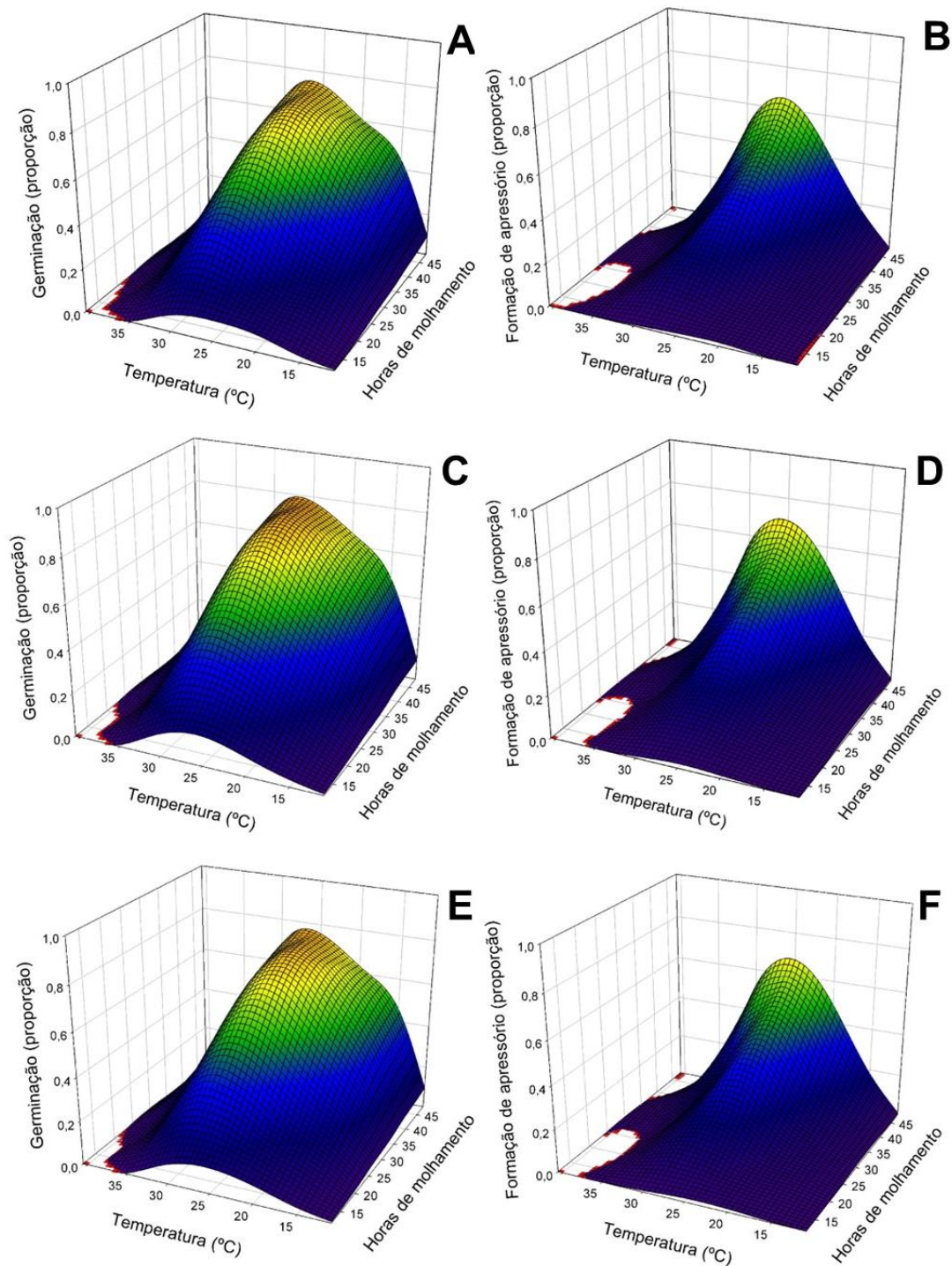
(eq. 3)

Modelo similar foi ajustado aos dados de formação de apressórios:

$$Z(T, PM) = 0,67 * \left( \left( \frac{T-9,63}{15,22} \right)^{2,13} \right) * \left( \left( \frac{40,6-T}{15,75} \right)^{2,21} \right) * (0,67 - 0,88 * \exp(-0,042 * PM))$$

(eq. 4)

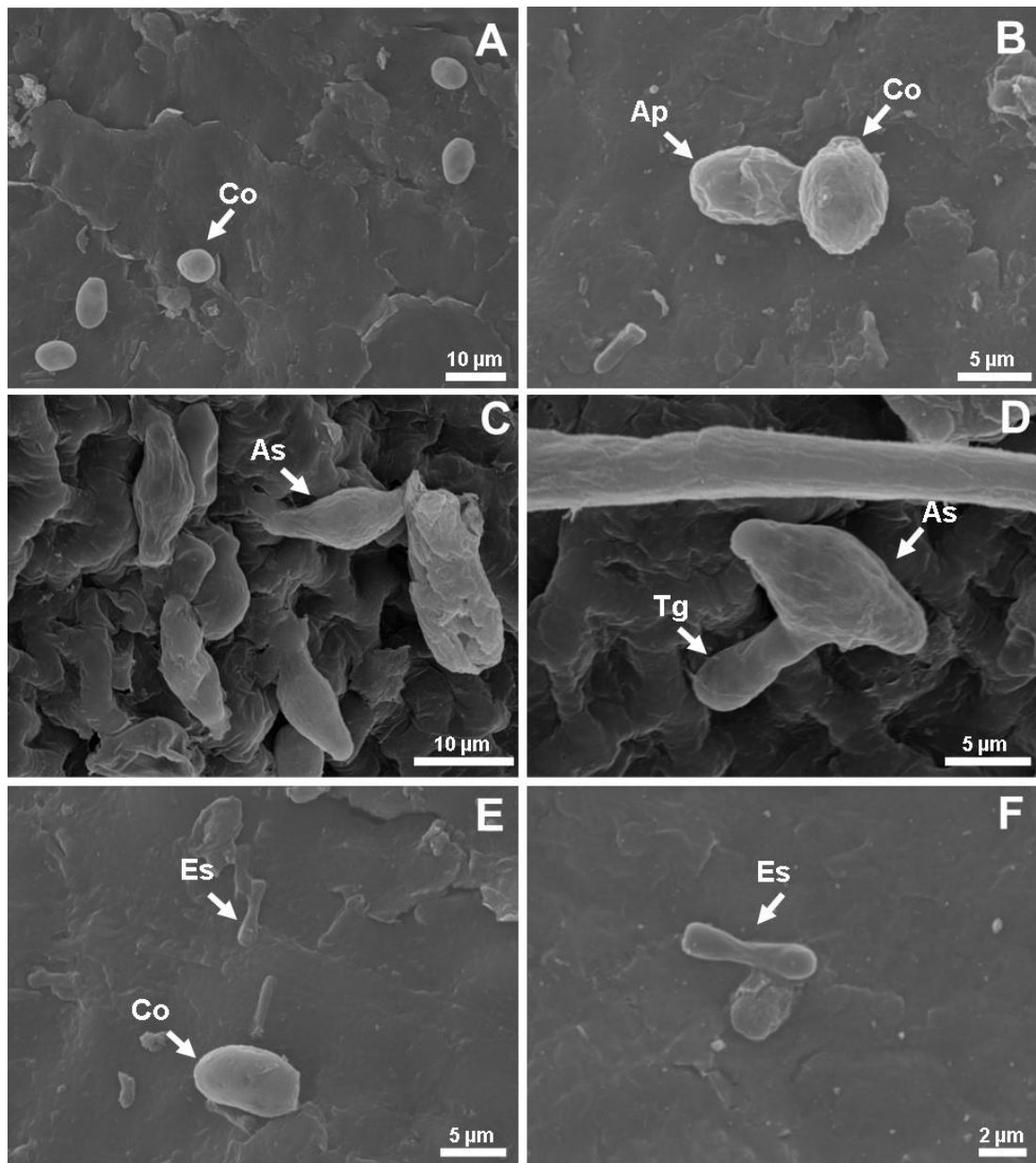
em que  $Z$  é a germinação ou formação de apressório em proporção,  $T$  é a temperatura e  $PM$  é o período de molhamento.



**Figura 1.** Superfície de resposta da proporção de esporos de *Phyllosticta citricarpa* germinados (A, C e E) e com formação de apressório (B, D e F) em função da temperatura e do período de molhamento avaliados em laboratório no primeiro (A e B) e segundo (C e D) experimentos e com dados agrupados de ambos (E e F) os experimentos. O modelo beta-monomolecular foi ajustado aos dados e é representado pela equação:  $Z(T,PM) = Y_{opt} * (((T - T_{min}) / (T_{opt} - T_{min}))^{b_1 * (T_{opt} - T_{min}) / (T_{max} - T_{opt})}) * (((T_{max} - T) / (T_{max} - T_{opt}))^{b_2}) * (Y_{opt} - (Y_{opt} - y_0)) * \exp(-r * PM)$ , em que  $Z$  é a germinação ou formação de apressório em proporção,  $T$  é a temperatura e  $PM$  é o período de molhamento.

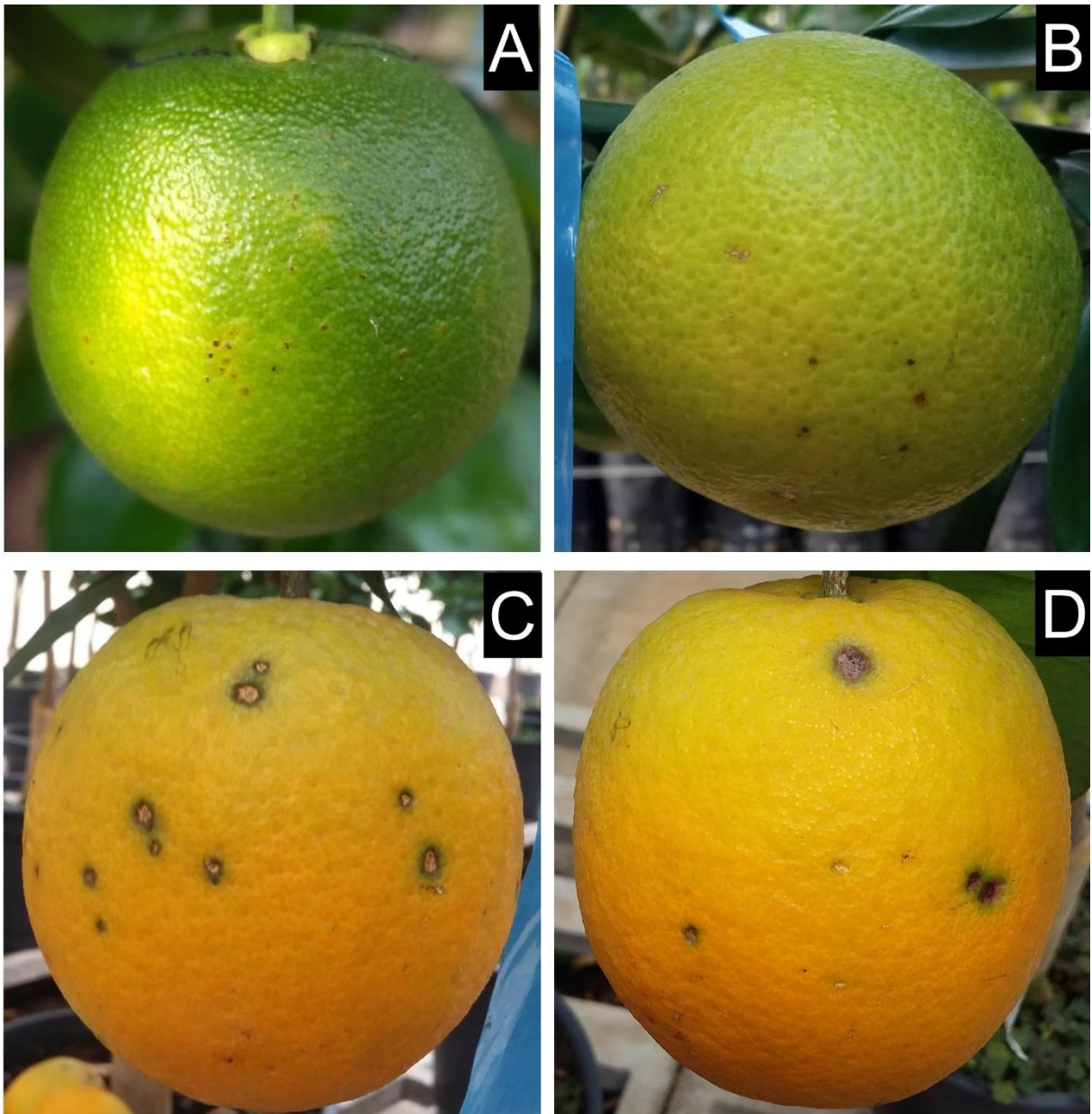
A germinação e formação de apressório de conídios e ascósporos em frutos de laranja

‘Valência’ foi observada após 48 horas no microscópio eletrônico de varredura (MEV). Na figura 2A é possível observar que vários conídios não germinaram na superfície dos frutos. Os conídios germinados apresentaram tubo germinativo curto com apressório próximo ao conídio (Fig. 2B). Os ascósporos não germinados podem ser visualizados na Fig. 2C e os germinados na Fig. 2D. As espermiácias foram observadas nos frutos inoculados com conídios (Fig. 2E). Ambos esporos apresentaram penetração direta no tecido do hospedeiro e não foram observadas alterações nas espermiácias quando na superfície do fruto.



**Figura 2.** Germinação e formação de apressório de conídios e ascósporos de *Phyllosticta citricarpa* visualizados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) 48 horas após inoculação em frutos de laranja doce ‘Valência’. A: conídios (Co) não germinados; B: Conídio germinado com tubo germinativo (Tg) curto e apressório (Ap); C: ascósporos (As) não germinados; D: ascósporo com tubo germinativo; E e F: espermiácias (Es).

Os primeiros sintomas observados nos frutos inoculados foram os de falsa melanose, que apareceram com 127 dias nos frutos inoculados com conídios (Fig. 3A) e aos 178 dias nos inoculados com ascósporos (Fig. 3B). Esses sintomas iniciaram nos frutos ainda verdes e foram caracterizados como lesões necróticas, muito pequenas de ~1 mm, negras, numerosas e em alguns casos com lesões satélites ao redor e circundadas por halo amarelado. Essas lesões permaneceram nos frutos até o amadurecimento dos mesmos. Aos 324 e 378 dias após inoculação apareceram os os primeiros sintomas de mancha dura nos frutos inoculados com conídios (Fig. 3C) e ascósporos (Fig. 3D), respectivamente. Esses são os sintomas típicos de pinta preta, que apareceram quando os frutos estavam mudando de cor ou já maduros, e apresentaram centro deprimido de coloração cinza e bordas pretas salientes. Os sintomas de mancha dura oriundos da inoculação dos dois esporos apresentaram halo esverdeado nos frutos maduros e foram observados picnidios no interior das lesões (Fig. 3D e E). Os demais sintomas de pinta preta, como mancha sardenta, rendilhada, trincada ou virulenta não foram observados nos frutos inoculados.



**Figura 3.** Sintomas de falsa melanose (A e B) e de mancha dura (C e D) observados, respectivamente, 127 e 324 dias, para conídios (A e C), e 178 e 378 dias, para ascósporos (B e D), após as inoculações em frutos de laranja ‘Valência’ com 1,5 cm de diâmetro com suspensão de esporos de *Phyllosticta citricarpa* na concentração de  $10^3$  esporos/mL.

### 3.4. Discussão

Esse estudo ajustou o modelo beta-monomolecular aos dados de germinação e formação de apressório de conídios de *P. citricarpa* em função da temperatura e do molhamento em solução contendo suco de laranja. O modelo estimou que a germinação dos conídios com formação de apressórios pode ocorrer na faixa de temperatura aproximada de 9 a 40°C, com proporções máximas alcançadas em torno de 25°C e pelo menos 36 horas de molhamento. Adicionalmente, os resultados de caracterização dos sintomas de pinta preta mostraram que



tanto conídios quanto ascósporos podem germinar na superfície de laranja doce e formar lesões de falsa melanose e mancha dura.

Os valores estimados em nosso trabalho para a temperatura mínima (8,38 a 9,36°C) e máxima (40,6°C) de germinação e formação de apressório foram similares aos 9,8°C (mínima) e 43,3°C (máxima) encontrados por Noronha (2002), que utilizou apenas água sem suco de laranja e realizou as análises com dados relativos de germinação de conídios de *P. citricarpa*. A equação proposta por Noronha (2022) estima proporções de esporos germinados muito similares com temperaturas mais altas e mais baixas que 25°C, conforme descrito por Fialho et al. (2022). Portanto, essa equação gerada em nosso trabalho para a germinação dos esporos e formação de apressórios otimizada em solução de suco de laranja poderá ser utilizada em trabalhos futuros a fim de estimar precisamente a taxa de esporos germinados em função de condições ambientais variáveis.

A proporção de conídios germinados em solução com suco de laranja estimada pelo modelo beta-monomolecular em nosso estudo atingiu pico de 0,92 na temperatura de 24,6°C com pelo menos 36 horas de molhamento. Esses resultados são similares aos encontrados em outro trabalho que também utilizou suco de laranja 2% para avaliar a germinação de conídios de *P. citricarpa*, no qual proporções mais altas que 0,70-0,80 conídios germinados foram obtidas a 24°C com 12 horas de molhamento (WANG; DEWDNEY, 2019). Essa diferença de tempo para atingir o pico de germinação pode estar relacionada com vários fatores, dentre eles a composição do suco natural utilizado, tais como pH, °Brix, acidez e ratio, bem como o tipo de material utilizado para deposição dos esporos e posterior germinação e formação de apressórios (WANG; DEWDNEY, 2019).

Os valores similares da temperatura mínima, máxima e ótima para a formação de apressório e germinação encontrados em nosso estudo indicam que o processo de emissão do tubo germinativo e formação de apressório é contínuo quando submetido às mesmas condições. No entanto, a diferença encontrada no valor de germinação e formação de apressório na temperatura ótima indica que nem todos os conídios formam apressório submetidos a condições ideais de temperatura e requerem provavelmente outros estímulos para a formação de apressório (DEAN, 1997). Esses valores foram próximos aos estimados para outro patógeno dos citros, *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros (LIMA et al., 2011). Embora os valores possam ser bem similares para diferentes patógenos, visto que, esses estudos com temperatura e molhamento apresentam melhores ajustes geralmente para o modelo beta-molecular, alguns fungos podem tolerar temperaturas um pouco mais altas ou mais baixas que outros e infectar os tecidos quando as condições estão nesses extremos. No caso de *P.*

*citricarpa*, o patógeno praticamente não germinou em temperaturas abaixo de 10°C e acima de 40°C e apresentou baixas taxas de germinação a 15°C e 35°C. Assim, estudos futuros poderiam ser realizados a fim de correlacionar a severidade de sintomas de pinta preta sob condições que conferem baixas taxas de germinação de esporos de *P. citricarpa*.

O patógeno *P. citricarpa* apresentou progresso mais lento de germinação dos conídios, com picos sempre após 36 horas de molhamento. Esse processo germinativo pode ser favorável quando se deseja desenvolver sistemas de suporte à decisão para controle de doenças, pois o produtor teria mais tempo para organizar as operações de pulverização (GENT et al., 2013; SHTIENBERG, 2013). Esse modelo gerado para conídios poderá ser usado para a elaboração de um sistema de suporte à decisão para pinta preta, visto que, para outros patossistemas como a podridão floral dos citros, o modelo beta-monomolecular foi usado para estimar a germinação dos esporos e posterior infecção dos tecidos. Validação de limiares de ação devem ser feita no campo a fim de correlacionar a germinação de esporos com a intensidade da pinta preta nos frutos (GONÇALVES et al., 2021).

Os sintomas observados nos frutos de ‘Valência’ inoculados em casa de vegetação comprovaram que os ascósporos provocam lesões semelhantes aquelas oriundas de inoculações com conídios de *P. citricarpa*. Nossos resultados corroboram os já obtidos para frutos de tangor ‘Murcott’ e folhas de citrange ‘Troyer’ (TRAN et al., 2018), em que o padrão das lesões na casca dos frutos foi semelhante entre os dois inóculos e não foi observado maior número de lesões isoladas no caso dos frutos inoculados com ascósporos. Não há um consenso na literatura sobre a diferença na sintomatologia e patogenicidade de ascósporos e conídios. Em trigo foi observado que os ascósporos do agente causal da mancha de septoria apresentaram maior período de latência em relação aos conídios, mas não diferiu destes na severidade da doença (MORAIS et al., 2015).

Os dois sintomas de pinta preta comumente encontrados em pomares de laranjas doces de São Paulo foram observados nos frutos inoculados com conídios e ascósporos (SILVA JUNIOR, 2016; FRARE et al., 2019). O tempo de aparecimento do sintoma de mancha dura após o de falsa melanose para ambos os inóculos se assemelha ao período de incubação encontrado em outro trabalho onde frutos de diferentes variedades de laranja doce foram inoculados com conídios (FRARE et al., 2019). Além disso, as inoculações de ascósporos ejetados na tampa das placas sem espermácias comprovaram que essas parecem ter função na reprodução sexuada do fungo e não no processo de infecção dos tecidos do hospedeiro (TRAN et al., 2017). Vale ressaltar que, não somente *in vitro* mas também nos pomares, os conídios podem ser produzidos em altas quantidades em lesões de frutos, folhas e ramos, disseminados

por água em concentrações elevadas e afetar os frutos mais severamente comparado com ascósporos que são disseminados pelo vento e podem atingir os frutos em menores concentrações. Em pomares paulistas, maiores quantidades de inóculo foram observadas sob a copa das plantas e estiveram mais relacionadas a conídios dispersos por água em relação ao inóculo fora da copa provavelmente de ascósporos dispersos pelo vento (FIALHO, 2021).

Os resultados obtidos no presente estudo servirão para uso em futuros estudos que objetivem desenvolver sistemas de suporte à decisão para a pinta preta. Para isso, o modelo gerado aqui para germinação de conídios poderá ser somado a futuros trabalhos com ascósporos, inóculo comprovadamente patogênico, uma vez que ambos apresentam papel importante no ciclo da pinta preta no parque citrícola paulista. A sintomatologia semelhante em frutos de laranja doce inoculados com ascósporos e conídios mostrou que no campo não há como diferenciar as infecções causadas pelos dois inóculos e os fatores que levam a produção de ambos nos pomares devem ser levados em consideração no momento de realizar o manejo da pinta preta.

## Referências

- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. 561 p.
- AMORIM, R.; SAVI, D. C.; FERREIRA-MABA, L.; ALUIZIO, R.; GOULIN, E. H.; TAKITA, M. A.; MACHADO, M. A.; GLIENKE, C. MAT gene idiomorphs suggest a heterothallic sexual cycle in the citrus pathogen *Phyllosticta citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, n. 2, p. 325-337, 2016.
- BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM, L.; WILLOCQUE, L.; SAVARY, S. (2018) **Análise temporal de epidemias**. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. 561 p.
- BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; HAU, B.. Effects of bean line pattern mosaic virus on the monocyclic components of rust and angular leaf spot of *Phaseolus* bean at different temperatures. **Plant Pathology**, v. 47, n. 3, p. 289-298, jun. 1998.
- BONDE, M. R.; BERNER, D. K.; NESTER, S. E.; FREDERICK, R. D. Effects of Temperature on Urediniospore Germination, Germ Tube Growth, and Initiation of Infection in Soybean by *Phakopsora* Isolates. **Phytopathology**, v. 97, n. 8, p. 997-1003, ago. 2007.
- DEAN, R. A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 211-234, set. 1997.

- FIALHO, R. O. **Inoculum monitoring, fruit susceptibility to infection and fungicide efficacy for citrus black spot control during fruit development in sweet orange orchards**. 2021. 107 f. Tese (Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.
- FIALHO, R. O.; MOYO, P.; FOURIE, P. H.; LANZA, F. E.; MACHADO, F. J.; AMORIM, L.; SILVA-JUNIOR, G. J. Citrus black spot intensity and yield losses on sweet orange are affected by *Phyllosticta citricarpa* inoculum concentration and fruit developmental stage. **Plant Pathology**, v. 0, p. 1-13, 2022.
- FRARE, G. F.; SILVA-JUNIOR, G. J.; LANZA, F. E.; BASSANEZI, R. B.; RAMIRES, T. G.; AMORIM, L. Sweet Orange Fruit Age and Inoculum Concentration Affect the Expression of Citrus Black Spot Symptoms. **Plant Disease**, v. 103, n. 5, p. 913-921, maio 2019.
- GAMA, A. B.; SILVA JUNIOR, G. J.; PERES, N. A.; MOLINA, J. E.; LIMA, L. M. de; AMORIM, L. A Threshold-Based Decision-Support System for Fungicide Applications Provides Cost-Effective Control of Citrus Postbloom Fruit Drop. **Plant Disease**, v. 103, n. 9, p. 2433-2442, set. 2019.
- GENT, D. H.; MAHAFFEE, W. F.; Mc ROBERTS, N.; PFENDER, W. F. The use and role of predictive systems in disease management. **Annual review of phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 267-289, 4 ago. 2013.
- GONÇALVES, F. P.; NOGUEIRA JÚNIOR, A. F.; SILVA-JUNIOR, G. J.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; AMORIM, L. Environmental requirements for infection of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* sensu lato in citrus flowers and prevalence of these pathogens in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, n. 1, p. 27-37, 12 fev. 2021.
- GUZMAN-PLAZOLA, R.; DAVIS, R.M.; MAROIS, J. J. Effects of relative humidity and high temperature on spore germination and development of tomato powdery mildew (*Leveillula taurica*). **Crop Protection**, v. 22, n. 10, p. 1157-1168, dez. 2003.
- KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Piracicaba: ESALQ, NAP, MEPA – USP, 1999. 45p.
- LIMA, W. G.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F. P.; DE FILHO, P. A. M.. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 1, p. 157-165, 18 maio 2011.
- MITTER, V.; FRANCL, L. J.; ALI, S.; SIMPFENDORFER, S.; CHAKRABORTY, S. Ascosporic and conidial inoculum of *Gibberella zeae* play different roles in *Fusarium* head blight and crown rot of wheat in Australia and the USA. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 4, p. 441-452, 2006.
- MORAIS, D.; LAVAL, V.; SACHE, I.; SUFFERT, F. Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (septoria tritici blotch) on wheat leaves. **Plant Pathology**, v. 64, n. 6, p. 1429-1439, 10 abr. 2015.

- NORONHA, M. A.. **Escala diagramática para avaliação da mancha preta em folhas de citros e efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração de conídios de *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* McAlp (Van De Aa)]**. 2002. 67 f. Dissertação (Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- RASERA, J. B.; AMORIM, L.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Diverse effects of temperature on *in vivo* and *in vitro* germination of urediniospores of *Neophytophthora tropicalis*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 162, n. 2, p. 501-507, 25 out. 2021.
- REIS, R. F. D.; TIMMER, L.W.; GOES, A. Effect of temperature, leaf wetness and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.1, p. 29-34, out. 2006.
- RODRÍGUEZ, A.; KAVA, V.; LATORRE-GARCÍA, L.; SILVA, G. J.; PEREIRA, R. G.; GLIENKE, C.; FERREIRA-MABA, L. S.; VICENT, A.; SHIMADA, T.; PEÑA, L. Engineering d-limonene synthase down-regulation in orange fruit induces resistance against the fungus *Phyllosticta citricarpa* through enhanced accumulation of monoterpene alcohols and activation of defence. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 9, p. 2077-2093, 2018.
- SHTIENBERG, D. Will decision-support systems be widely used for the management of plant diseases? **Annual review of phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 1-16, 4 ago. 2013.
- SILVA JUNIOR, G.J.; FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; GOES, A. **Pinta preta: a doença e seu manejo**. Araraquara, SP: Fundecitrus, 2016. 208p.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; DIETZGEN, R. G.; DEWDNEY, M. M.; ZHANG, K.; ROLLINS, J. A.; DRENT, A. Sexual Reproduction in the Citrus Black Spot Pathogen, *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology**, v. 107, n. 6, p. 732-739, jun. 2017.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; DIETZGEN, R. G.; SHUEY, T. A.; MUDGE, S. R.; PAPACEK, D.; CHANDRA, K. A.; DRENT, A. Inoculum Dynamics and Infection of Citrus Fruit by *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology**, v. 110, n. 10, p. 1680-1692, 2020.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; SMITH, M. W.; DIETZGEN, R. G.; DRENT, A. Pathogenicity of *Phyllosticta citricarpa* Ascospores on *Citrus* spp. **Plant Disease**, v. 102, n. 7, p. 1386-1393, jul. 2018.
- RAPERO-CASAS, A.; KAISER, W. J.. Differences Between Ascospores and Conidia of *Didymella rabiei* in Spore Germination and Infection of Chickpea. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1600-1607, dez. 2007.
- WANG, N.; DEWDNEY, M. M. The Effects of Nutrition and Environmental Factors on Conidial Germination and Appressorium Formation of *Phyllosticta citricarpa*, the Causal Agent of Citrus Black Spot. **Phytopathology**, v. 109, n. 4, p. 650-658, abr. 2019.

YONOW, T.; HATTINGH, V.; DE VILLIERS, M. CLIMEX modelling of the potential global distribution of the citrus black spot disease caused by *Guignardia citricarpa* and the risk posed to Europe. **Crop Protection**, v.44, p.18-28, 2013.

## APÊNDICE

*Mating type* e origem de isolados de *P. citricarpa* obtidos de três regiões do parque citrícola de São Paulo. Isolados em negrito foram utilizados nos demais experimentos. NI= não identificado.

Isolado	<i>Mating type</i>	Município do estado de São Paulo	Região do cinturão citrícola	Ano de coleta
LRS 25/98	<i>MATI-2</i>	Araras	Sul	1998
LRS 36/99	N.I.	Severínia	Norte	1999
P01GC	<i>MATI-1</i>	Pedranópolis	Norte	2009
P02GC	<i>MATI-2</i>	Pedranópolis	Norte	2009
P03GC	N.I.	Pedranópolis	Norte	2009
P04GC	<i>MATI-1</i>	Pedranópolis	Norte	2009
P05GC	<i>MATI-2</i>	Pedranópolis	Norte	2009
P06GC	<i>MATI-2</i>	Pedranópolis	Norte	2009
P07GC	<i>MATI-1</i>	Pedranópolis	Norte	2009
P08GC	<i>MATI-1</i>	Pedranópolis	Norte	2009
P09GC	<i>MATI-1</i>	Pedranópolis	Norte	2009
P10GC	<i>MATI-1</i>	Pedranópolis	Norte	2009
P11GC	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
<b>P12GC</b>	<b><i>MATI-1</i></b>	<b>Mogi Guaçú</b>	<b>Sul</b>	<b>2009</b>
MG02GC	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
MG03GC	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
MG04GC	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
MG05GC	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
<b>MG06GC</b>	<b><i>MATI-2</i></b>	<b>Mogi Guaçú</b>	<b>Sul</b>	<b>2009</b>
MG08GC	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
MG09GC	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
MG10GC	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
MG11GC	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
MG12GC	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçú	Sul	2009
MG13GC	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
MG14GC	<i>MATI-2</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP02GC.Test.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP05GC.Test.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP09GC.Test.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP10GC.Test.	<i>MATI-2</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP12GC.Test.	<i>MATI-2</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP13GC.Test.	<i>MATI-2</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009

GP15GC.Test.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP18GC.Test.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP19GC.Test.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP21GC.Test.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP23GC.Test.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GP24GC.Test.	<i>MATI-2</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GPF01GC.Trat.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GPF02GC.Trat.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GPF04GC.Trat.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GPF06GC.Trat.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
<b>GPF09GC.Trat.</b>	<b><i>MATI-1</i></b>	<b>Gavião Peixoto</b>	<b>Centro</b>	<b>2009</b>
<b>GPF10GC.Trat.</b>	<b><i>MATI-1</i></b>	<b>Gavião Peixoto</b>	<b>Centro</b>	<b>2009</b>
GPF12GC.Trat.	<i>MATI-2</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GPF21GC.Trat.	<i>MATI-2</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GPF22GC.Trat.	<i>MATI-2</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GPF23GC.Trat.	<i>MATI-2</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GPF25GC.Trat.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
GPF28GC.Trat.	<i>MATI-1</i>	Gavião Peixoto	Centro	2009
<b>GPF30GC.Trat.</b>	<b><i>MATI-1</i></b>	<b>Gavião Peixoto</b>	<b>Centro</b>	<b>2009</b>
FSM20	<i>MATI-2</i>	Colômbia	Norte	2011
MURITI1	N.I.	Colômbia	Norte	2011
MURITI2	N.I.	Colômbia	Norte	2011
LRS 41/12	<i>MATI-2</i>	Capela do Alto	Sul	2012
LRS 35/12	<i>MATI-1</i>	Borebi	Sul	2012
<b>LRS 42/12</b>	<b><i>MATI-1</i></b>	<b>Ibaté</b>	<b>Centro</b>	<b>2012</b>
LV17	<i>MATI-1</i>	Ibaté	Centro	2012
MOGI 17	N.I.	Mogi Guaçú	Sul	2012
Sete Lagoas 1	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçú	Sul	2012
Sete Lagoas 2	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçú	Sul	2012
Sete Lagoas 3	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçú	Sul	2012
Sete Lagoas 4	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçú	Sul	2012
Sete Lagoas 5	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçú	Sul	2012
<b>Sete Lagoas 6</b>	<b><i>MATI-2</i></b>	<b>Mogi Guaçú</b>	<b>Sul</b>	<b>2012</b>
Sete Lagoas 7	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçú	Sul	2012
Sete Lagoas 8	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçú	Sul	2012
Sete Lagoas 9	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçú	Sul	2012
LRS 02/13	<i>MATI-1</i>	Capão Bonito	Sul	2013
LRS 03/13	<i>MATI-1</i>	Capão Bonito	Sul	2013
LRS 04/13	<i>MATI-1</i>	Capão Bonito	Sul	2013
LRS 05/13	<i>MATI-1</i>	Capão Bonito	Sul	2013
LRS 10/13	<i>MATI-1</i>	Capão Bonito	Sul	2013
LRS 12/13	<i>MATI-1</i>	Capão Bonito	Sul	2013
LRS 14/13	<i>MATI-1</i>	Capão Bonito	Sul	2013
LRS 31/13	<i>MATI-2</i>	Capão Bonito	Sul	2013
LRS 18/13	<i>MATI-1</i>	Capela do Alto	Sul	2013
LRS 35/13	<i>MATI-1</i>	Avaré	Sul	2013

LRS 29/13	<i>MATI-1</i>	Pardinho	Sul	2013
Cambuhy 1	<i>MATI-1</i>	Matão	Centro	2016
Cambuhy 2	<i>MATI-2</i>	Matão	Centro	2016
Cambuhy 3	<i>MATI-2</i>	Matão	Centro	2016
<b>Cambuhy 4</b>	<b><i>MATI-2</i></b>	<b>Matão</b>	<b>Centro</b>	<b>2016</b>
Cambuhy 5	<i>MATI-2</i>	Matão	Centro	2016
Cambuhy 6	<i>MATI-1</i>	Matão	Centro	2016
Cambuhy 7	<i>MATI-2</i>	Matão	Centro	2016
TQ06/17	<i>MATI-1</i>	Taquarituba	Sul	2017
TQ 1	N.I.	Taquarituba	Sul	2017
TQ 2	N.I.	Taquarituba	Sul	2017
TQ 3	N.I.	Taquarituba	Sul	2017
TQ 4	N.I.	Taquarituba	Sul	2017
TQ 5	<i>MATI-2</i>	Taquarituba	Sul	2017
<b>TQ 6</b>	<b><i>MATI-2</i></b>	<b>Taquarituba</b>	<b>Sul</b>	<b>2017</b>
TQ 7	<i>MATI-2</i>	Taquarituba	Sul	2017
<b>TQ 8</b>	<b><i>MATI-2</i></b>	<b>Taquarituba</b>	<b>Sul</b>	<b>2017</b>
TQ 9	N.I.	Taquarituba	Sul	2017
SCRP 01/18	<i>MATI-2</i>	St Cruz do Rio Pardo	Centro	2018
MOGI1	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI2	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI3	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI5	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI6	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI7	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI8	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI9	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI10	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI11	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI12	<i>MATI-2</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI13	<i>MATI-1</i>	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI14	N.I.	Mogi Guaçu	Sul	2021
MOGI15	N.I.	Mogi Guaçu	Sul	2021
BORB1	<i>MATI-2</i>	Borborema	Centro	2021
BORB3	<i>MATI-2</i>	Borborema	Centro	2021
BORB5	<i>MATI-2</i>	Borborema	Centro	2021
BORB6	<i>MATI-1</i>	Borborema	Centro	2021
TQ11	<i>MATI-1</i>	Taquarituba	Sul	2021
TQ12	<i>MATI-2</i>	Taquarituba	Sul	2021
TQ13	<i>MATI-1</i>	Taquarituba	Sul	2021
TQ15	<i>MATI-2</i>	Taquarituba	Sul	2021
TQ17	N.I.	Taquarituba	Sul	2021
TQ18	<i>MATI-1</i>	Taquarituba	Sul	2021
TQ19	N.I.	Taquarituba	Sul	2021
TQ20	<i>MATI-1</i>	Taquarituba	Sul	2021
TQ21	N.I.	Taquarituba	Sul	2021



ANG1	<i>MAT1-1</i>	Angatuba	Sul	2021
ANG4	<i>MAT1-2</i>	Angatuba	Sul	2021
ANG6	<i>MAT1-2</i>	Angatuba	Sul	2021
ANG7	<i>MAT1-2</i>	Angatuba	Sul	2021
ANG8	<i>MAT1-2</i>	Angatuba	Sul	2021
Cambuhy 8	<i>MAT1-2</i>	Matão	Centro	2021
Cambuhy 9	<i>MAT1-1</i>	Matão	Centro	2021
Cambuhy 10	<i>MAT1-1</i>	Matão	Centro	2021
Cambuhy 12	<i>MAT1-1</i>	Matão	Centro	2021
SC1	<i>MAT1-1</i>	São Carlos	Centro	2021
SC2	<i>MAT1-2</i>	São Carlos	Centro	2021
TURM3	<i>MAT1-1</i>	Turmalina	Norte	2021
TURM5	<i>MAT1-1</i>	Turmalina	Norte	2021
TURM7	<i>MAT1-1</i>	Turmalina	Norte	2021
TURM10	<i>MAT1-1</i>	Turmalina	Norte	2021
TURM11	N.I.	Turmalina	Norte	2021
TURM12	<i>MAT1-2</i>	Turmalina	Norte	2021
TURM13	<i>MAT1-2</i>	Turmalina	Norte	2021
TURM14	<i>MAT1-2</i>	Turmalina	Norte	2021
TURM22	N.I.	Turmalina	Norte	2021
TURM23	N.I.	Turmalina	Norte	2021
TURM24	N.I.	Turmalina	Norte	2021
TURM25	<i>MAT1-1</i>	Turmalina	Norte	2021
TURM27	N.I.	Turmalina	Norte	2021
TURM28	<i>MAT1-2</i>	Turmalina	Norte	2021
BEB1	<i>MAT1-1</i>	Bebedouro	Norte	2021
BEB2	<i>MAT1-1</i>	Bebedouro	Norte	2021
BEB5	<i>MAT1-1</i>	Bebedouro	Norte	2021
BEB8	<i>MAT1-1</i>	Bebedouro	Norte	2021
BEB9	<i>MAT1-1</i>	Bebedouro	Norte	2021
BEB12	<i>MAT1-1</i>	Bebedouro	Norte	2021
BEB14	N.I.	Bebedouro	Norte	2021
BEB17	<i>MAT1-2</i>	Bebedouro	Norte	2021
BEB26	<i>MAT1-2</i>	Bebedouro	Norte	2021
BEB35	N.I.	Bebedouro	Norte	2021