

DISPERSIONE IN CAMPO DELLE PICNIDIOSPORE DI *PHYLLOSTICTA CITRICARPA*, AGENTE DELLA MACCHIA NERA DEGLI AGRUMI

A. SURANO¹, A. IPPOLITO¹, M. M. DEWDNEY²

¹ Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti - Università degli Studi di Bari A. Moro - Via G. Amendola, 165/a, 70126 Bari

² Citrus Research and Education Center – IFAS – University of Florida
700 Experiment Station Rd, Lake Alfred, FL 33850, USA
suranoantony@gmail.com

RIASSUNTO

La presenza di *Phyllosticta citricarpa* è stata accertata in Florida (USA) nel marzo 2010. La presenza di un solo *mating type* permette lo sviluppo della sola fase asessuata, pertanto gli unici propaguli infettivi sono le picnidiospore. In questo studio è stata indagata per la prima volta la distribuzione verticale delle picnidiospore utilizzando dei captaspore disposti in campo a quattro distinte altezze dal suolo (0,3 m, 0,6 m, 1 m e 2 m) ed ai quattro punti cardinali. I captaspore erano costituiti da vetrini da microscopia ottica ricoperti di un sottile strato di vaselina e la stima del numero di picnidiospore è stata effettuata mediante qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). Inoltre, è stato effettuato uno studio dei fattori climatici al fine di individuare le variabili ambientali che maggiormente condizionano la dinamica di rilascio delle picnidiospore. I risultati hanno evidenziato che la maggiore quantità di picnidiospore è stata catturata a 0,3 e 0,6 m, rispetto alle altezze maggiori. Le variabili climatiche che hanno maggiormente influenzato il numero di picnidiospore catturate sono state la temperatura minima, l'umidità relativa e la piovosità. Le conoscenze epidemiologiche e metodologiche acquisite potrebbero essere utilizzate in futuro per migliorare la gestione della malattia in campo.

Parole chiave: epidemiologia, captaspore, variabili climatiche, qPCR

SUMMARY

VERTICAL DISPERSAL OF PYCNIDIOSPORES OF *PHYLLOSTICTA CITRICARPA*, CAUSAL AGENT OF CITRUS BLACK SPOT

Phyllosticta citricarpa (McAlpine) van der Aa was detected in Florida (USA) in March 2010. Since one mating type is present and only asexual stage can occur, the pycnidiospores are the only infectious propagules. In this study, for the first time, the vertical dispersal of pycnidiospores was investigated using sporetraps hanged at four heights from the ground (0.3 m, 0.6 m, 1 m, and 2 m) and at the four cardinal points. Microscope slides coated with petroleum jelly were used as sporetraps. For pycnidiospore quantification a qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) was conducted. Moreover, the environmental variables to better explain the dynamic of pycnidiospore release were studied. The results highlighted that the greatest amount of pycnidiospores were trapped at 0.3 and 0.6 m, compared to greater heights from the ground. The environmental variables that most influenced the number of trapped pycnidiospores were the minimum temperature, the relative humidity, and the rainfall. The acquired epidemiological knowledge may be used in the future to improve the management of citrus black spot.

Keywords: epidemiology, sporetrap, environmental variables, qPCR

INTRODUZIONE

La “macchia nera degli agrumi” o “*citrus black spot*” (CBS), causata da *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) van der Aa, è una malattia ad eziologia fungina individuata e descritta per la prima volta in Australia (Benson, 1895; McAlpine, 1899). *P. citricarpa* può infettare la

maggior parte delle specie di agrumi, tra cui arancio dolce (*Citrus sinensis* Osbeck), pompelmo (*C. paradisi* Macfad.), mandarino (*C. reticulata* Blanco) e limone (*C. limon* (L.) Burm. f.) (EFSA, 2014). Le cultivar più sensibili sono quelle a maturazione tardiva (es. 'Valencia') per le quali in alcuni momenti sullo stesso albero coesistono frutti maturi, sui quali il patogeno può evadere, e frutti immaturi sui quali possono verificarsi nuove infezioni.

La malattia si manifesta con diversi sintomi sui frutti, rendendoli non adatti per il mercato del fresco. I sintomi vengono identificati come: *hard spot*, *virulent spot*, *cracked spot* e falsa melanosi (Dewdney et al., 2015). Anche le foglie possono essere infettate e su queste si possono manifestare sintomi che, pur non costituendo un danno produttivo, rivestono un ruolo importante per l'epidemiologia. Altri organi suscettibili sono i germogli ed i peduncoli, in quest'ultimo caso si può verificare la cascola dei frutti con perdite di produzione fino al 22% (Brentu et al., 2012).

La presenza di CBS in Florida (USA) è stata accertata nel marzo del 2010 (USDA, 2010). La presenza di un solo *mating type*, e quindi lo svolgimento della sola fase asessuata, ha reso necessario rivedere gli aspetti epidemiologici della malattia che, fino ad ora, è stata studiata considerando il ciclo completo del patogeno in quanto nei Paesi in cui è presente in modo endemico (Brasile, Sud Africa, Mozambico, ecc.) sono presenti entrambi i *mating type*. Gli studi condotti in questi Paesi hanno evidenziato come l'inoculo primario sia costituito da ascospore, mentre le picnidiospore costituiscono l'inoculo secondario. In Florida queste conoscenze non possono essere utilizzate in quanto, per via dell'impossibilità di differenziazione delle ascospore, gli unici propaguli infettivi sono le picnidiospore.

Questo studio, svolto in Florida nell'ambito di attività sperimentali in occasione del programma *Global Thesis*, ha avuto l'obiettivo di implementare le conoscenze epidemiologiche sulla macchia nera degli agrumi. In particolare si è voluta indagare la distribuzione verticale delle picnidiospore e l'influenza delle principali variabili climatiche sul rilascio delle picnidiospore. La tematica appare di elevato interesse, considerata la recente intercettazione in Europa di materiale infetto proveniente dalla Tunisia (EPPO, 2019), pur se la malattia è assente nelle restanti aree agrumicole euro-mediterranee.

MATERIALI E METODI

Caratterizzazione agronomica del campo

Lo studio è stato condotto in un agrumeto commerciale sito a Immokalee (Florida – USA) di 27 anni, cultivar Valencia innestata su portinnesto Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* 'Washington' X *Poncirus trifoliata*). Il sesto d'impianto era di 5 m X 3,5 m e la coltivazione era su baula, con orientamento dei filari Nord-Sud.

Il sistema di irrigazione utilizzato era di tipo ad aspersione sottochioma, con erogatori di tipo *microsprinkler*. La gestione fitosanitaria era in linea con i disciplinari di protezione integrata (IPM) redatti dal Citrus Research and Education Center (University of Florida), ad eccezione dei trattamenti fungicidi che sono stati del tutto assenti, per evitare di introdurre fattori di limitazione allo sviluppo della malattia.

La gestione del suolo prevedeva la trinciatura delle infestanti sulle interfile ed il diserbo chimico sottochioma e sulle file. L'assenza delle lavorazioni, che ha comportato il mancato interrimento dei residui vegetali, è stato un fattore predisponente l'evasione del patogeno dalle foglie infette presenti sul suolo.

Cattura delle picnidiospore

Il periodo di cattura delle spore è stato di 15 settimane, con inizio il 19 marzo 2019 e fine il 24 giugno 2019. Il sito sperimentale utilizzato è stato suddiviso in quattro blocchi, ognuno dei

quali era costituito da tre file della lunghezza di 420m. Di ogni blocco è stata presa in considerazione la sola fila centrale e per ogni fila sono state campionate tre piante, per un totale di 12 alberi.

Le picnidiospore sono state catturate utilizzando coppie di vetrini da microscopia ottica disposti *back-to-back* (due vetrini tenuti insieme da molle fermafogli). Prima dell'installazione in campo i vetrini sono stati coperti con un sottile strato di vaselina allo scopo di costituire uno strato sufficientemente adesivo per la cattura delle spore. I vetrini così preparati sono stati posizionati in campo (figura 1). Per ogni albero sono stati installate 16 coppie di vetrini, disposti sia in orizzontale sia in verticale in corrispondenza dei quattro punti cardinali, a quattro diverse altezze dal suolo (0,3 m, 0,6 m, 1m e 2m). I vetrini sono stati sostituiti in campo con cadenza di 7 giorni, analizzandone 192 per settimana, per un totale di 2880 vetrini.

Figura 1. Disposizione dei captaspore in campo. Filo di ferro plastificato e molle fermafogli hanno permesso di disporre le coppie di vetrini sia in orizzontale sia in verticale, a quattro diverse altezze, in corrispondenza dei punti cardinali di ciascuna pianta.



Raccolta delle picnidiospore dai vetrini

La vaselina contenente le eventuali picnidiospore è stata rimossa dai vetrini per mezzo di una lama in acciaio inox rivestita in politetrafluoroetilene (PTFE) (Single Edge, GEM “PTFE” Coated, Electron Microscopy Sciences) che, avendo un basso coefficiente di attrito, ha reso più facile la raccolta della vaselina dalla lama stessa con un piccolo frammento di materiale da imballaggio a base di amido (“starch-based peanuts”), il quale è stato disposto in tubo da 2 mL da microcentrifuga. Nel tubo sono state altresì aggiunti 0,2 g di sferette di vetro con diametro di 0,1 mm (BioSpec Products, OK, USA) e 500 μ L di TE *buffer*.

Estrazione del DNA dalle picnidiospore e qPCR

I tubi sono stati posti ad incubare a 65°C per 10 minuti, quindi le spore sono state frantumate meccanicamente mediante agitatore (Fisher Scientific, NH, USA), utilizzato alla massima velocità per 10 minuti. I tubi sono stati raffreddati in ghiaccio per 3 minuti e poi nuovamente posti ad incubare a 65°C per 5 minuti. Gli estratti così ottenuti sono stati conservati a -20°C in attesa del saggio qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*).

L'amplificazione genica è stata effettuata utilizzando il set di *primer* per GCITS così come descritto da Hu et al. (2014); il protocollo è stato lievemente modificato in quanto è stato utilizzato SYBR Green anziché la specifica sonda riportata nel lavoro Hu et al. (2014).

Per la preparazione della retta di taratura è stato utilizzato il DNA genomico (gDNA) estratto dal micelio dall'isolato GC12.2's di *P. citricarpa* (collezione del Citrus Research and Education Center, Lake Alfred – FL, USA) utilizzato come controllo positivo. Il gDNA estratto è stato dapprima portato alla concentrazione di 2,5ng/μL (10⁷) e successivamente sono state effettuate diluzioni decimali (da 10⁶ a 10¹), utilizzate per l'ottenimento della retta standard, indispensabile per un'accurata analisi quantitativa dei campioni.

Ogni campione è stato analizzato in due repliche e ad ogni saggio qPCR sono state amplificate anche due repliche per ognuna di sei quantità standard di DNA (da 10⁶ a 10¹) di *P. citricarpa*. Inoltre, in ogni saggio qPCR sono stati incluse due repliche di NTC (*no template control*). In seguito all'amplificazione è stata condotta l'analisi di *melting* da 65°C a 95°C con incrementi di temperatura di 0,5°C per 5 secondi. I campioni sono stati considerati positivi solo quando il picco di *melting* e l'andamento della curva erano analoghi al controllo positivo.

Analisi delle variabili climatiche

Le variabili climatiche sono state registrate da una stazione agroclimatica ubicata presso il Southwest Florida Research and Education Center (UF-IFAS) e i dati sono stati scaricati dal database Florida Automated Weather Network (FAWN) (<https://fawn.ifas.ufl.edu/>). I parametri considerati per questo studio sono stati: temperatura (a 2 m dal suolo), umidità relativa e pioggia. Tutti i parametri sono stati registrati ad intervalli di 15 minuti.

Sulla base dei parametri del FAWN sono stati elaborati: pioggia cumulata (mm), numero di giorni con piovosità > 1 mm, media delle temperature medie (°C), media delle temperature minime (°C), media delle temperature massime (°C), umidità relativa media (%), numero di ore con temperatura massima > 30°C, numero di ore con temperatura compresa tra 10°C e 30°C, numero di ore con temperatura minima < 18°C, numero di ore con umidità relativa < 75%, numero di ore con umidità relativa > 95%, numero di ore con umidità relativa tra 75% e 95%. Le presenti variabili sono state calcolate a 7, 14, 21 e 28 giorni prima della raccolta e sostituzione dei vetrini.

Quantificazione delle picnidiospore

Per stimare il numero di picnidiospore catturate è stata utilizzata la seguente formula (Hu et al., 2014):

$$\log_{10} \text{conidia} = \frac{\log_{10} \text{copy number} - 0.4}{1.03}$$

R² = 0,995.

Per convertire la quantità totale di DNA nel campione in log₁₀ numero di copie di ITS-1 è stata utilizzata la seguente formula (URI Genomics & Sequencing Center, 2004):

$$\log_{10} \text{copy number} = \frac{\text{Total DNA (ng.)} \cdot (6.022 \cdot 10^{23})}{797436 \cdot 10^9 \cdot 650}$$

Per calcolare la quantità totale di DNA è stato necessario rapportare la quantità di DNA iniziale riferita all'aliquota analizzata (4μL) alla quantità totale del campione (500μL). Il numero medio di copie delle regioni ITS-1 per ogni picnidiospora è di 797.436 (Wang et al., 2016). La massa media di 1 bp del DNA a doppia elica, di circa 650 Dalton mentre 10⁹ rappresenta un fattore di conversione.

Analisi dei dati

L'utilizzo del PROC CORR in SAS (v 9.4) ha restituito i coefficienti di correlazione di Pearson. Con questo approccio è stato possibile individuare le variabili che hanno maggiormente condizionato il numero di picnidiospore catturate.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi dei dati ha evidenziato che un maggior numero di picnidiospore è stato catturato quando la temperatura minima era maggiore di 18-19°C e quando venivano registrate meno di 60 ore con umidità relativa inferiore al 75% nei 7 giorni precedenti la raccolta dei vetrini (figure 2 e 3).

Inoltre, non sono state catturate picnidiospore quando nei 7 giorni precedenti il campionamento non si sono verificati eventi piovosi (figure 2 e 3). Questi risultati sono in linea con quanto ottenuto da Lewis-Solomon (2018) che, su rametti inoculati artificialmente, ha evidenziato come per *P. citricarpa* il valore minimo di umidità relativa per la differenziazione dei picnidi e la produzione delle picnidiospore era pari al 72%. Anche la temperatura è risultata positivamente correlata con il numero di conidi prodotti, come dimostrato per *P. citricarpa* (Lewis-Solomon, 2018) e *P. ampellicida* (Onesti et al., 2017).

Figura 2. Variabili climatiche (pioggia, umidità relativa e temperatura) durante i sette giorni precedenti il campionamento (GPC)

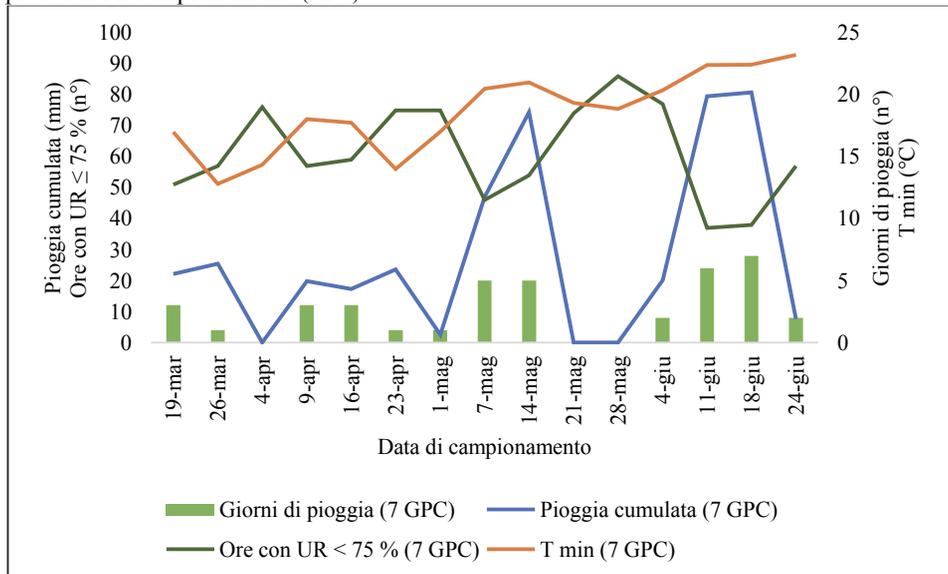
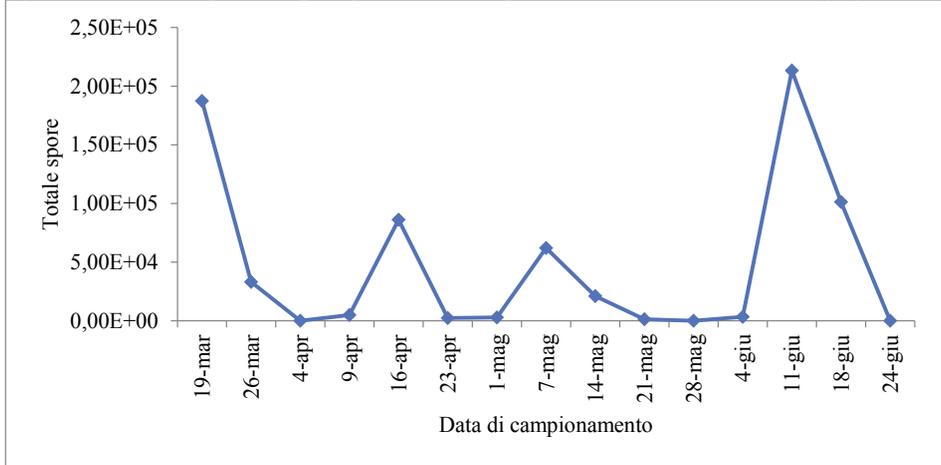


Figura 3. Numero di picnidiospore per data di campionamento dal 19 marzo al 24 giugno 2019



In riferimento alla diversa disposizione dei captaspore rispetto ai punti cardinali, il maggior numero di picnidiospore è stato catturato sul lato Nord degli alberi campionati, con differenza statisticamente significativa rispetto al lato Est ($P < 0,05$). Invece, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative rispetto agli altri punti cardinali (tabella 1). La maggiore umidità e le minori escursioni termiche della chioma esposta a Nord sono probabilmente alla base del più alto numero di spore ritrovate.

Tabella 1. Quantità di DNA di origine conidica rilevata ai 4 punti cardinali

Punti cardinali	DNA (ng) di origine conidica
Nord	5,242 a
Ovest	3,4033 ab
Sud	2,0956 ab
Est	1,2485 b

Alpha = 0,05. A lettere uguali corrispondono valori statisticamente non differenti ($P < 0,05$)

Il maggior numero di campioni positivi è stato ritrovato in corrispondenza dell'11/6/2019 (figura 4), in seguito ad un lungo periodo di pioggia. Infatti, nella settimana precedente il campionamento è piovuto per 6 giorni (figura 2) e la pioggia cumulata nei 21 giorni precedenti il campionamento è stata di 100 mm (figura 5). Di contro, il numero di campioni positivi è stato pari a zero o molto basso (inferiore al 10%) nei periodi in cui durante i 7 giorni precedenti il campionamento non c'è stata pioggia (figure 2-5). Questo è avvenuto perché i cirri o le masse mucose prodotte dai picnidi e contenenti le spore, necessitano degli schizzi d'acqua per la dispersione (Spòsito et al., 2011). Tuttavia, in alcuni casi (ovvero nei campionamenti avvenuti in data 9/4/2019 e 24/6/2019; figura 3) non sono state catturate picnidiospore pur se nei 7 giorni precedenti il campionamento c'era stata pioggia, la temperatura minima era superiore a 18-19°C ed il numero di ore con umidità relativa inferiore al 75% era inferiore a 60 (figura 2). Al

riguardo, esaminando la figura 3, appare evidente un andamento ciclico della dinamica di cattura delle spore. Sulla base di ciò sembra che tra un picco di cattura ed il successivo è necessario un periodo in termini di settimane. Probabilmente questo tempo di mancata cattura, anche in presenza di condizioni ambientali favorevoli alla dispersione delle spore, è necessario al patogeno per la differenziazione di nuovi picnidi e il rilascio delle picnidiospore.

Figura 4. Percentuale di campioni (vetrini) dai quali è stato estratto DNA di *P. citricarpa*

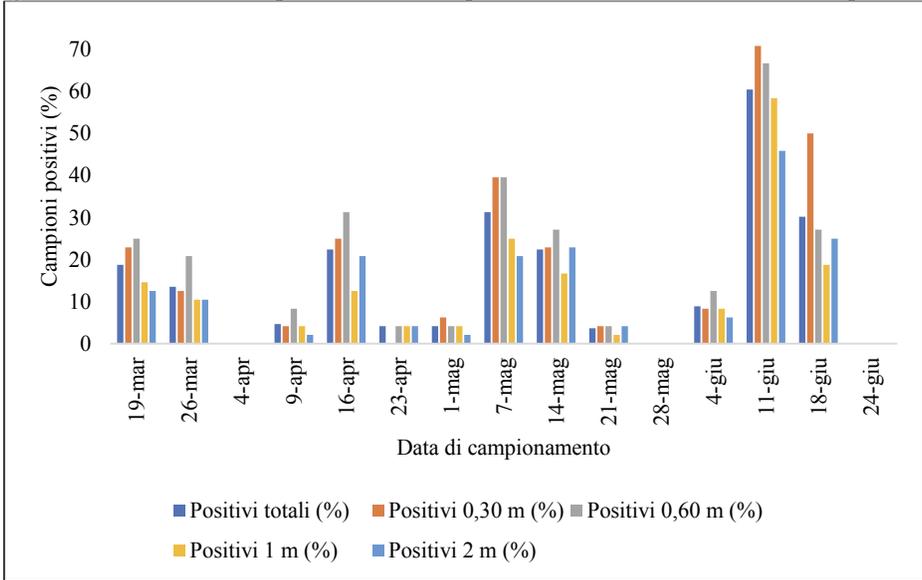
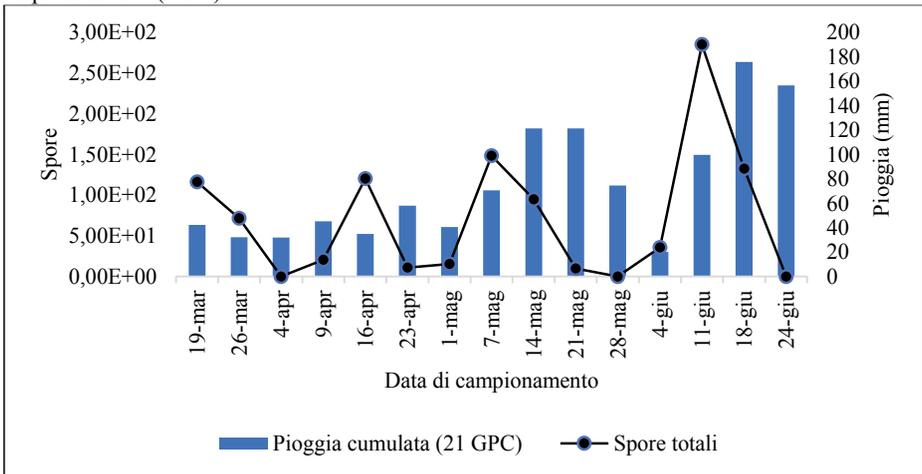


Figura 5. Numero di picnidiospore in relazione alla pioggia cumulata nei 21 giorni precedenti il campionamento (GPC)



I coefficienti di correlazione di Pearson tra la quantità di DNA (fg) di *P. citricarpa* e le variabili ambientali e sperimentali sono mostrati in tabella 2. Le variabili ambientali maggiormente correlate con la quantità di DNA sono state: numero di ore con umidità relativa < 75% (7 giorni precedenti il campionamento), giorni di pioggia > 1 mm (7 giorni precedenti il campionamento) e pioggia cumulata (7 giorni precedenti il campionamento). La prima variabile è correlata negativamente, le altre sono positivamente correlate con la quantità di DNA di origine conidica. L'altezza di campionamento risulta negativamente correlata con la quantità di DNA ($P < 0,05$).

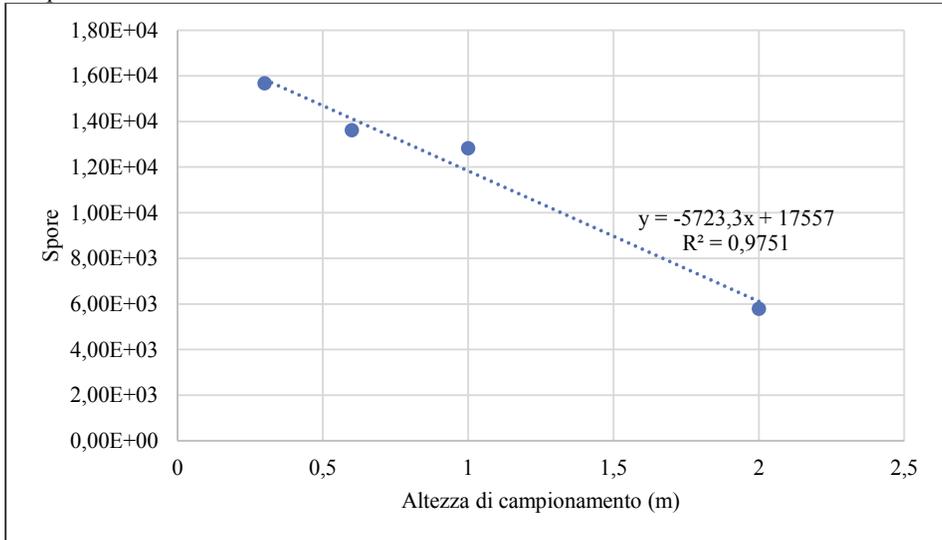
Tabella 2. Coefficienti di correlazione di Pearson tra la quantità di DNA (fg) di *P. citricarpa* di origine conidica e le variabili climatiche e sperimentali

Covariate	DNA (fg) di <i>P. citricarpa</i>
Altezza di campionamento	-0,03697*
Pioggia cumulata (7 GPC)	0,09057**
Pioggia cumulata (14 GPC)	0,04795*
Giorni con pioggia > 1mm (7 GPC)	0,10031**
Giorni con pioggia > 1mm (14 GPC)	0,05259*
Media delle temperature minime (7 GPC)	0,03752*
Ore con umidità relativa < 75% (7 GPC)	-0,11443**
Ore con umidità relativa < 75% (14 GPC)	-0,06768**
Ore con umidità relativa > 95% (7 GPC)	0,03944*

GPC (Giorni Precedenti il Campionamento); (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,001$

Considerando le varie altezze campionate (0,3 m, 0,6 m, 1m e 2m), è stato dimostrato che all'incrementare dell'altezza di campionamento diminuisce il numero di picnidiospore catturate (figura 6). La distribuzione verticale, con un maggior numero di picnidiospore catturate ad altezze vicine al suolo, è plausibile in quanto è stato riportato che la principale fonte di inoculo sono i residui colturali presenti sul suolo, sui quali si differenziano numerosi picnidi (Zhang, 2017). A supporto di ciò, per *P. citricarpa* è stato altresì dimostrato che i conidi possono essere dispersi mediante schizzi d'acqua ad un'altezza massima di 80cm dalla fonte di inoculo (Spòsito et al., 2011). Inoltre, si ricorda che nel campo in cui è stato effettuato questo studio la gestione della flora spontanea avveniva esclusivamente mediante trinciatura e diserbo chimico, pertanto non era presente l'effetto di interrimento dei residui colturali assicurato dalle lavorazioni del terreno. L'assenza delle lavorazioni, che ha comportato il mancato interrimento dei residui vegetali, è stato con ogni probabilità un fattore predisponente l'evasione del patogeno dalle foglie infette presenti sul suolo e il massiccio arrivo delle spore sulla vegetazione più bassa. Non è infine da escludere anche una certa influenza del sistema irriguo utilizzato nel campo oggetto di indagine (aspersione sottochioma) nel permettere sia la produzione di picnidiospore sia la loro dispersione ad opera degli schizzi d'acqua.

Figura 6. Relazione lineare negativa tra numero medio di picnidiospore catturate ed altezza di campionamento



CONCLUSIONI

Lo studio sperimentale svolto in Florida, sebbene condotto per una durata di sole quindici settimane, permette di comprendere per la prima volta la distribuzione verticale delle picnidiospore di *P. citricarpa* e l'efficacia di metodologie di indagine mai utilizzate per questo patogeno. Le conoscenze acquisite in questo studio potranno essere integrate al fine di migliorare la gestione della macchia nera degli agrumi. Ad esempio, poiché è stato ancora una volta dimostrato che i residui colturali infetti presenti sul suolo rappresentano la principale fonte di inoculo, è possibile programmare interventi che ne favoriscano una rapida decomposizione (lavorazioni del terreno, distribuzione di compost, letame e/o di microrganismi saprotrofi). In aggiunta, potrebbe essere utile adottare un sistema di irrigazione a goccia e rimuovere la porzione bassa della chioma mediante opportune operazioni di potatura (“*skirting*”), al fine di evitare “l'*host bridge*” tra i residui colturali infetti presenti sul suolo e la porzione mediana ed alta della chioma. Inoltre, vista la considerevole influenza dei parametri climatici sul rilascio delle picnidiospore, probabilmente in futuro si potranno sviluppare modelli previsionali utili alla messa a punto di DSSs (*Decision Support Systems*).

In definitiva, è bene porre grande attenzione alla macchia nera degli agrumi, malattia da quarantena non presente in Italia ma più volte intercettata in lotti di agrumi esteri diretti in Europa. Come prima accennato, l'ultima segnalazione più vicina al territorio nazionale riguarda la Tunisia in cui la presenza della malattia è stata confermata nel luglio 2019 dalla NPPO (National Plant Protection Organization) tunisina (EPPO, 2019).

LAVORI CITATI

- Benson A. H., 1895. Some fruit pests: Black spot of the orange. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 6: 249–251.
- Brentu F. C., Oduro K. A., Offei S. K., Odamtten G. T., Vicent A., Peres N. A., Timmer L. W., 2012. Crop loss, aetiology, and epidemiology of citrus black spot in Ghana. *European Journal of Plant Pathology* 133: 657–670.
- Dewdney M. M., Schubert T. S., Estes M. R., Roberts P. D., and Peres N. A., 2015. Citrus black spot. eds. In: 2016 Florida citrus pest management guide (Rogers M. E, Dewdney M. M.). University of Florida IFAS Extension. pp.73–77.
- EFSA, 2014. Scientific opinion on the risk of *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) for the EU territory with identification and evaluation of risk. *European Food Safety Authority Journal* 12: 1– 243.
- EPPO, 2019. First report of *Phyllosticta citricarpa* in Tunisia. *EPPO Reporting Service* no. 07–2019. Num. article: 2019/141.
- Hu J., Johnson E. G., Wang N.-Y., Davoglio T., Dewdney M. M., 2014. qPCR quantification of pathogenic *Guignardia citricarpa* and non-pathogenic *G. mangiferae* in citrus. *Plant Disease* 98: 112–120. Published by The American Phytopathological Society
- Lewis-Solomon C., 2018. *Phyllosticta citricarpa* growth dynamics on dead twigs and the underlying contributing environmental factors. Dissertazione dell'University of Florida.
- McAlpine D., 1899. Fungus diseases of citrus trees in Australia, and their treatment. *R.S. Brain, government printer*.
- Onesti G., Gonzalez-Dominguez S., Rossi V., 2017. Production of Pycnidia and Conidia by *Guignardia bidwellii*, the Causal Agent of Grape Black Rot, as Affected by Temperature and Humidity. *Phytopathology* 107:173-183. Published by The American Phytopathological Society
- Spósito M. B., Amorim L., Bassanezi R. B., Yamamoto P. T., Felipe M. R., Czermainski A. B. C., 2011. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. *Crop Protection* 30: 1546–1552.
- URI Genomics & Sequencing Center, 2004. Calculator for determining the number of copies of a template; creato da Andrew Staroscik. University of Rhode Island - College of the environment and life sciences. Disponibile su: <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>
- USDA, 2010. USDA confirms new citrus disease in Florida. Comunicato stampa del 08-04-2010.
- Wang N.Y., Zhang K., Hugueta-Tapia J. C., Rollins J. A., Dewdney M. M., 2016. Mating type and simple sequence repeat markers indicate a clonal population of *Phyllosticta citricarpa* in Florida. *Phytopathology* 106: 1300–1310. Published by The American Phytopathological Society
- Zhang K., 2017. The population structure of *Phyllosticta citricarpa* and seasonal dynamics of *Phyllosticta* spp. in Floridian citrus groves. Dissertazione dell'University of Florida