

Etiología, historia, situación mundial y manejo de la leprosis de los cítricos y sus vectores

Maria Andréia Nunes
Centro APTA Citros Sylvio Moreira
Instituto Agronômico de Campinas



Primer reporte



1907

1920

1931

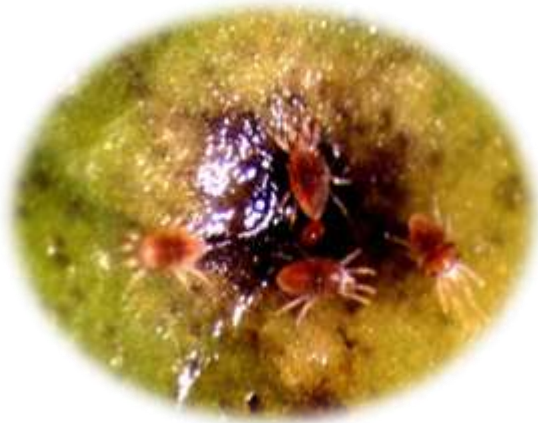
1932

“scaly bark”
“nail head rust”
Florida-EUA
Fawcett

“lepra explosiva”
Paraguay
Spegazzini

“leprose dos citros”
São Paulo – Brasil
Bitancourt

Argentina
Zeman



Asociación con *Brevipalpus*

(toxina del ácaro?)



<http://idtools.org/id/mites/flatmites/index.php>



1945

B. obovatus

Argentina

Frezzi; Vergani

1963

B. phoenicis

Brasil

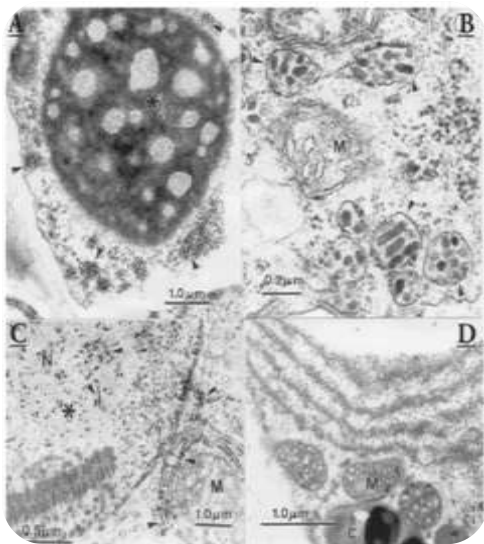
Musumecchi & Rosseti

1968

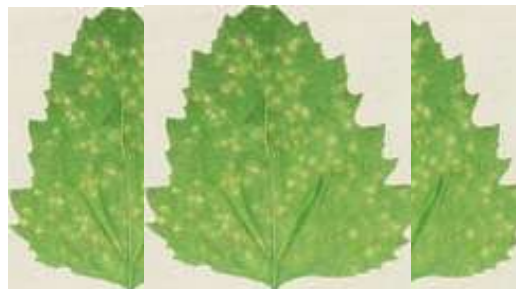
B. californicus

EUA

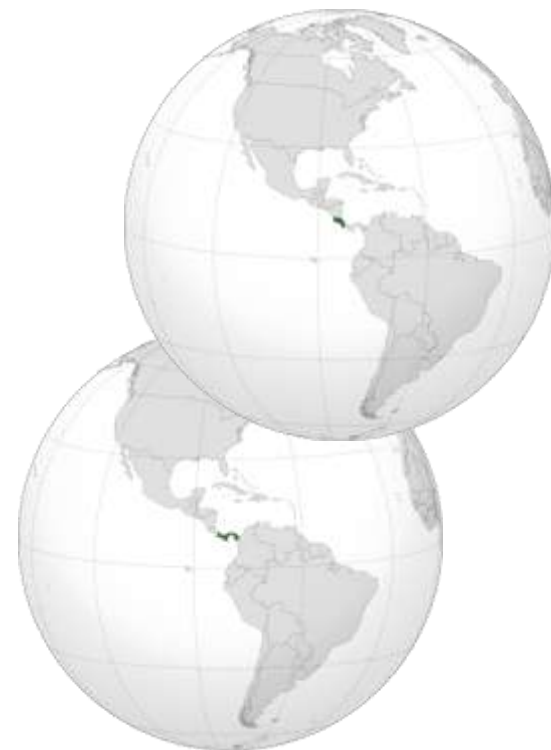
Knorr



Gomphrena globosa



Chenopodium amaranticolor
C. quinoa



1972; 1974

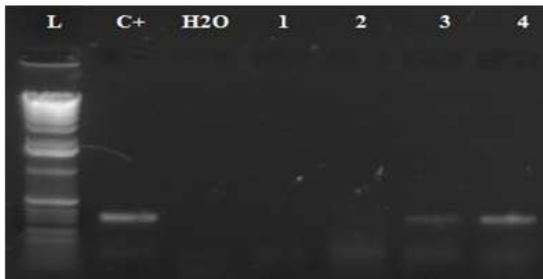
1995

2000

Observación de partículas
Microscopía electrónica de
transmisión
Kitajima *et al.*

Transmisión mecánica
hospedantes no cítricos
Colariccio *et al.*

América Central
Panamá y Costa Rica
Araya González *et al.*



2003

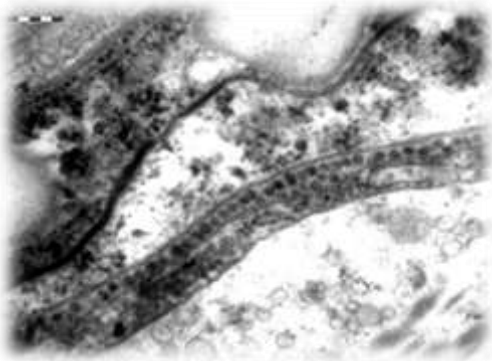
Diagnóstico por RT-PCR
Locali *et al.*

2004

Leprosis de los cítricos
en América del Norte
México
Senasica

2006

Genoma
Citrus leprosis virus C
Cilevirus
Locali-Fabris *et al.* y Pascon *et al.*



CiLV-C en ácaros
Persistente/Circulativo



Swinglea glutinosa



Commelina benghalensis



2007

Nicolini *et al.*

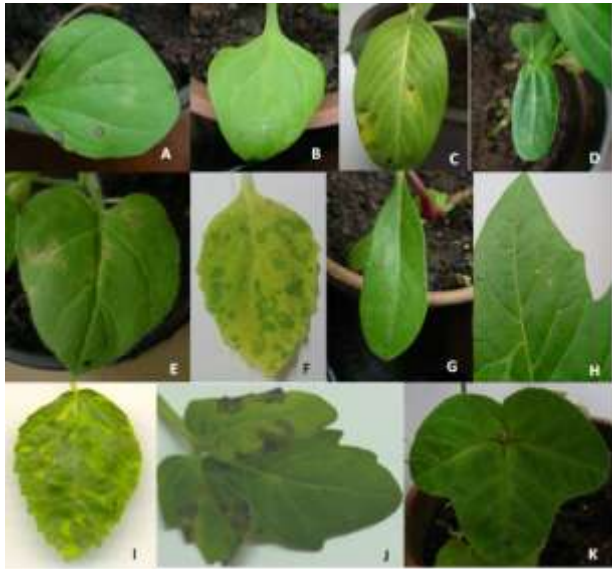
Kitajima & Alberti, 2010

2008

Plantas no cítricas
naturalmente
infectadas con CiLV-C
Léon; Nunes *et al.* (2012)

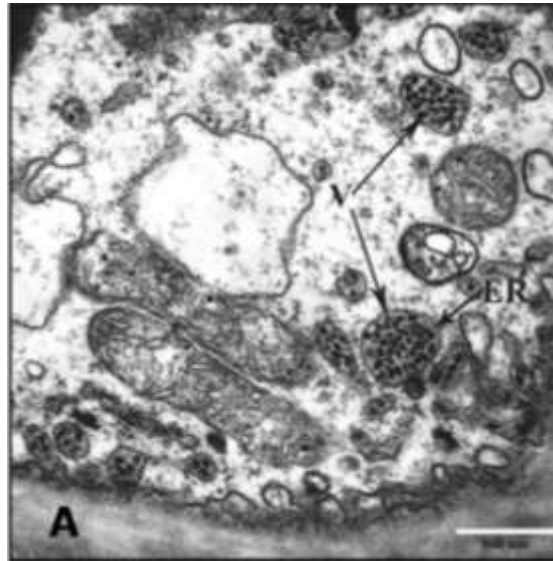
2010

ICTV (International
Committee on Taxonomy
of Viruses)
Cartens



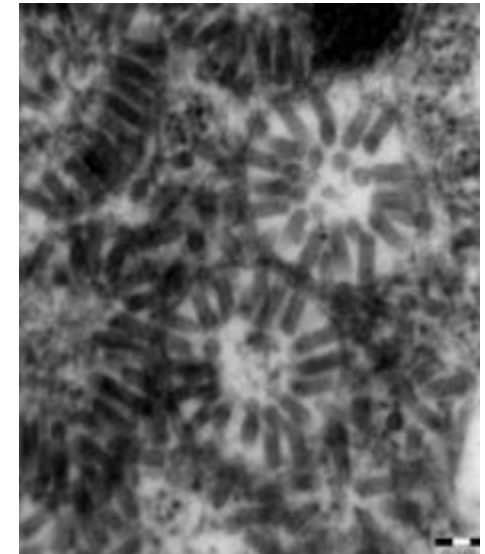
2013

CiLV-C
 Más de 40 hospederas
 experimentales
 Garita



2013

Citrus leprosis virus
 cytoplasmic
 type 2
 Roy *et al.* (a)



2013

Citrus leprosis virus
 nuclear
 Genoma
 Roy *et al.* (b)

Situación actual

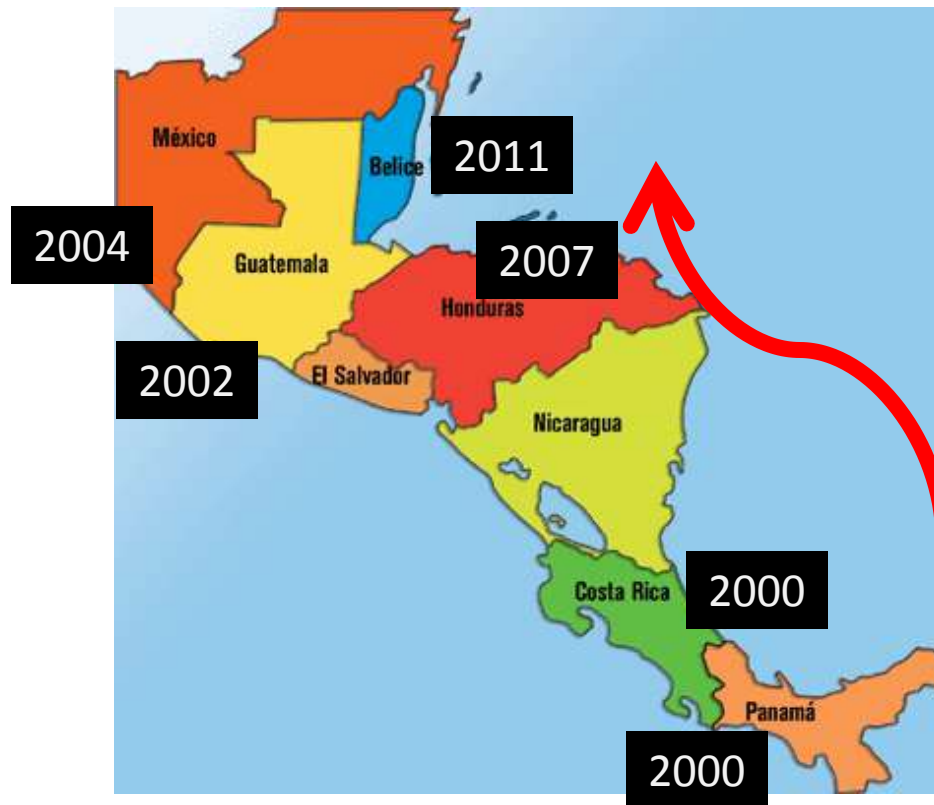
Américas:

EUA no existe desde 1968:

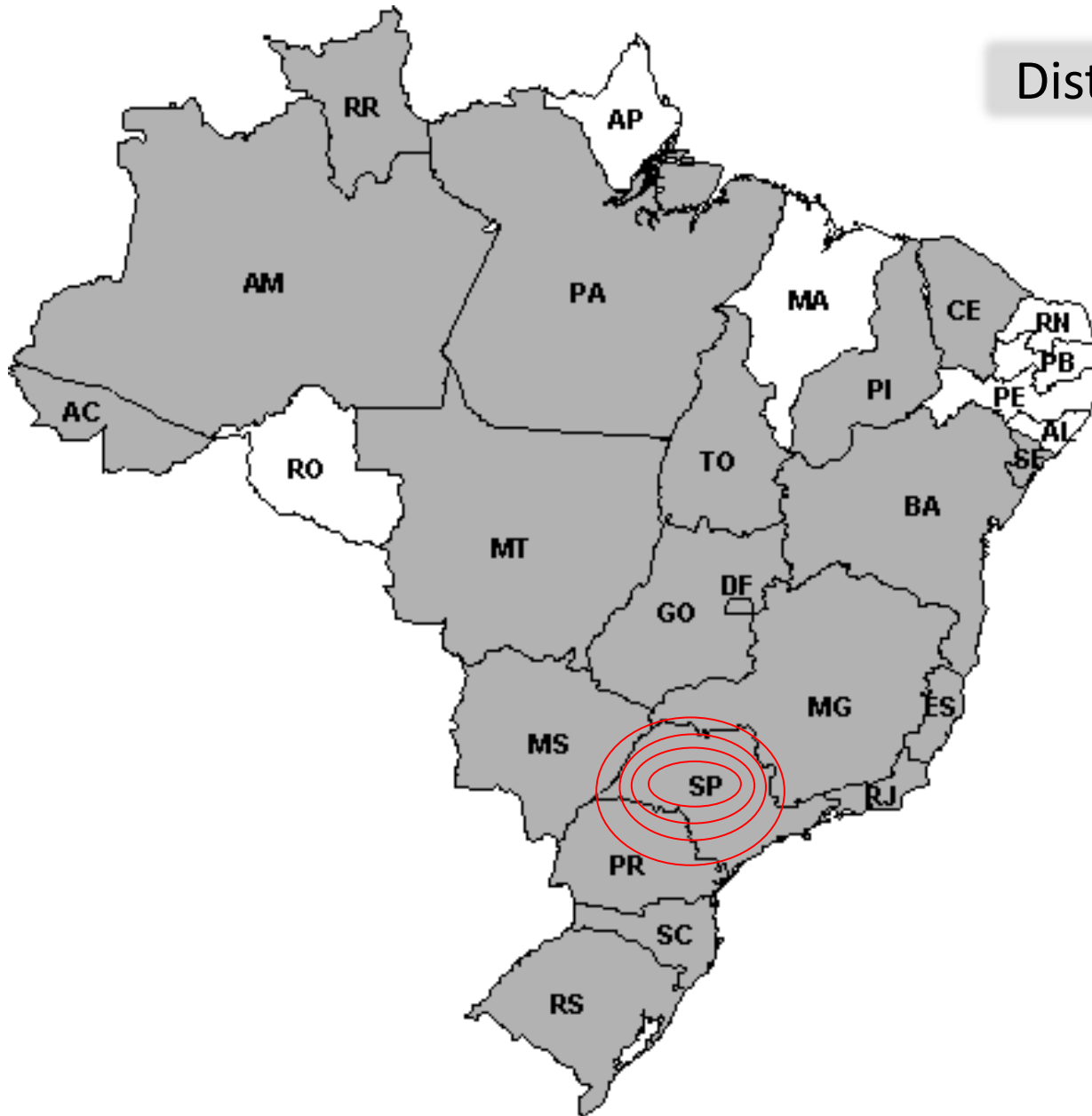
- probablemente fue Leprosis del tipo nuclear
- extinguido debido a heladas e intensas pulverizaciones



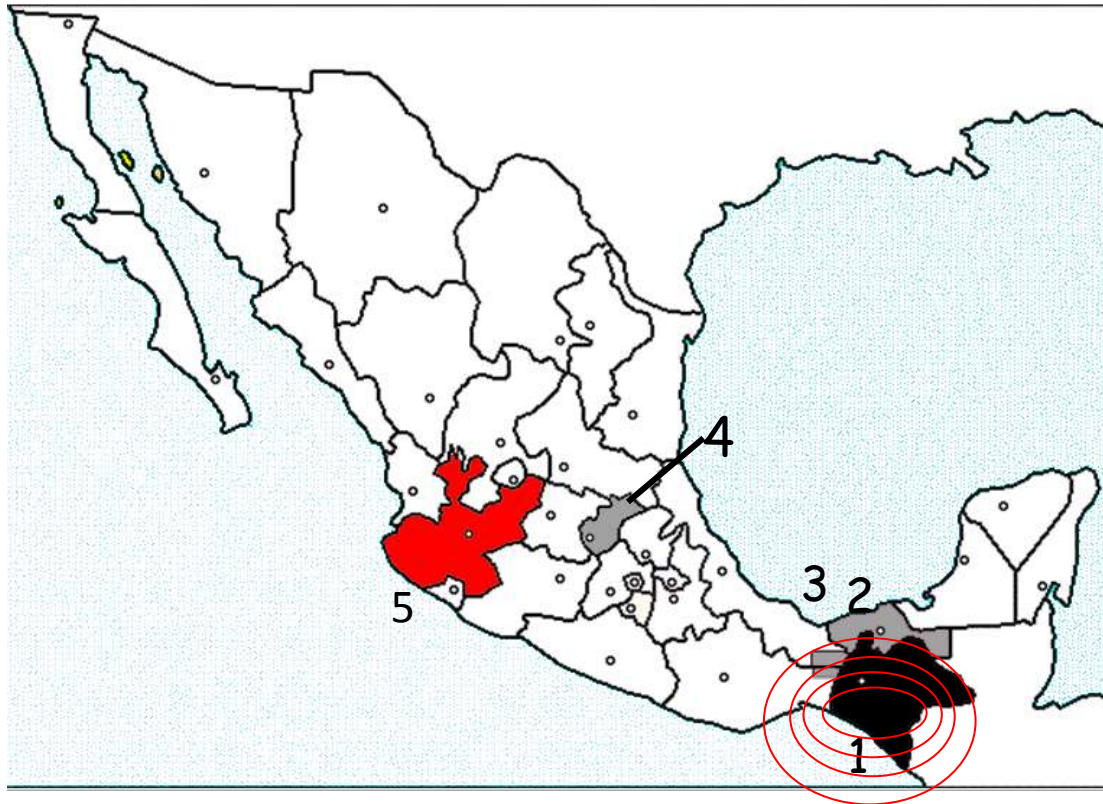
Dispersión reciente



Distribución en Brasil



Distribución en México

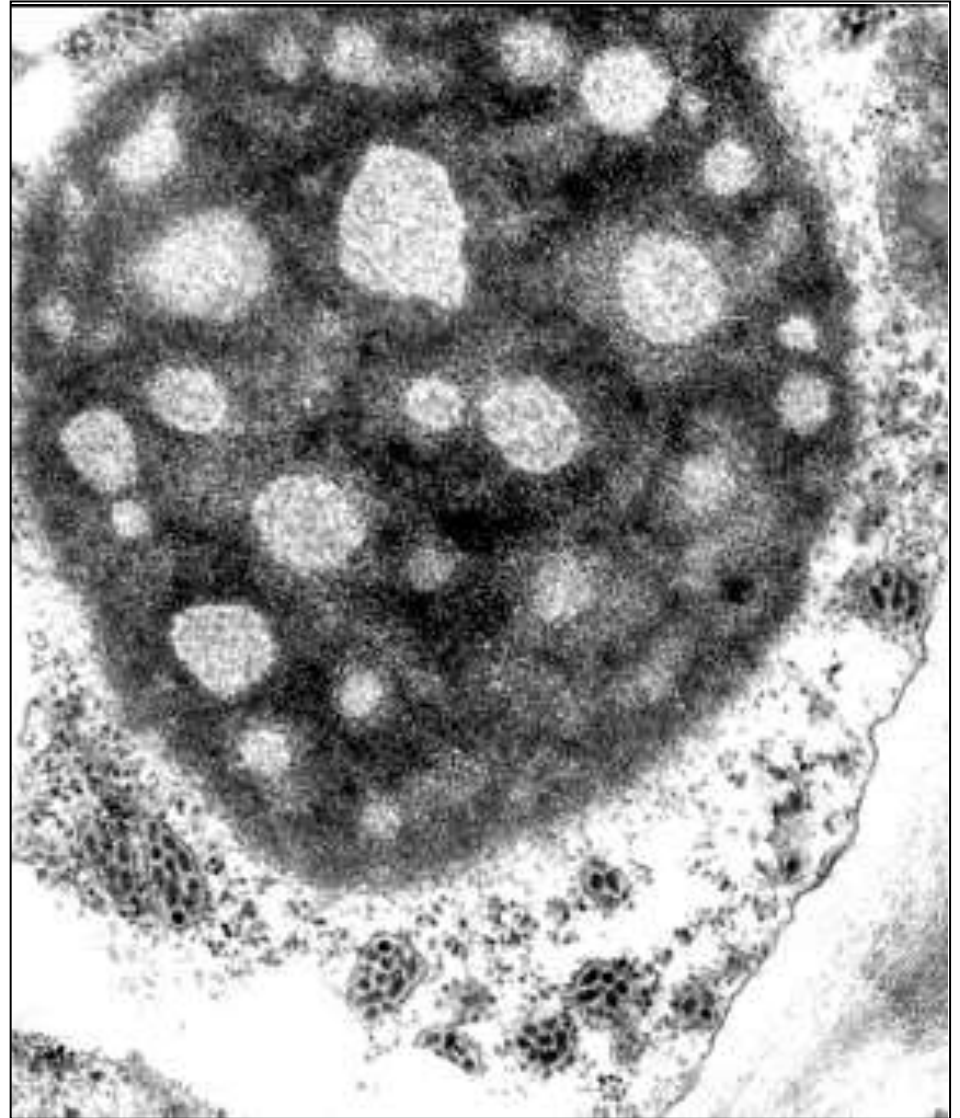


Primer reporte en 2004

- 1. Chiapas -2004
(30 municipios)
- 2. Tabasco -2007
(dos municipios – Huimanguillo y Cunduacán)
- 3. Veracruz - 2010
(un municipio – Las Choapas)
- 4. Querétaro *- 2011
(un municipio -Tolimán)
- 5. Jalisco* - 2012
(un municipio –Guadalajara)

La Leprosis típica y prevalente

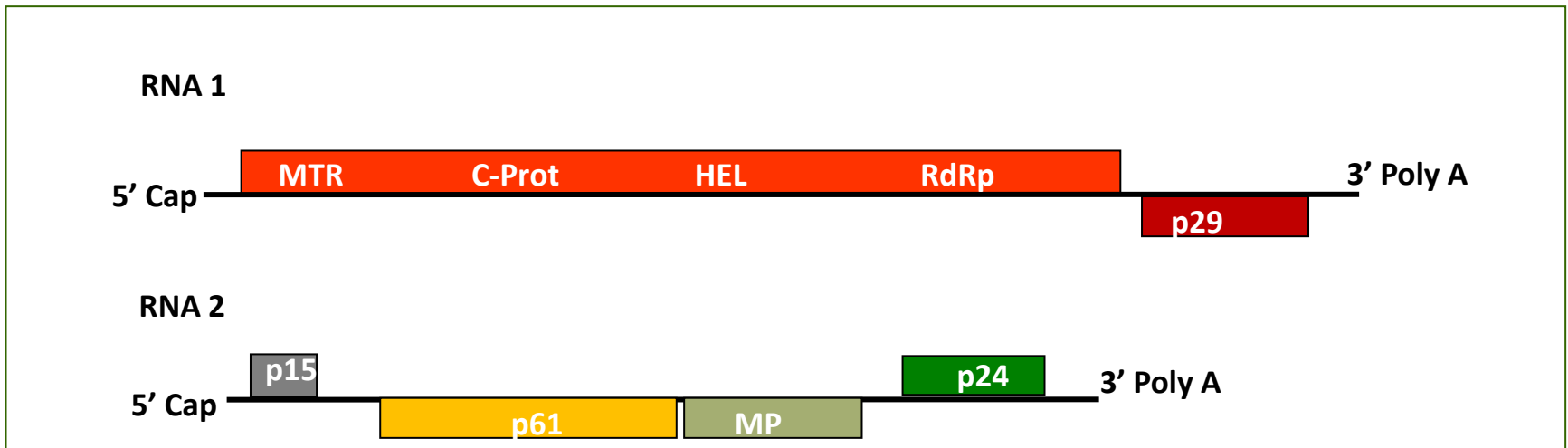
99% de todos los reportes
Citrus leprosis virus C (CiLV-C)



Genoma de CiLV-C

Miembro tipo del género *Cilevirus*
(Locali-Fabris *et al.*, 2006)

Genoma bipartito ssRNA (+) 8.745 y 4.986 nucleótidos





Importancia en Brasil

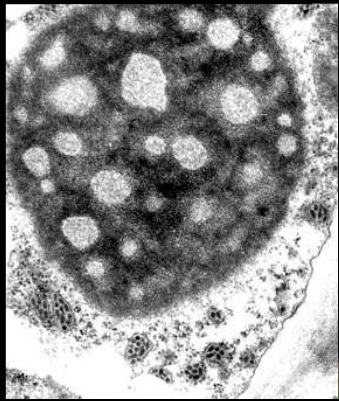
Disminuye el valor cosmético y la producción

La Leprosis es la principal enfermedad viral de los cítricos en Brasil

US\$ 80-100 millones/año para el control del vector



virus X planta X vector

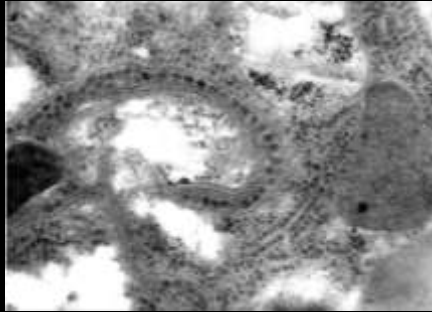


Adquisición

Replicación del virus en la planta



4 horas



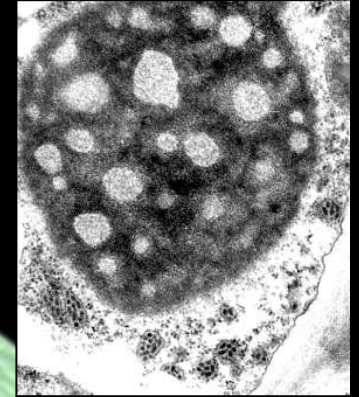
virus en ácaro
Circulativo

Transmisión



1 hora

Replicación del virus en la planta



síntomas
± 15 días



En el ácaro

-Virus circulativo

-No hay transmisión vertical



En la planta

-Replicación del virus

- Lesiones localizadas

Órganos afectados

No hay infección sistémica



hojas



frutos



ramas

Diagnóstico

- Síntomas en los frutos



Lesiones localizadas
circulares
Cloróticas/Necróticas
 $\varnothing = 5-12$ mm
caída

- Lesiones deprimidas en el centro
- Halo clorótico
- Presencia ocasionales de rajaduras o goma en el centro de la lesión





Síntomas en híbridos





Diagnóstico

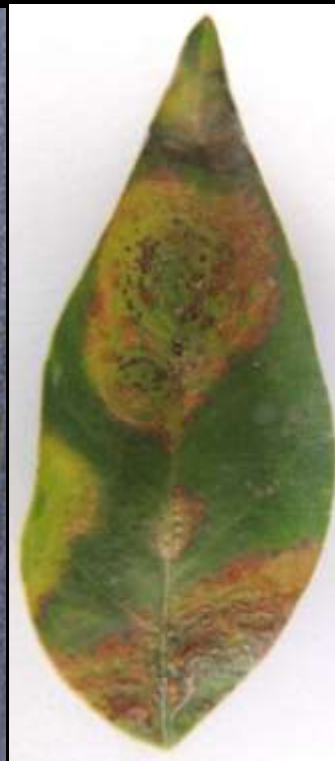
- Síntomas en las hojas

Lesiones localizadas

$\varnothing = 2-3 \text{ mm}$

Círculos concéntricos
cloróticos o necróticos

Defoliación



Diagnóstico

- Síntomas en las ramas

Manchas circulares
localizadas
cloróticas/necróticas
Descamación
Muerte de las ramas



Extremadamente importante como fuente de inóculo en el campo

Diagnóstico

b. Microscopía electrónica de transmisión – MET

Localización subcelular

Morfología

Tamaño de la partícula

Lumen del retículo endoplasmático

Partículas baciliformes y cortas

50-60 x 100-120nm

Viroplasmias densas y vacuolados 3-5 μm

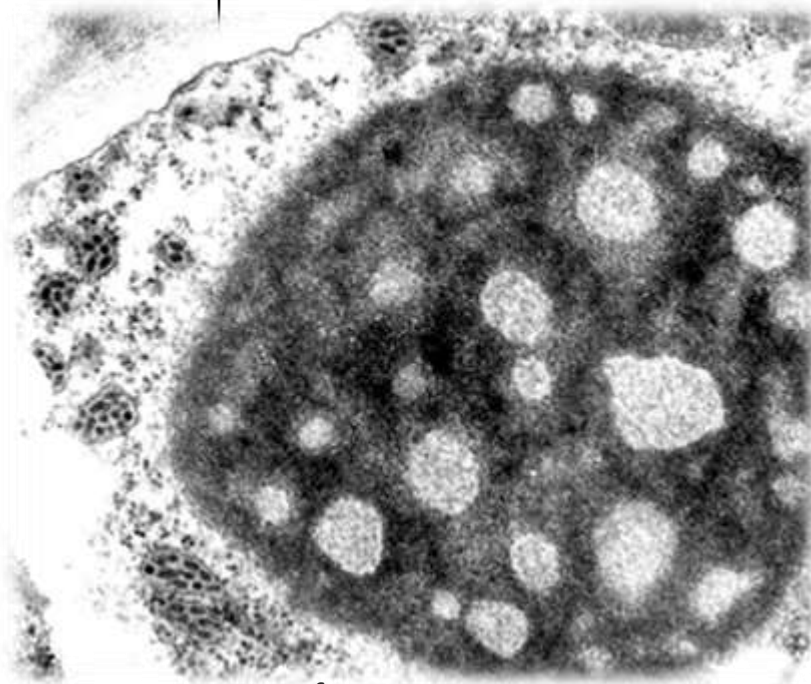
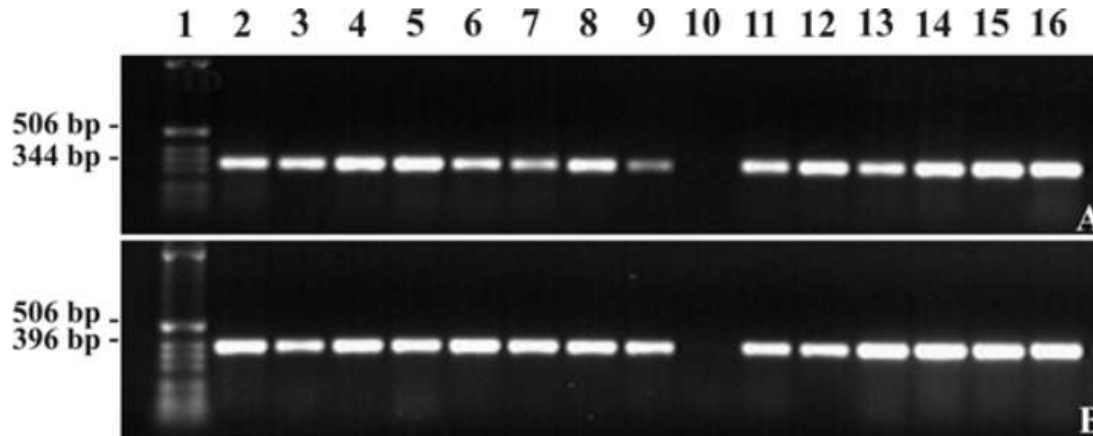


foto: E.W. Kitajima

Diagnóstico c. RT-PCR

CiLV-C



A. Proteína de movimiento - MP
B. RpRd

Locali *et al.* (2003)

CiLV-C+ CTV (*Citrus tristeza virus*)



Freitas-Astúa *et al.* (2005)

Diagnóstico d. Inmunoensayo (ELISA) anti CP

TABLE 2. PTA-ELISA using different dilutions of CiLV-C p29 antibody. Optical density measured 3h after adding the substrate. Pera sweet orange leaf lesions from Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP, Brazil

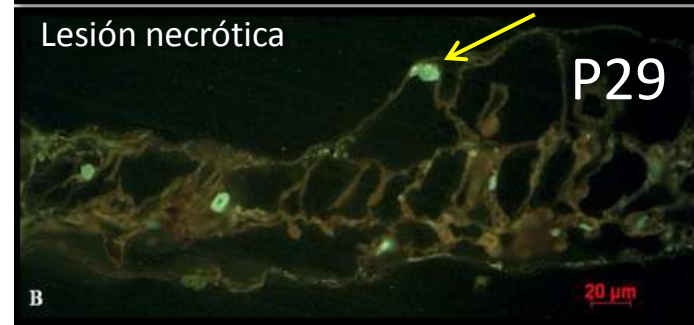
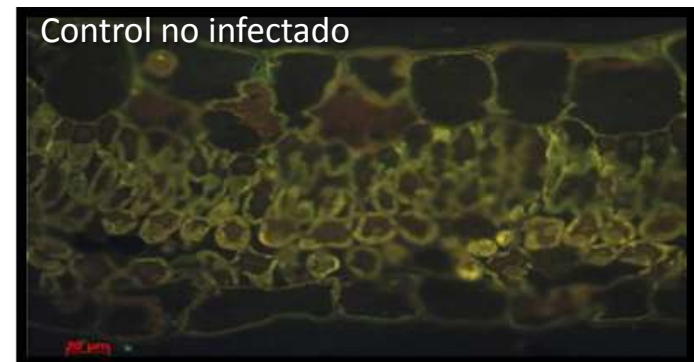
Sample	Leaf extract (Absorbance at 405nm)			
	Test 1	Test 2	Average ^{1,2}	S/H ratio ¹
Antibody against p29 diluted at 1:1000				
Healthy	0.223	0.206	0.214	
YL ²	1.884	1.781	1.833	8.57
IL	1.816	1.834	1.825	8.52
OL	1.404	1.510	1.457	6.81
Antibody against p29 diluted at 1:2000				
Healthy	0.122	0.161	0.141	
YL	1.634	1.529	1.582	11.22
IL	1.548	1.515	1.532	10.86
OL	1.145	1.239	1.192	8.45
Antibody against p29 diluted at 1:5000				
Healthy	0.069	0.061	0.065	
YL	1.097	1.058	1.078	16.59
IL	0.891	0.814	0.853	13.12
OL	0.760	0.818	0.789	12.14

¹Sample/healthy

²YL, young lesions, IL, intermediate lesions and OL, old lesions

Calegario *et al.*, 2013

Diagnóstico e. Inmunofluorescencia



Calegario, 2009

Otros agentes causales de síntomas similares a la Leprosis de los cítricos

1. CiLV-N



Kitajima *et al.*, 1972

2. CiLV-C2



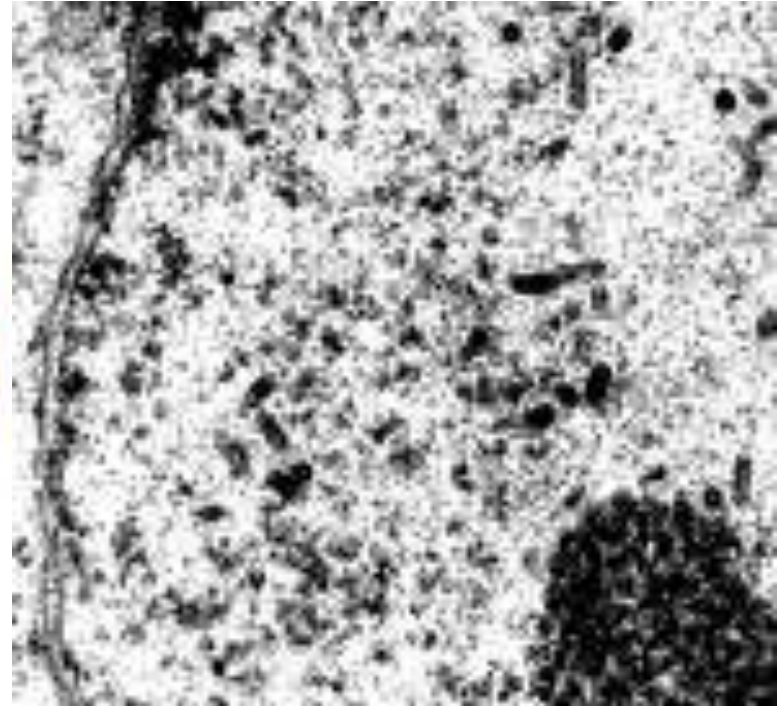
Roy *et al.*, 2013

3. HGSV



Melzer *et al.*, 2011

Leprosis causada por **Citrus leprosis virus N (CiLV-N)**



- Brasil (1972), Panamá (2001) y México (2012)
- Supuestamente fue la Leprosis en los E.U.A.
- En Brasil se presenta en zonas de clima frío y no comerciales

Citrus leprosis virus N (CiLV-N)

Morfología

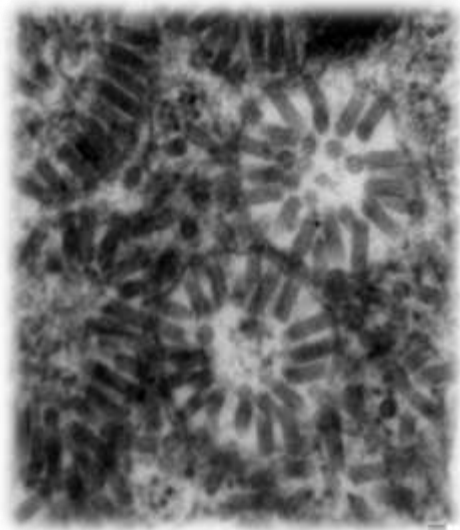


Foto: E. W. Kitajima

Tamaño de la partícula

Localización subcelular

Síntomas

Informes

Transmisión

Partículas baciliformes y desnudas

Estructura en forma de rueda de carreta

Viroplasmias densos en el núcleo

40-50 x 100-110 nm

Núcleo

Locales (cloróticos/necróticos)

Pocos

***Brevipalpus* spp.**

Genoma de CiLV-N

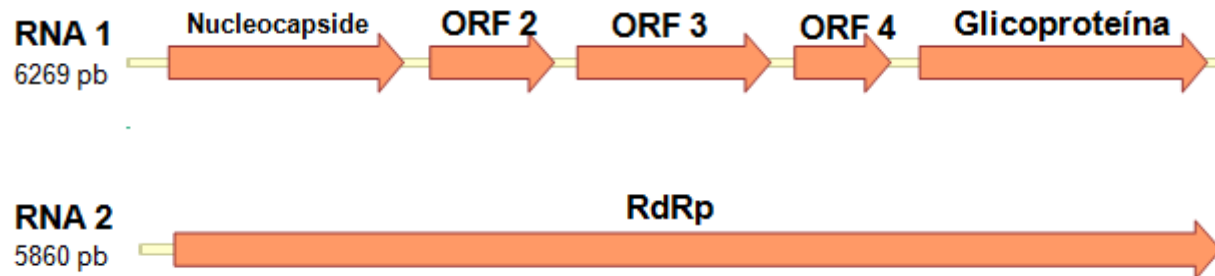
familia *Rhabdoviridae*

género **Dichorhabdovirus** (Roy *et al.*, 2013a)

familia -

género **Dichorhavirus (miembro tipo)** (Dietzgen *et al.*, in press)

Genoma bipartito ssRNA (-) 6.268 y 5.847nucleótidos



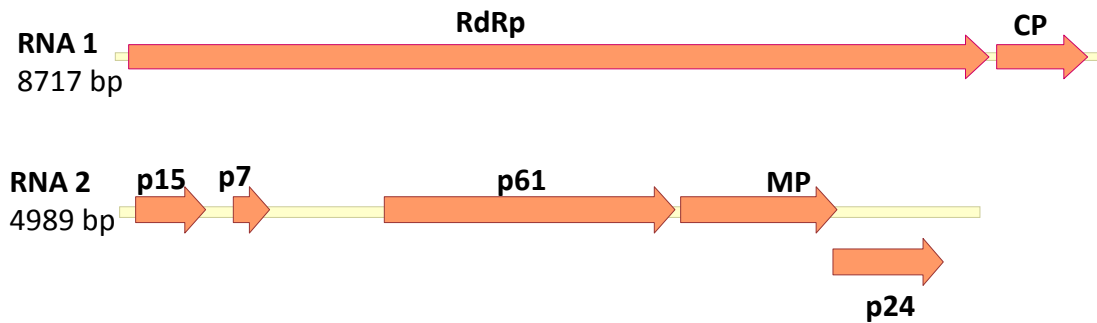
Identidad con Orchid fleck virus (*OFV): RNA1 90% y RNA2 91%

*OFV es transmitido por *B. californicus*

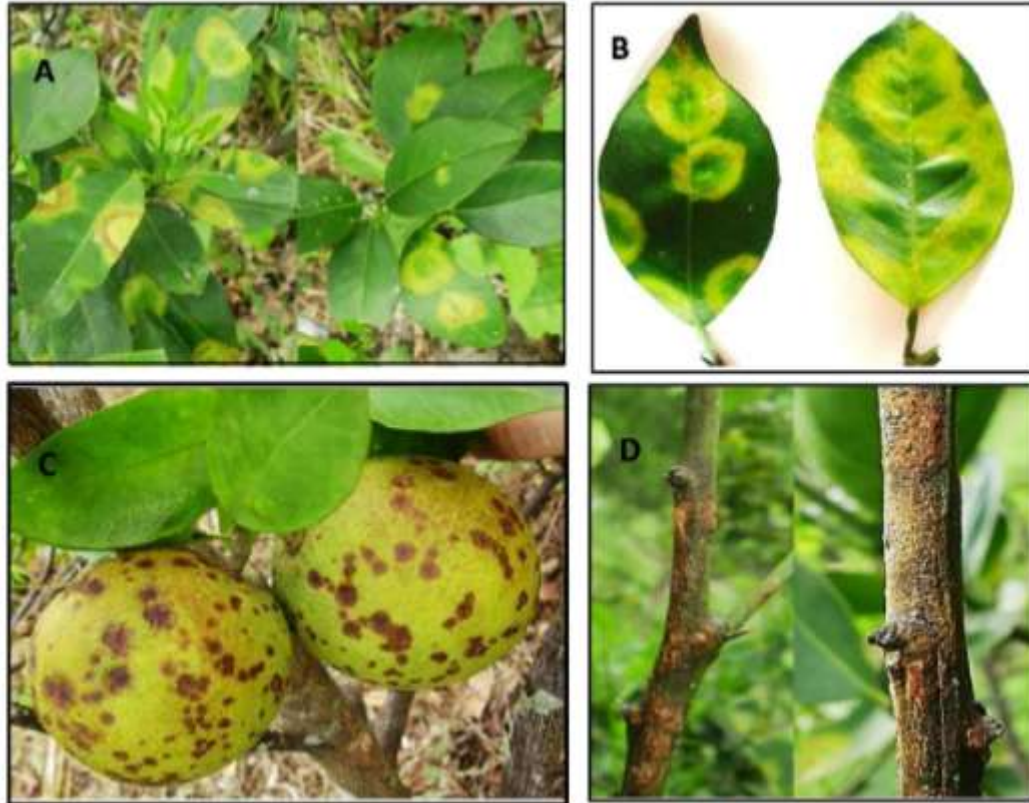
Genoma de CiLV-C Tipo 2

CiLV-C type 2, reportado en Colombia probablemente una especie diferente (Roy *et al.*, 2013b)

Genoma bipartito ssRNA (+) 8,717 y 4,989 nucleótidos



Identidad con CiLV-C: RNA1 58% y RNA2 49%.
Los viriones son semejantes.



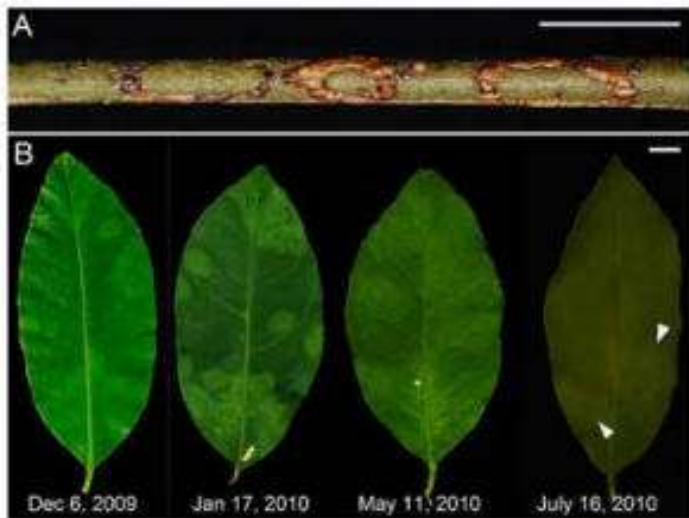
Síntomas en hojas de naranja Valencia (A, B), frutos (C) y ramas (D) de planta infectada por Citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2). Roy *et al.*, 2013b

Hibiscus green spot virus (HGSV)

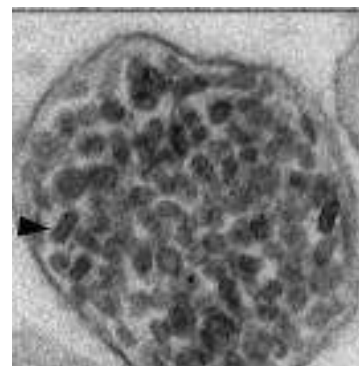
Higrevirus

Hawaii

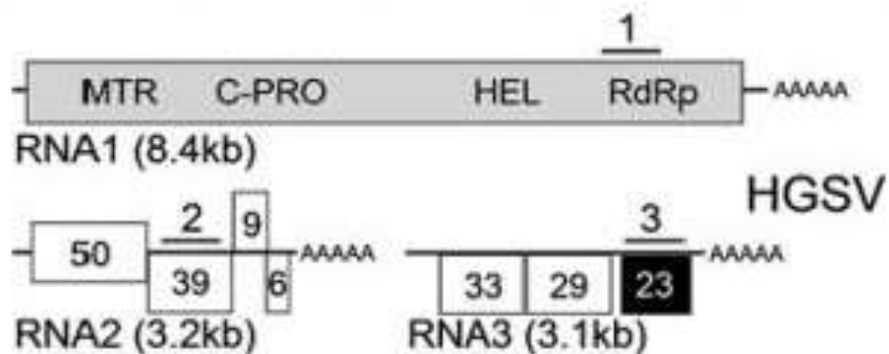
Melzer *et al.*, 2011



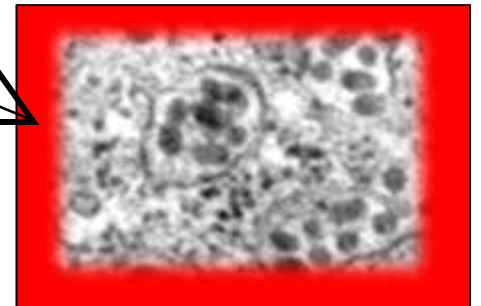
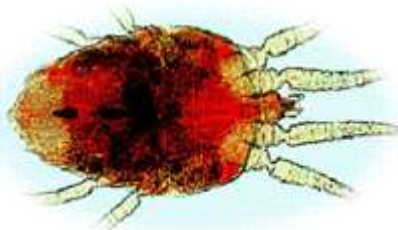
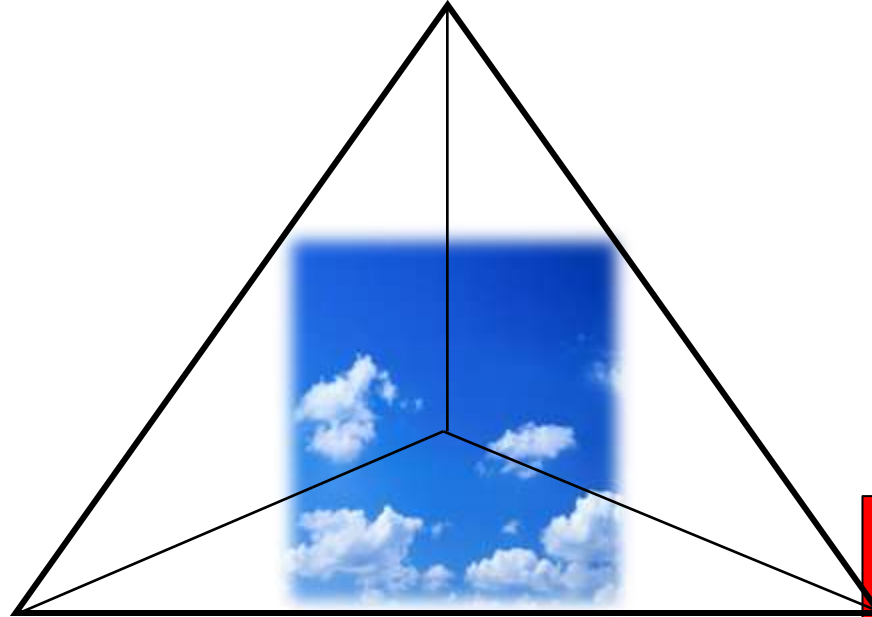
C. volkameriana



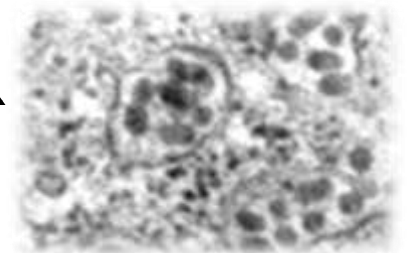
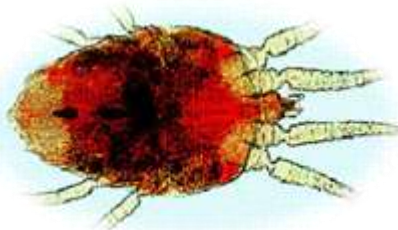
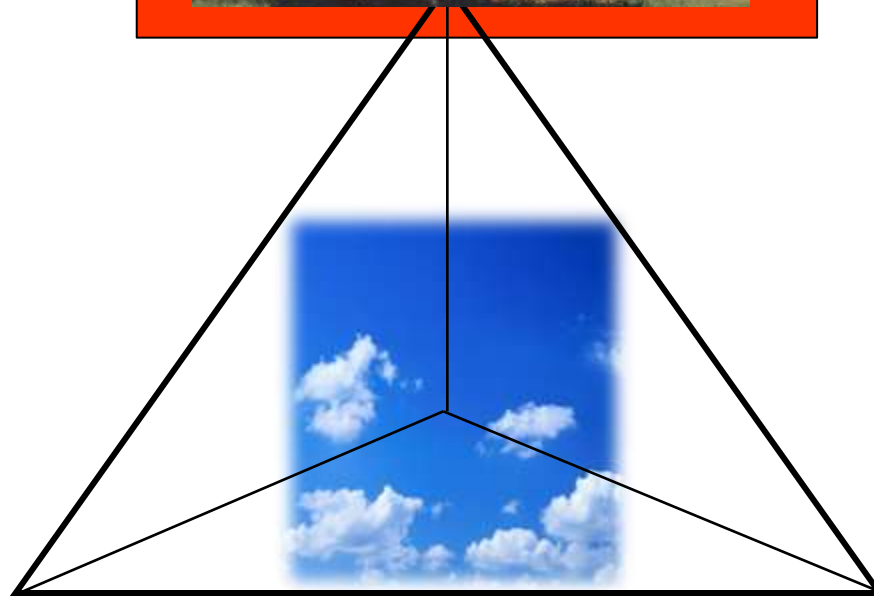
Hibiscus arnottianus



El tetraedro de la enfermedad

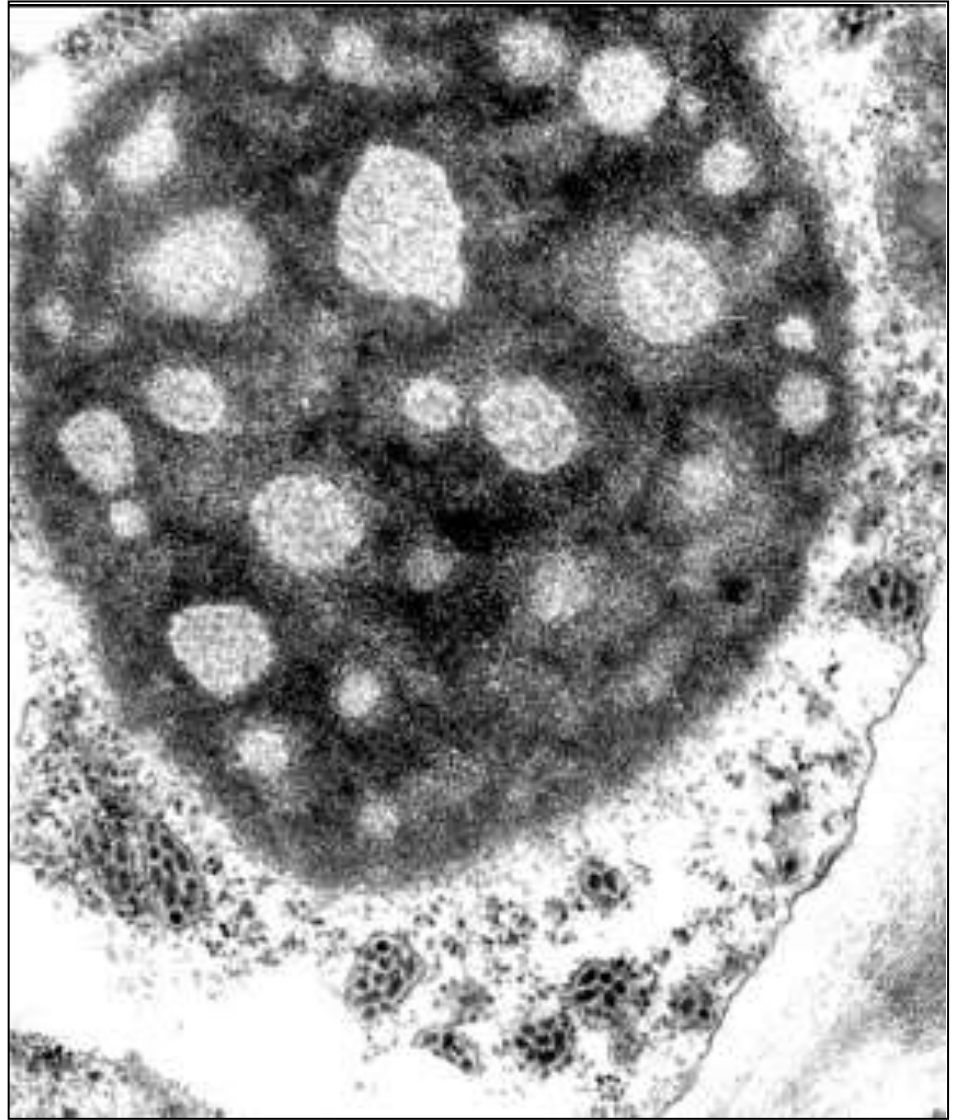


El tetraedro de la enfermedad

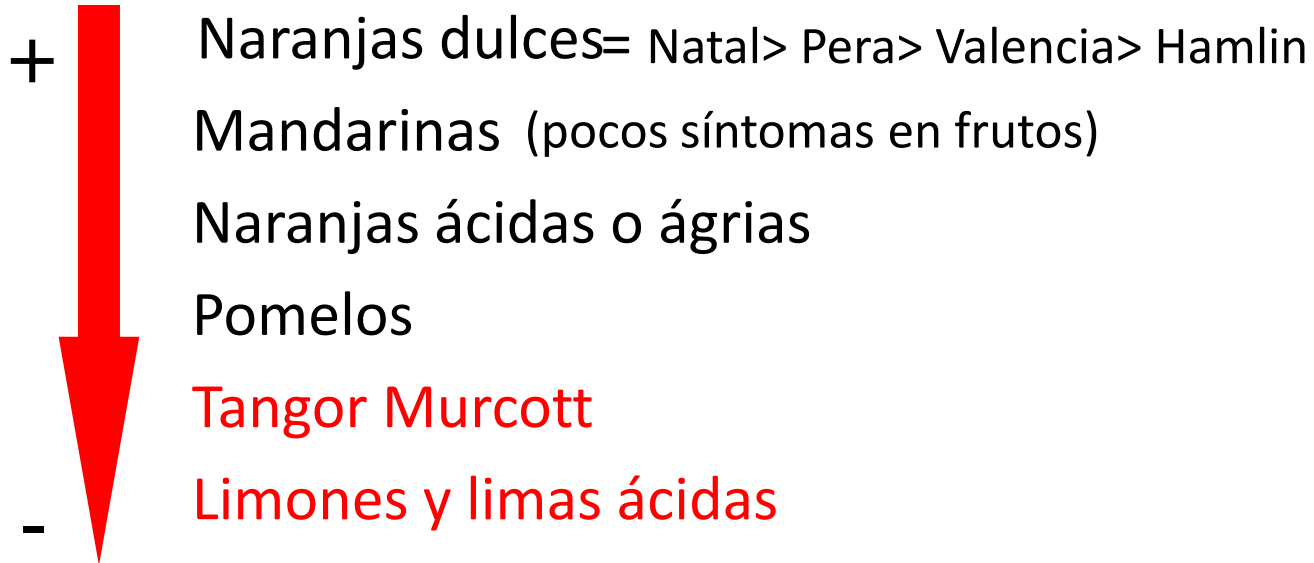


La Leprosis típica y prevalente

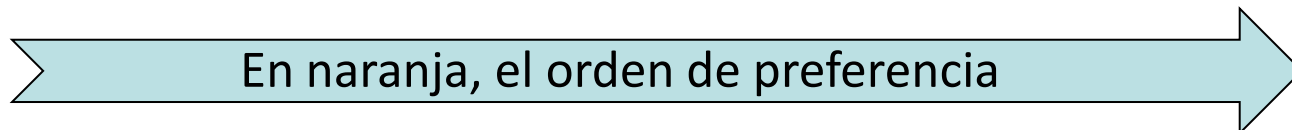
Citrus leprosis virus C (CiLV-C)



Hospederas: *Citrus* spp.



Los ácaros colonizan todas las plantas cítricas



hojas ramas frutos lisos frutos irregulares



Hospedantes naturales no cítricos

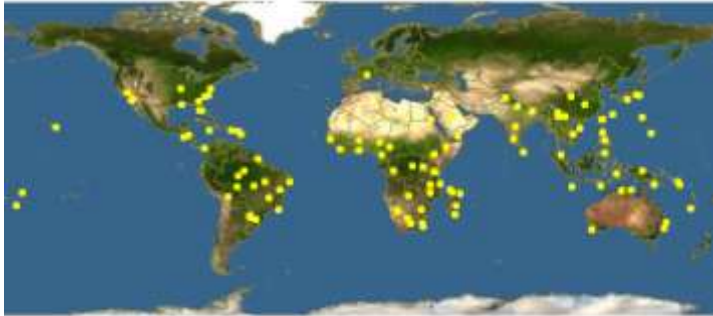
Limoncillo -*Swinglea glutinosa*

- Rutaceae
- Cerca-viva
- Colombia



Yuquilla, Siempre viva (Tropical spiderwort)

Commelina benghalensis



-*Commelinaceae* – Monocotiledónea

-Semi-perenne

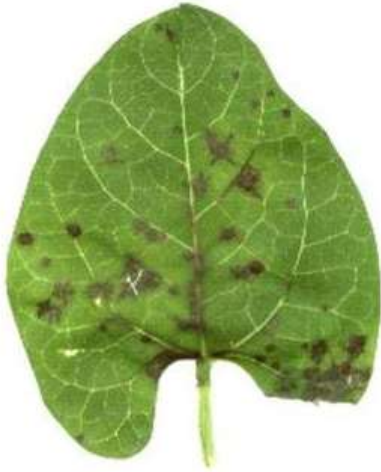
-Hospedera de *B. phoenicis*

-Maleza común en plantaciones de los cítricos

-Ácaros de *C. benghalensis* sintomática transmiten CiLV-C para cítricos

Hospederas experimentales no cítricos

Foto: E.W. Kitajima



Phaseolus vulgaris - frijol

Presenta síntomas 3-5 días después de infestados con los ácaros virulíferos

Garita *et al.*, 2013



Arabidopsis thaliana

Planta modelo para estudios genéticos

Arena *et al.*, 2013

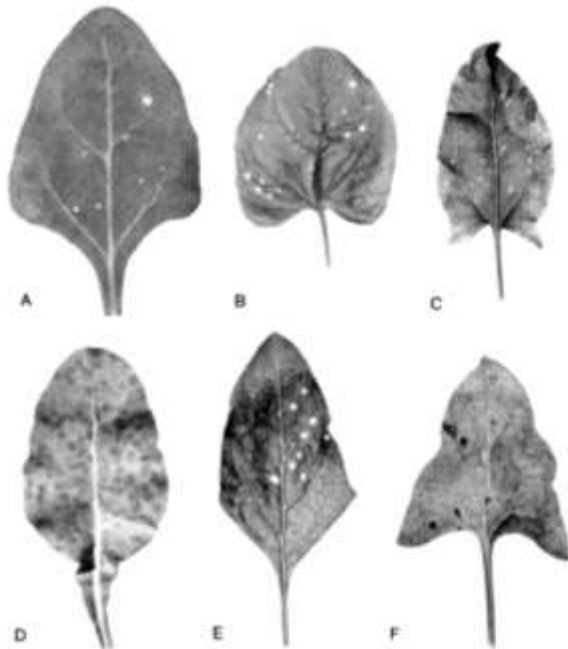
Hospederas experimentales no cítricos

Más de 40 plantas hospederas

Inoculación mecánica

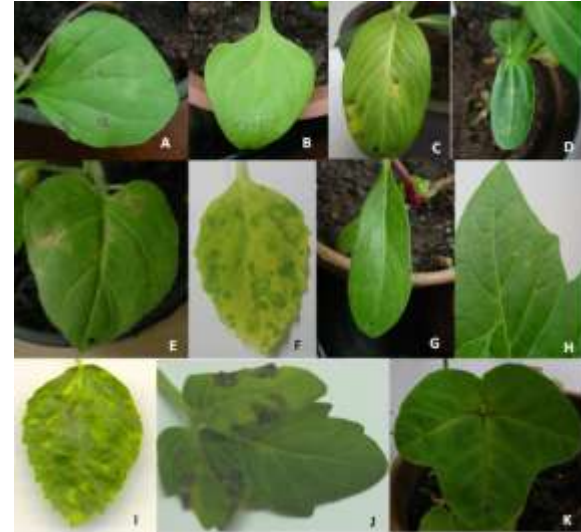


Colariccio *et al.* 1995



Lovisoló *et al.* 2000

Inoculación con ácaros

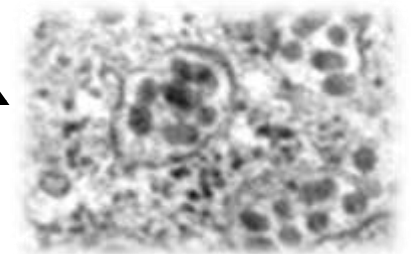
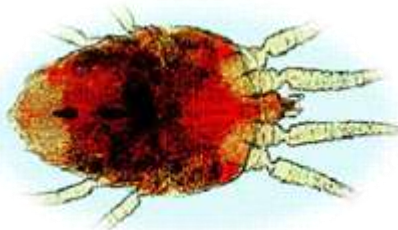
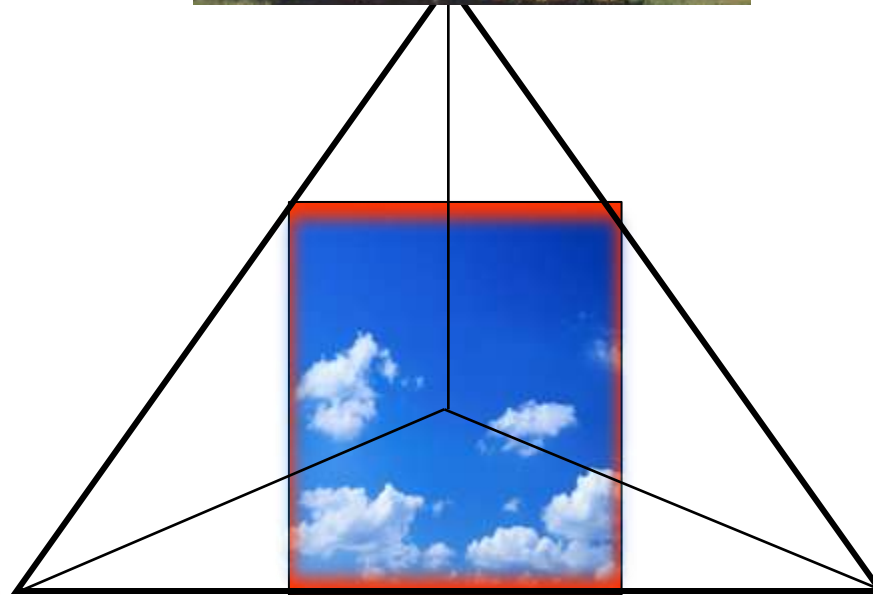


Garita, 2013



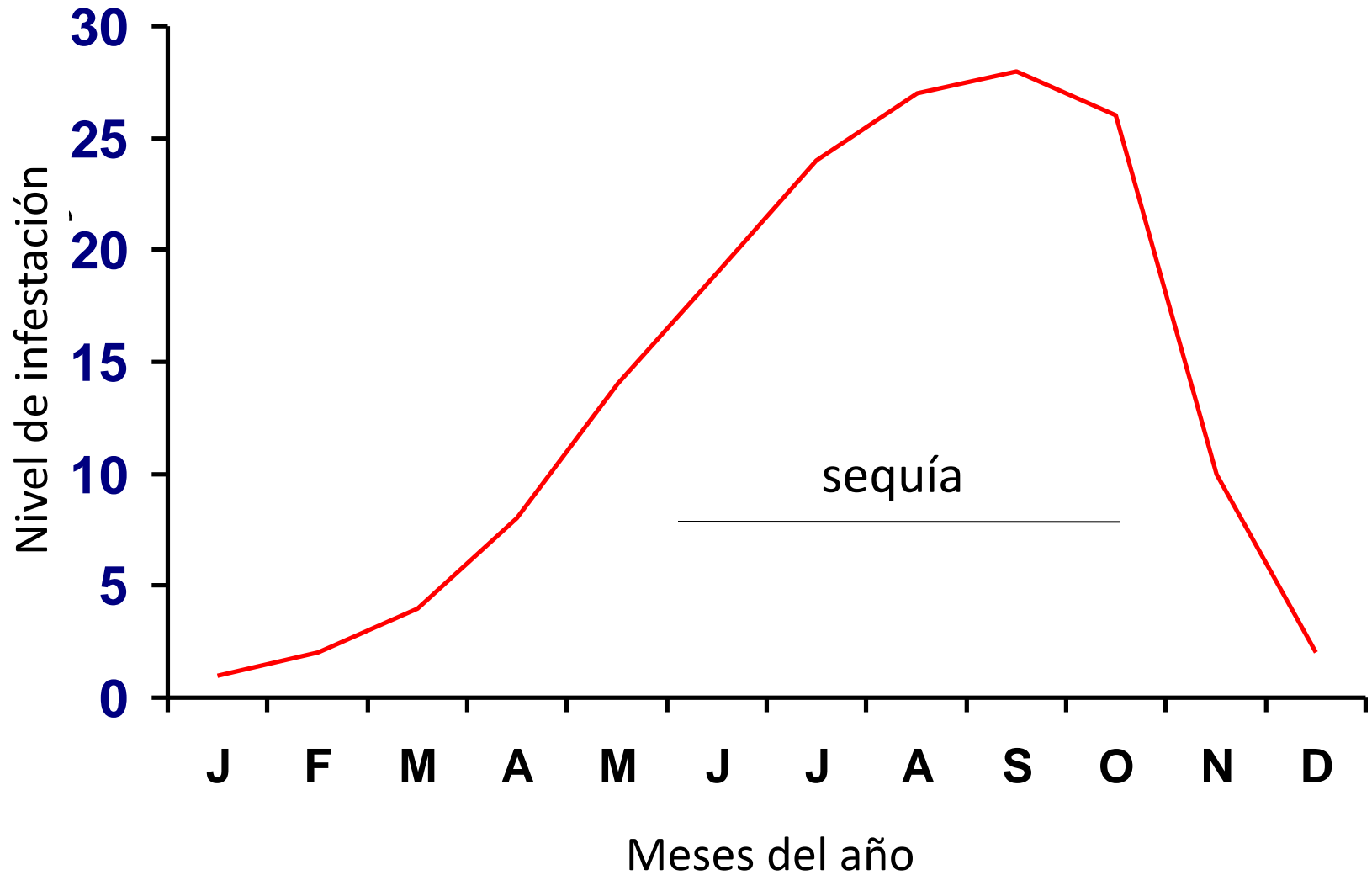
Nunes *et al.*, 2012

El tetraedro de la enfermedad



Fluctuación poblacional

Ácaros están en el campo todo el año
en Brasil



Sequía

Baja capacidad de campo favorece el aumento de la población de ácaros.

Andrade *et al.*, 2012

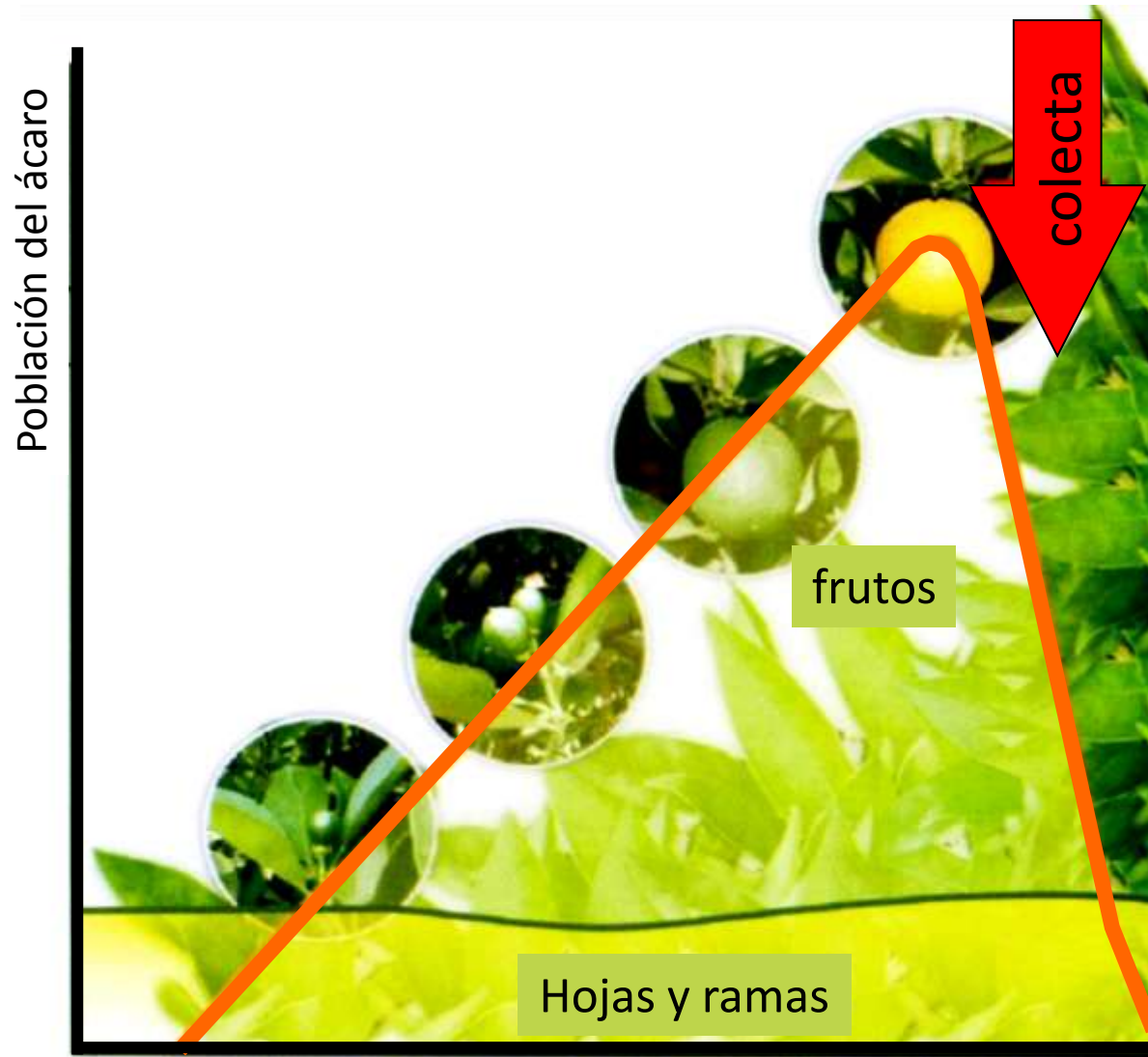
Table 2. Summary of the variance analysis for mean mite number, leprosis severity rating and nitrogen content in plants of Pera sweet orange (*Citrus sinensis*) at four field capacity levels, three rootstocks and two *Brevipalpus phoenicis* populations

Variables	Mite number ^a	Severity rating ^a	Nitrogen content ^a (g kg ⁻¹)
Field capacity (A):			
25%	162.6 a	1.8 a	26.3 a
40%	123.0 b	1.6 ab	24.5 ab
55%	94.8 c	1.3 b	25.2 ab
70%	74.5 d	1.3 b	23.7 b
Rootstock (B)			
Rangpur lime (<i>Citrus limonia</i>)	123.5 a	1.5 a	26.4 a
Cleopatra (<i>C. reshni</i>)	122.0 a	1.6 a	22.6 b
Sunki (<i>C. sunki</i>)	87.9 b	1.4 a	25.7 a
<i>B. phoenicis</i> population (C):			
Viruliferous	123.8 a	3.2 a	26.5 a
Non-viruliferous	99.5 b	0.0 b	23.7 b
F-test	78.4 *	4.6 *	4.2 *
Interactions:			
A × B	1.7 ns	0.6 ns	2.3 ns
A × C	0.3 ns	4.6 *	4.3 *
B × C	1.1 ns	0.5 ns	1.4 ns
A × B × C	1.5 ns	0.6 ns	1.7 ns
CV ^b (%)	12.2	13.0	17.0

^a Means followed by the same letter do not differ by Tukey's test at a 5% significance level; * : significant at 5% level; ns: not significant.

^b Coefficient of variation.

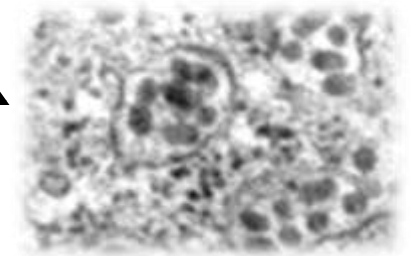
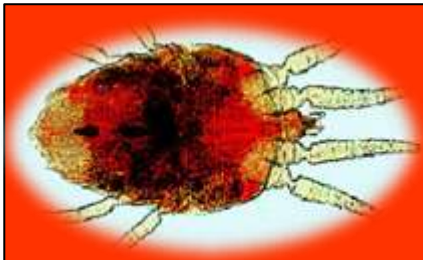
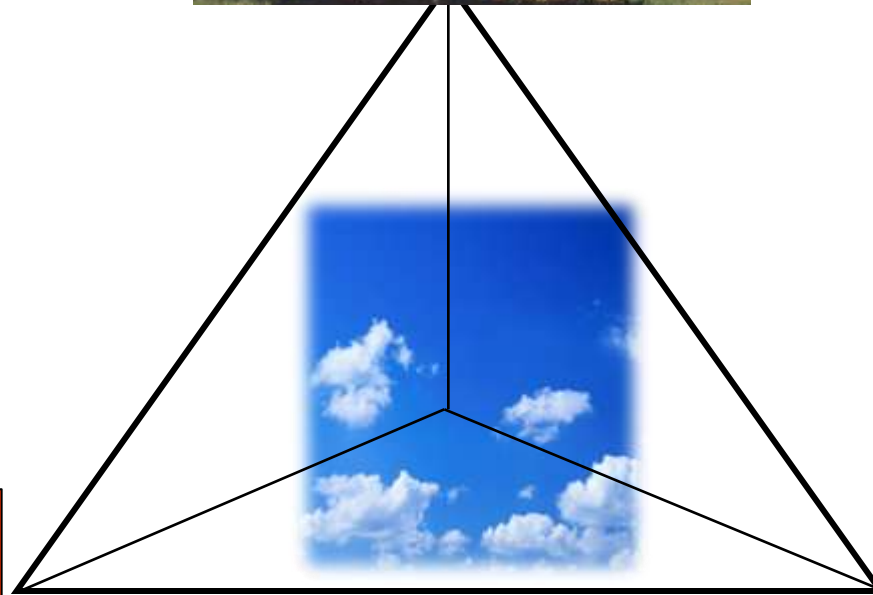
Población X Desarrollo del fruto



Fuente: Renato Bassanezi

Tiempo

El tetraedro de la enfermedad



Ordem Acari

Família Tenuipalpidae

Genero *Brevipalpus*

Complexo de espécies crípticas: *B. phoenicis*, *B. californicus*, *B. obovatus*

Centenas de hospederas

928 sp., 513 gen., 139 fam.

B. phoenicis

Cosmopolita



Fonte: <http://www.cabi.org>

Haploide

Partenogénese telítoca

(Candidatus *Cardinium*)



Brevipalpus phoenicis

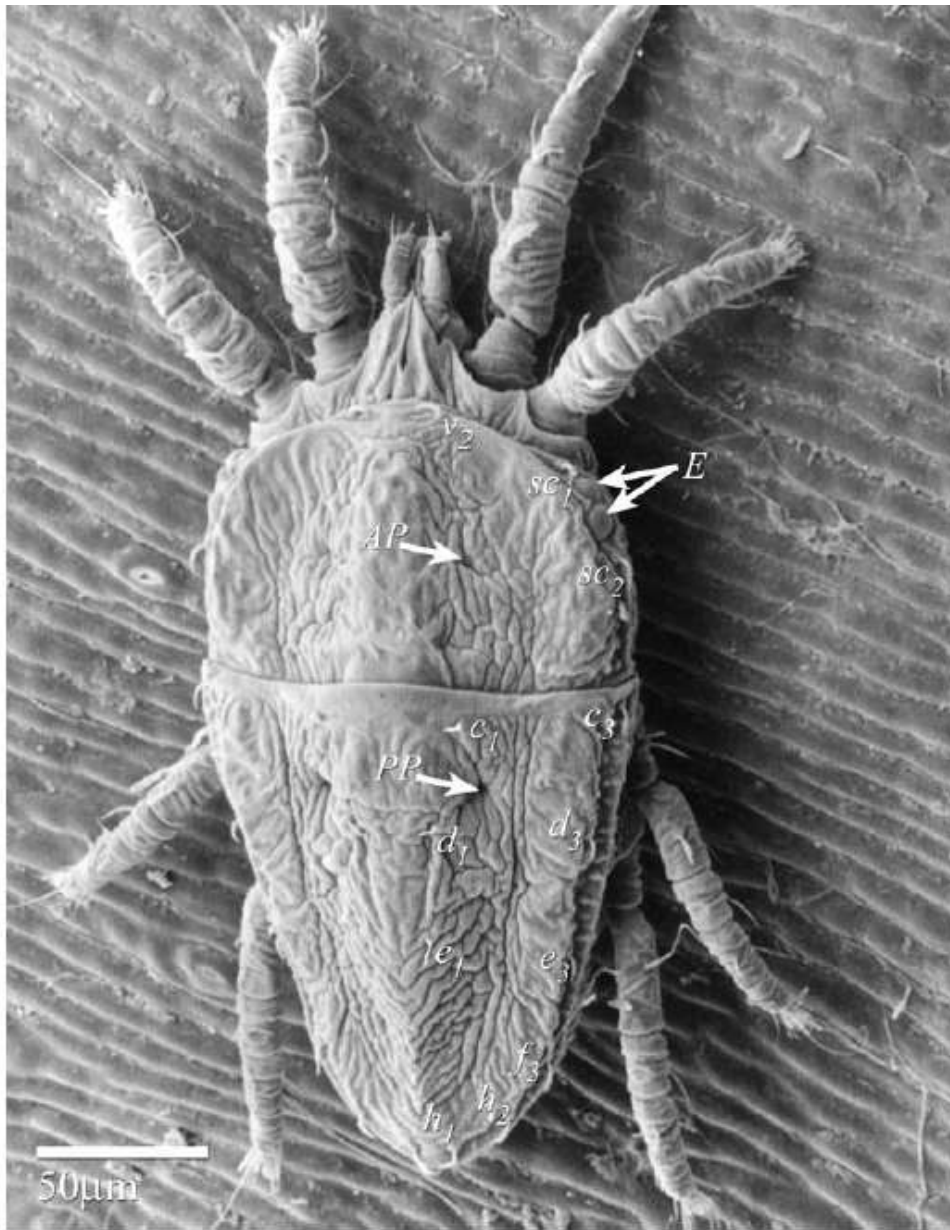


Figure 1. Dorsal view of *B. phoenicis*. Eyes: E; prodorsal pore: AP; opisthosomal pore: PP; prodorsal setae: v_2 , sc_1 and sc_2 ; dorsal opisthosomal setae: c_1 , c_3 , d_1 , d_3 , e_1 , e_3 , f_3 , h_1 , h_2 .

Welbourn *et al.*, 2003

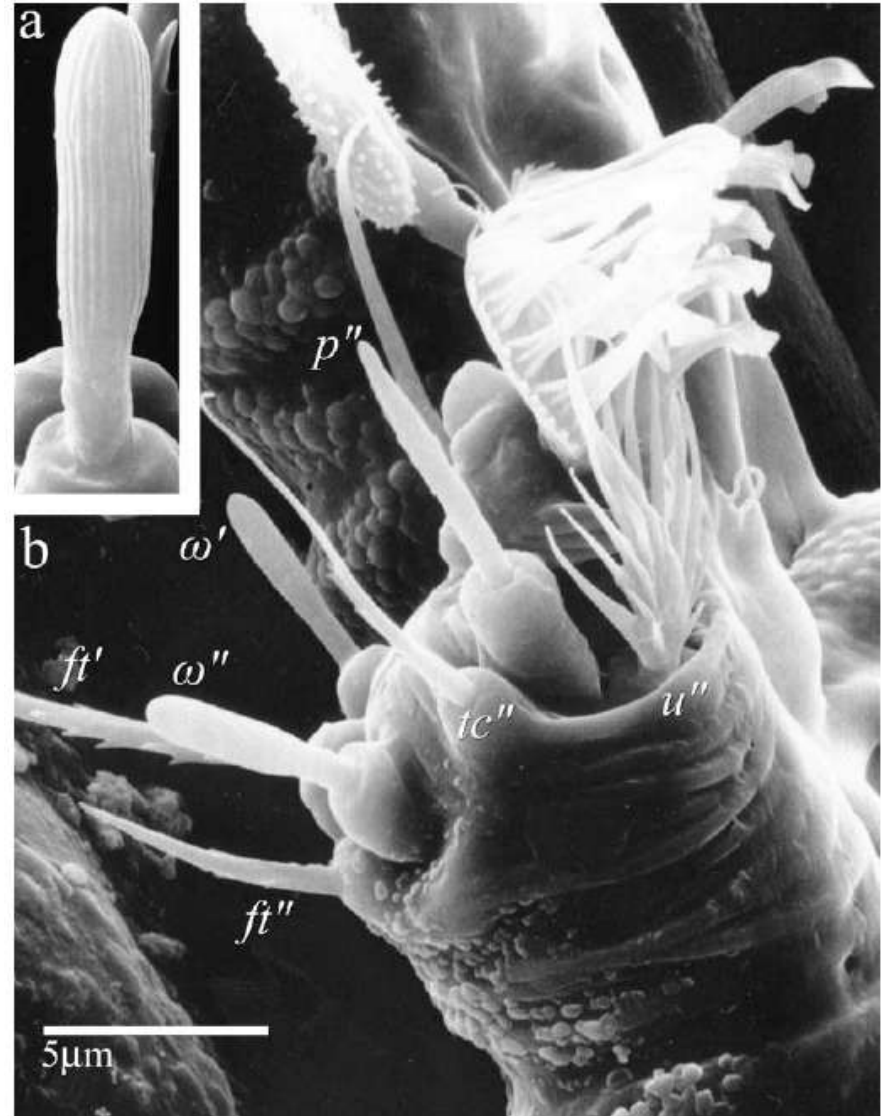
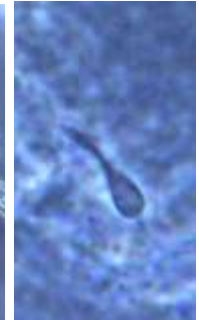
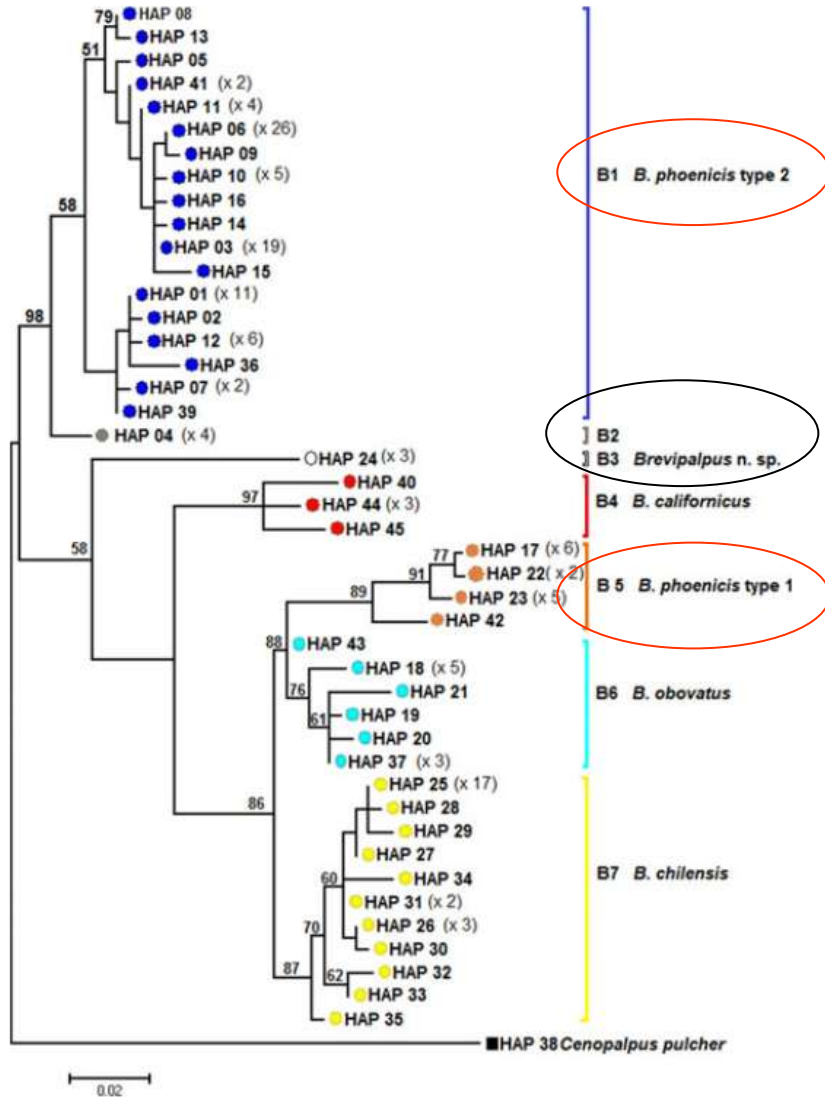


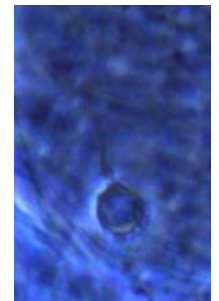
Figure 9. Tarsus II of *B. phoenicis*. (a) Closeup view of *omega* (ω). (b) Lateral view of the tarsus of leg II. Leg setae – prorsals: p'' ; tectals: tc'' ; festigials: ft' ; solenidion: ω' ; unguinals: u'' .

Especies crípticas

Filogenia utilizando secuencias del gen *citocromo oxidasa I* (COI)



Tipo 2
Grupo B



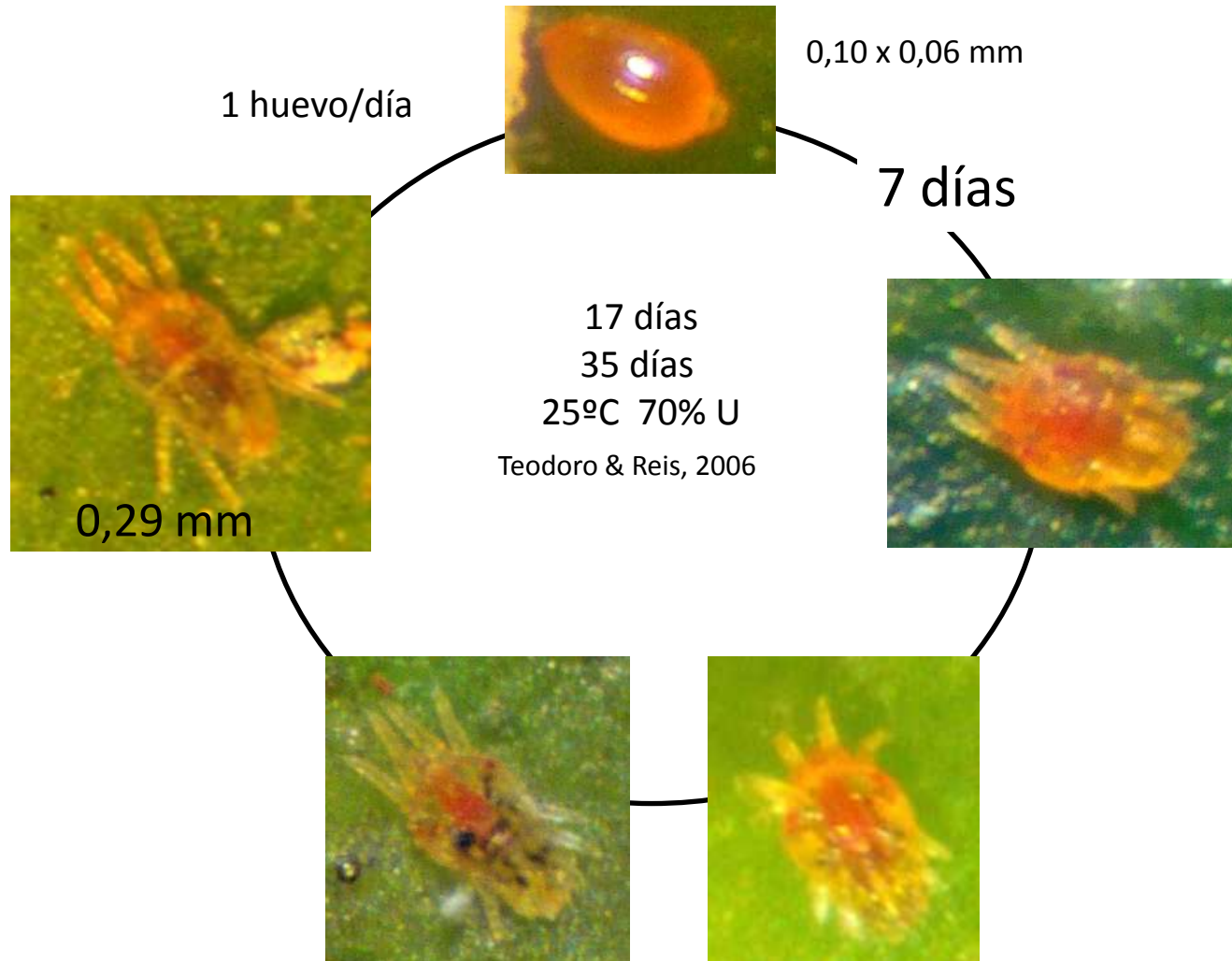
Tipo 1
Grupo C

<http://idtools.org/id/mites/flatmites/index.php>
Beard *et al.*, 2012

Ciclo Biológico

Depende de factores abióticos y bióticos

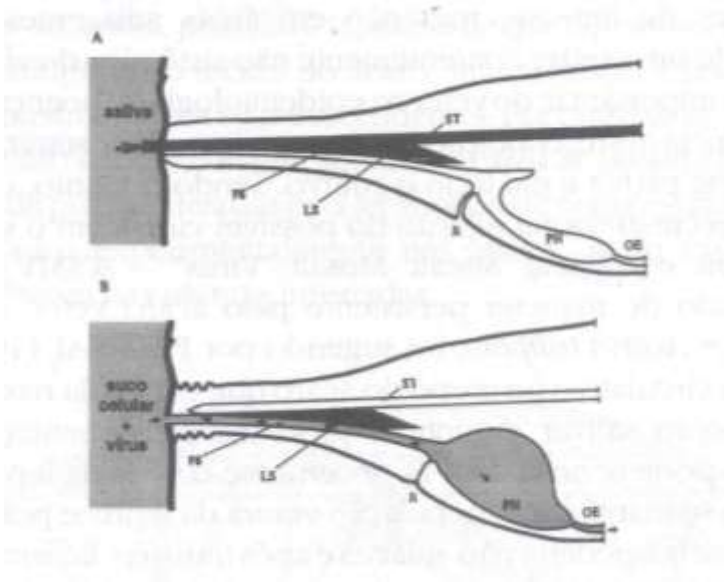
B. phoenicis
false spider mite
*ácaro de la Leprosis



*Transmisión de CiLV-C por todas las fases activas



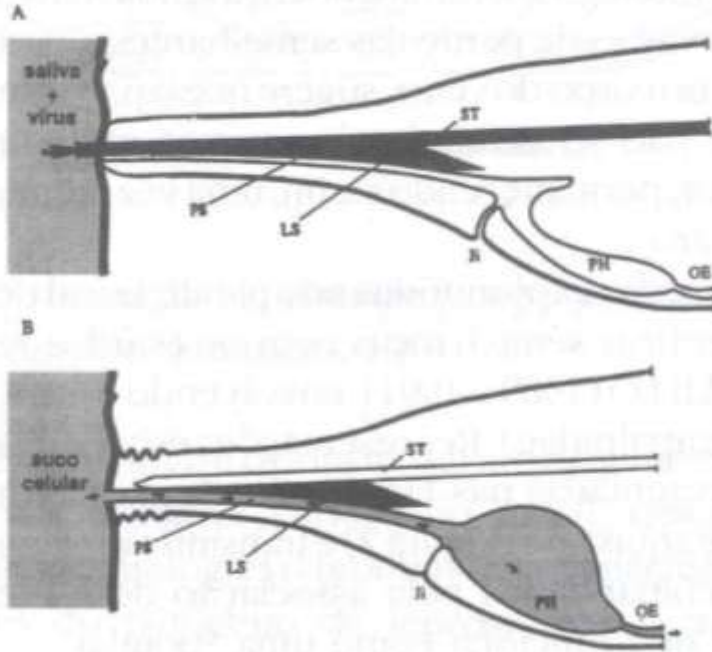
Adquisición del virus



Tiempo de adquisición (horas)	Hojas Sintomáticas/total	% de folhas sintomáticas
1	0/30	0
4	1/30	3,3
24	6/30	20,0
48	6/30	20,0

- A. Inyección de saliva en el tejido vegetal;
- B. Ingestión de contenido celular y virus

Inoculación del virus



Tiempo de adquisición (horas)	Hojas sintomáticas/total	% de folhas sintomáticas
0,08	0/30	0
0,25	0/30	0
0,5	0/30	0
0,75	0/30	0
1	2/30	6,6
4	4/30	13,3
24	8/30	26,6
48	11/30	36,6

- A. Inyección de saliva y virus en tejido vegetal;
- B. Ingestión del contenido celular

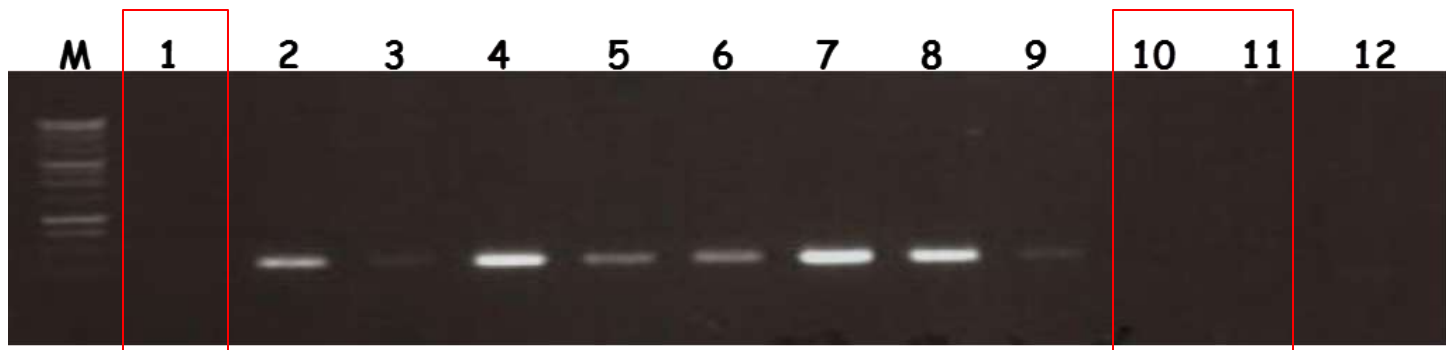
(Adaptado de Nuzzaci & Lilli, 1989; Rodrigues, 1995)

Biología de la interacción CiLV-C-*Bp*

Transmisión transovárica?

Si para *B. obovatus* y *B. californicus* en Florida (Knorr, 1968)

No para *B. phoenicis* (Boaretto *et al.*, 1993; Novelli *et al.*, 2005)



M = Marcador 1 Kb; 1, 10 e 11= ovos; 2, 4, 7, 9 = adultos; 3, 5, 8 = larvas; 6 = ninfas; 12 = ácaros avirulíferos



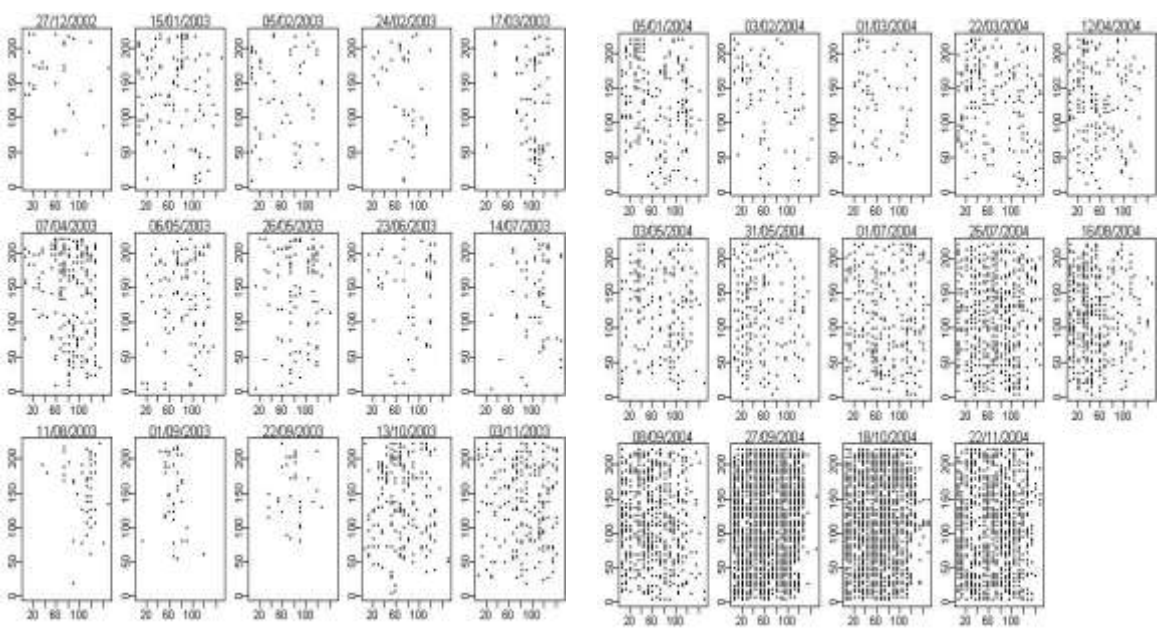
Tipo de interacción CiLV-C-Bp

Tipo de transmisión	Tiempo de adquisición	Tiempo de retención	Persistencia transestadial	Periodo de latencia	Multiplicación en el vector	Transmisión transovárica
no persistente	segundos a minutos	Minutos	no	no	no	no
semi persistente	minutos a horas	horas	no	no	no	no
persistente circulativa	horas a días	días a semanas	si	horas a días	no	no
persistente circulativa	horas a días	semanas a meses	si	semanas	si	frecuente

Adaptado de Hull (2002)

Dinámica espacial del ácaro y de plantas con síntomas de Leprosis en campos sin controle del ácaro vector

Plantas con ácaros

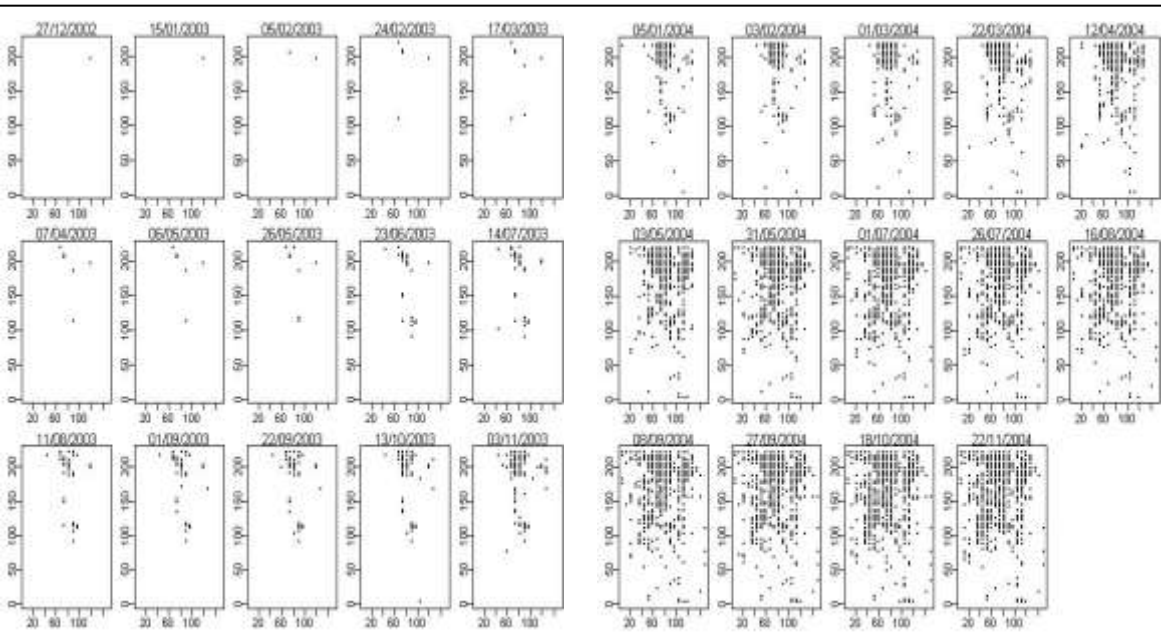


- La agregación entre las plantas con síntomas \geq que la agregación entre las plantas infestadas con ácaros

Plantas con síntomas

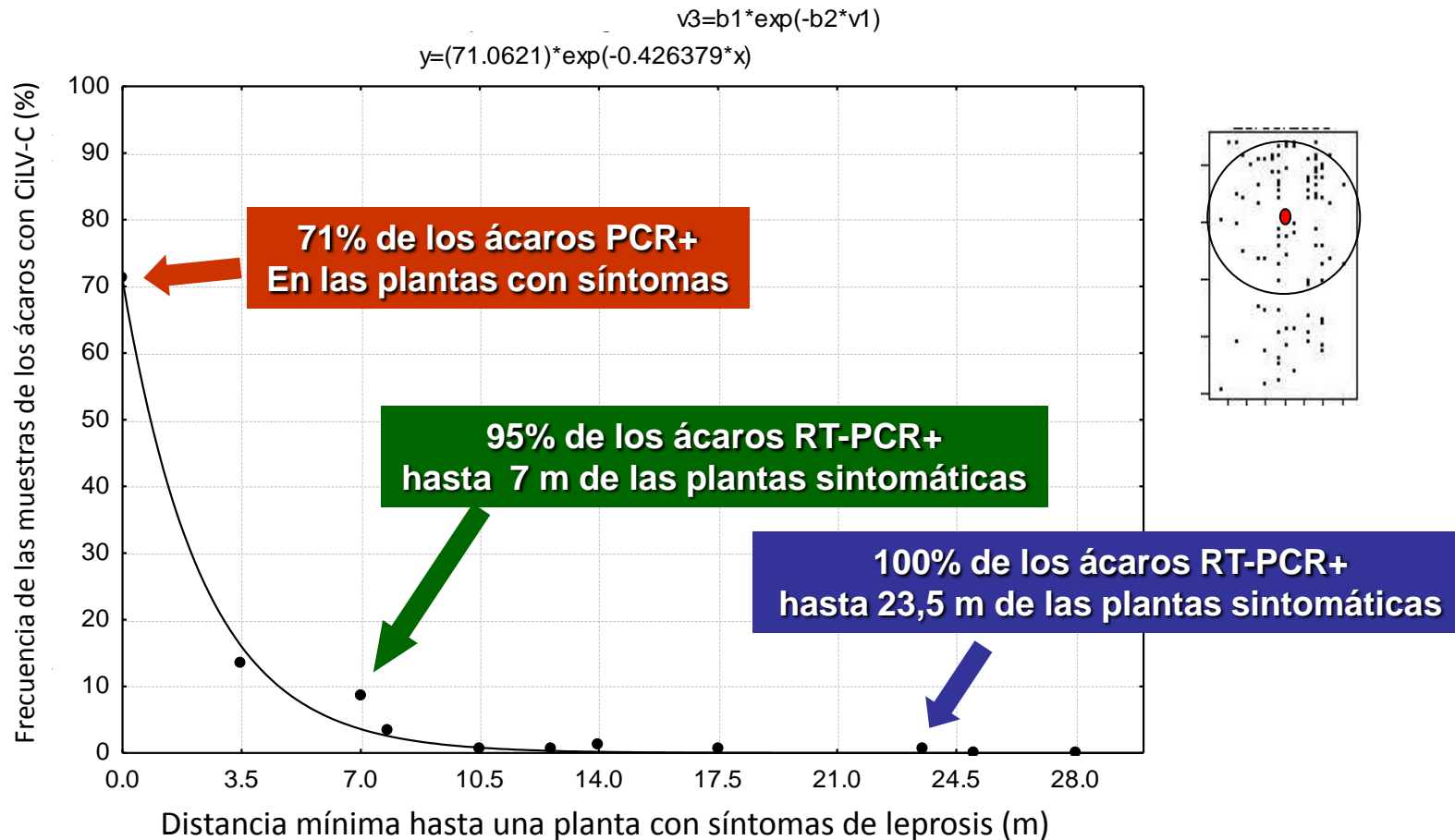
Ciclo 2003

Ciclo 2004



- Ausencia de relación entre la presencia del ácaro y la presencia de los síntomas

Frecuencia de ácaros positivos para CiLV-C (RT-PCR) en función de la distancia mínima hasta una planta con síntomas de Leprosis



Manejo de la Leprosis en Brasil



Variedades resistentes

220 accesos
Banco Activo de Germoplasma (EECB y CCSM)
Naranjas dulces: todas susceptibles
común, navel, baja acidez, sanguíneas



Programa de mejoramiento de cítricos
300 híbridos (seis repeticiones)
10 potenciales



Prevención de ácaros

1. Cortina rompe vientos

Disminuye la dispersión de los ácaros



2. Cercas vivas

Evita la dispersión por personas o animales
(*Syzygium cumini*)



3. Plántulas sanas

Evita la contaminación de nuevas plantaciones



Colecta



1. Limpieza del material



2. Colecta escalonada



3. Retirada de todos los frutos





Fotos: Fernando Pataro

Poda

disminución del inóculo



Eliminar plantas hospederas de ácaros y virus

Disminución del inóculo



Monitoreo de ácaros

dónde, cómo y cuándo?

Tamaño de la muestra:

En general 1% de la parcela

Nivel de control de 3 -15% dependiendo de la historia

Unidad de muestra:

Frutos>ramas> hojas

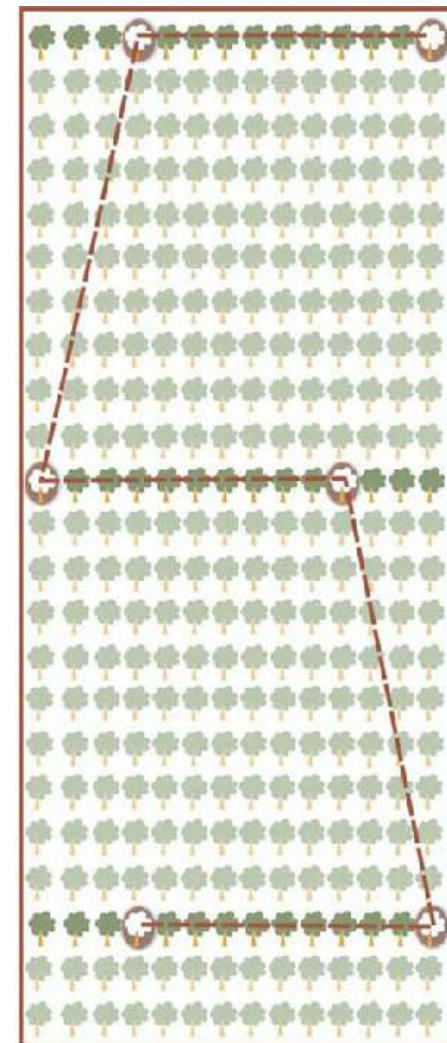
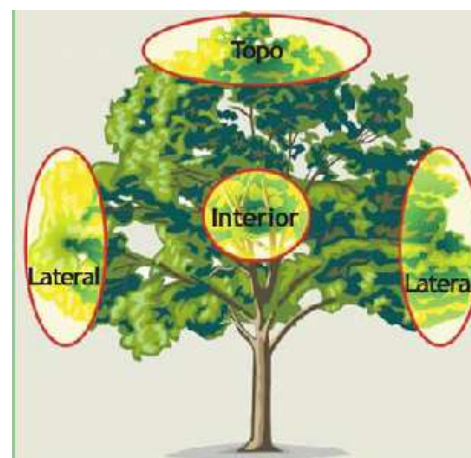
Obs. Sarna de los cítricos

Frecuencia de monitoreo:

De 7 a 15 días

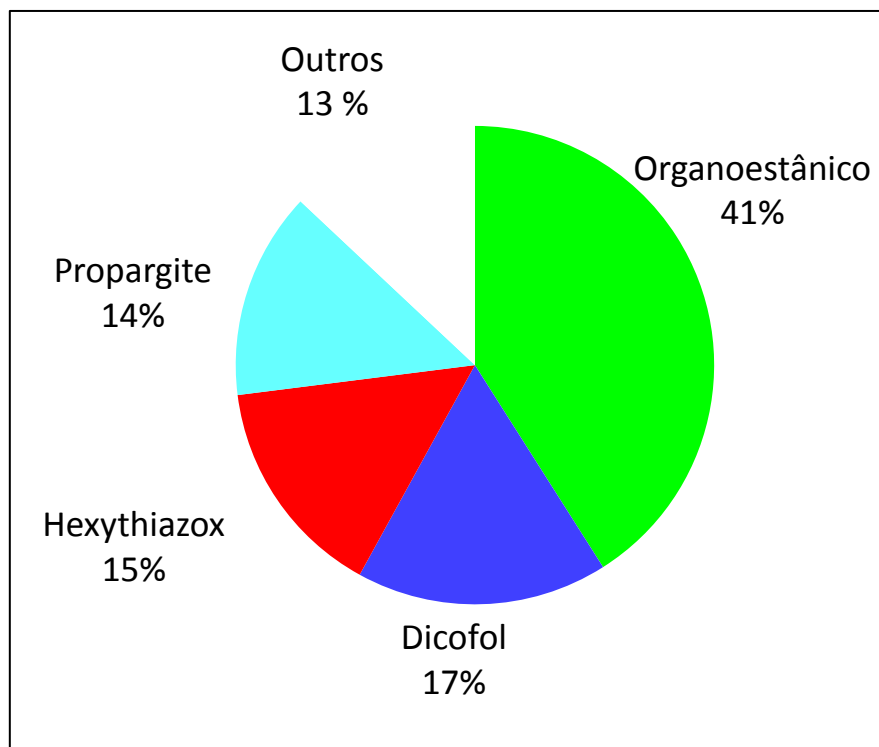
Toma de muestras:

Mayoría tomadas al azar

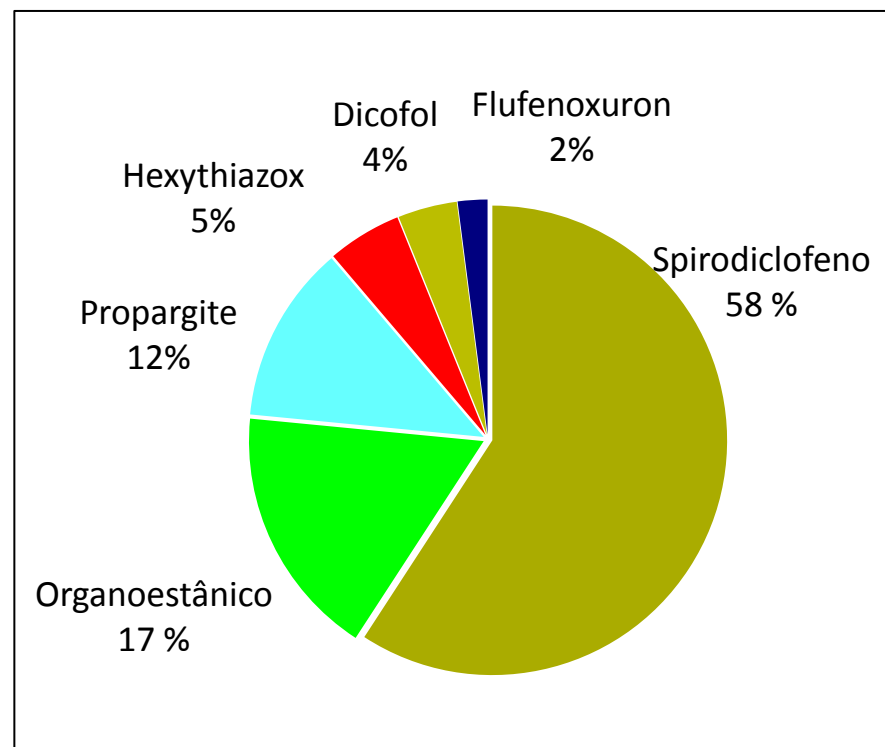


Acaricidas en el cultivo de los cítricos en Brasil

(por principio activo)



1998



2010

Fuente: Celso Omoto

Enemigos naturales de *B. phoenicis* comunes en plantaciones de citrus en Brasil

Phytoseiidae

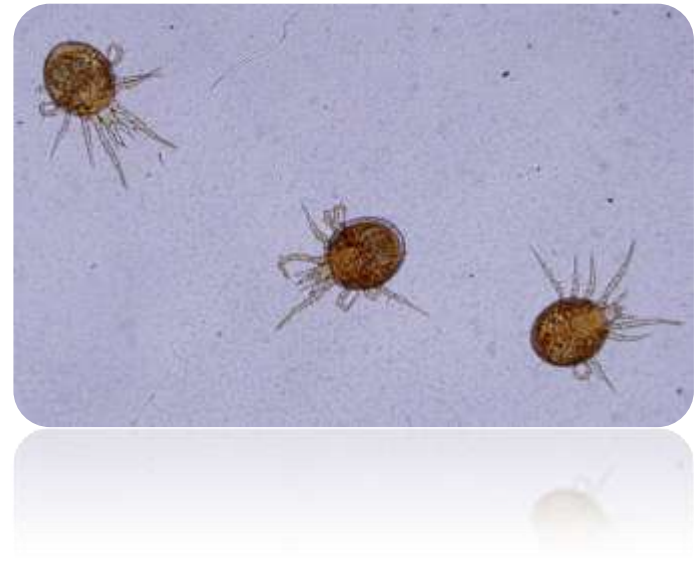
Euseius citrifolius

E. concordis

Iphiseiodes zuluagai


Stigmaeidae

Agistimus brasiliensis



Consideraciones generales

- La Leptospirosis típica es causada por *CiLV-C*, pero hay nuevos patógenos reportados como agentes causales de síntomas similares;
- Existe una tendencia de la expansión de la epidemia hacia el norte del continente americano;
- La principal medida de manejo es la prevención de fuente de inóculo.



Dra. Maria Andréia Nunes
Dra. Juliana Freitas-Astúa
Dra. Marines Bastianel
Dra. Valdenice M. Noveli
Dr. Pedro L. Ramos-Gonzalez
Dr. Marcos A. Machado

Alex Junior Soares
Gabriella Arena
Gabriela Barco
Marcela P. Bergamini
Thamiris Sipriano
Thais Sinico

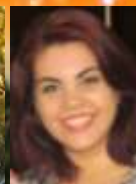


Tabela 1. Relação de acessos avaliados e suas respostas à leprose-dos-citros e à colonização pelo vetor *Brevipalpus phoenicis*.

Nome científico ⁽¹⁾	Seção	Nome vulgar	Nº de plantas sintomáticas/total	Código BAG	Média de notas – infestação por ácaros ⁽²⁾
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Aurantium	Laranja 'Pêra'	6/6	Matriz	1
<i>C. keraji</i> Hort. ex Tanaka	Acrumen	nd ⁽³⁾	3/3	CV461	3
<i>C. clementina</i> Hort. ex Tanaka	Acrumen	Tangerina Clementina	3/3	CV175	3
<i>C. paradisi</i> Macfad.	Cephalocitrus	Pomelo Triumph	3/3	CV318	3
<i>C. deliciosa</i> Tenore	Acrumen	Mexerica do Rio	3/3	CN194	2
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. x <i>C. sinensis</i>	-	Citrange 150-917	2/3	CV386	2
<i>C. lycopersiformis</i> (Lush.) Hort. ex Tanaka	Acrumen	Tangerina Heen Naran	2/3	CV559	2
<i>C. unshiu</i> Marcow.	Acrumen	Tangerina Kara	2/3	CV178	1
<i>C. macrophylla</i> Wester	Limonellus	nd	1/3	RG38/879	1
<i>C. depressa</i> Hayata ⁽⁴⁾	Acrumen	Tangerina pectinifera	3/3	CN383	1
<i>C. temple</i> Hort. ex Yu. Tanaka	Aurantium	Tangor Temple	2/3	CV214	2
<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Limonellus	Lima da Pérsia	0/3	CN318	1
<i>C. hystrix</i> DC.	Papeda	nd	0/3	CV384	2
<i>C. pennivesiculata</i> (Lush.) Tanaka	Limonellus	nd	0/3	RG38/880	1
<i>C. ichangensis</i> Swingle	Osmocitrus	nd	0/3	CV385	3
<i>C. celebica</i> Koord.	Papeda	nd	0/3	CV378	3
<i>C. ujukitsu</i> Tanaka	Aurantium	nd	0/3	CV459	2
<i>C. pseudoparadisi</i> Hort. ex Yu. Tanaka	Cephalocitrus	nd	0/3	CV458	1
<i>C. yatsushiro</i> Hort. ex Tanaka	Acrumen	nd	0/3	CV457	1
<i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka	Acrumen	nd	0/3	CN708	1
<i>C. natsudaiddai</i> Hayata	Aurantium	nd	0/3	CV460	1
<i>C. karna</i> Raf.	Citrophorum	nd	0/3	RG38/877	1
<i>C. natsudaiddai</i> Hayata	Aurantium	nd	0/3	CN704	1
<i>C. taiwanica</i> Tanaka & Y. Shimada	Aurantium	nd	0/3	CV379	1
<i>C. macroptera</i> Montr. x <i>C. grandis</i> (L.) Osb. ⁽⁴⁾	-	nd	0/3	CV375	2
<i>C. kokhai</i> ⁽⁴⁾	-	nd	0/3	CN700	1

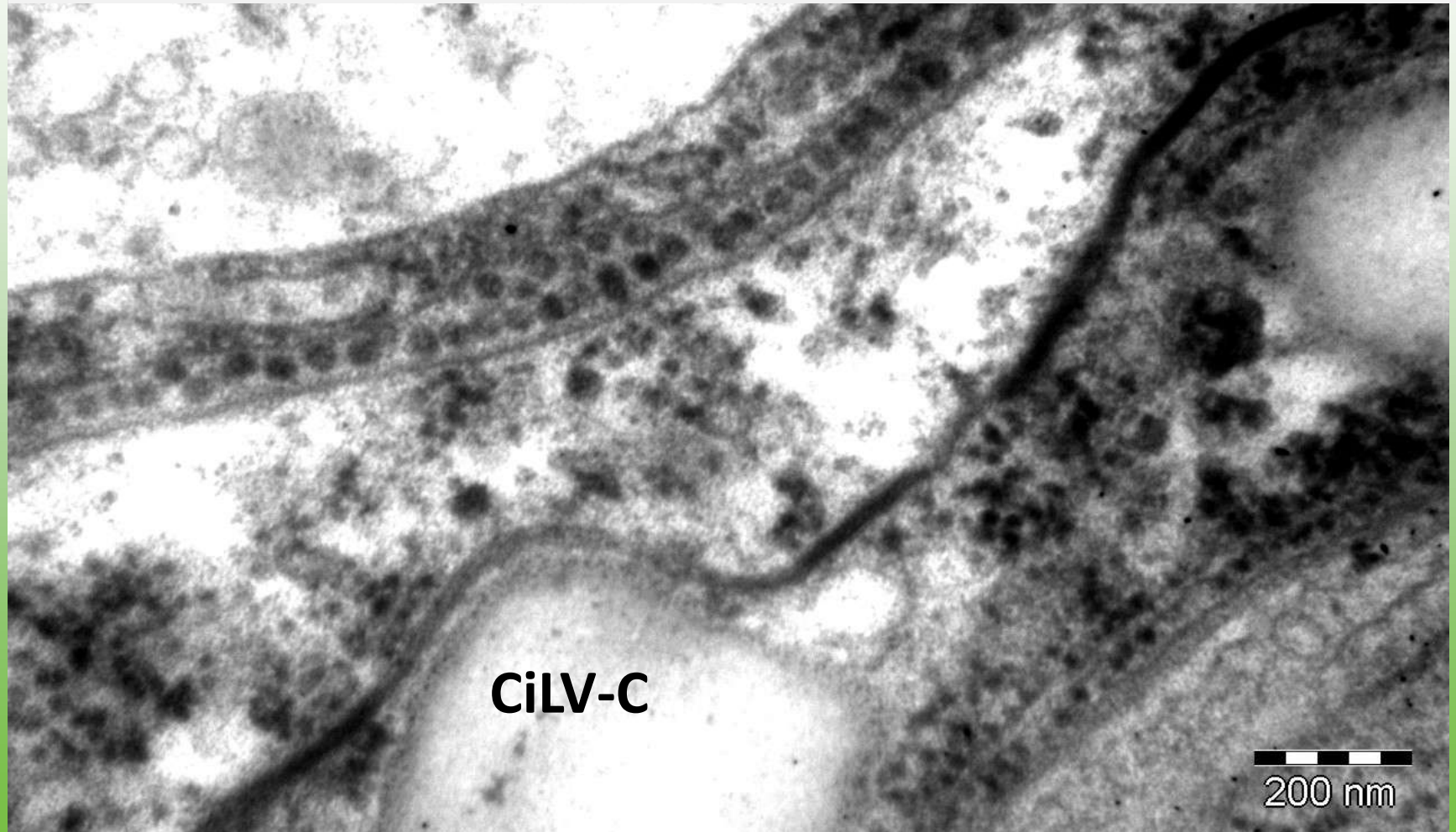
⁽¹⁾Classificação de acordo com Germplasm Resources Information Network – GRIN. ⁽²⁾Escala de notas de 1 a 4. ⁽³⁾Não disponível. ⁽⁴⁾Classificação de acordo com Tanaka (1961), citado por Swingle & Reece (1967).

Análise de centenas de ácaros supostamente virulíferos

Pocas partículas virais

Presumíveis vírions entre membranas de las células adjacentes nas proximidades de la ramificación de lo intestino médio (ceco) y tejido adjacente

Ausencia de viroplasmias



Quantificação de partículas virais no vetor

Ácaros virulíferos mantidos em fonte de inóculo por 48h e transferidos para:

- A) Fonte de inóculo por até 30 dias, com coletas a cada dois dias;
- B) Limão Cravo (hospedeiro do vetor e não do vírus) e coletados a cada dois dias por até 30 dias;

Nota: Amostras em duplicata na placa de RT-qPCR, com três repetições biológicas



Sem diferença estatística entre tratamentos;
sem aumento no número de ácaros

TABELA 4 - Severidade da leprose em plantas de laranja 'Pera', nas interações dos fatores tipo de poda e acaricidas, na safra de 2008-2009. Reginópolis-SP.

Tipos de poda	Acaricidas		
	Sem acaricida	Calda sulf.	Espiro/Cyhe.
Drástica	4,5 a A	3,4 a B	2,0 ab C
Intermediária sem lesões	4,6 a A	3,8 a A	2,0 ab B
Intermediária com lesões	4,6 a A	3,1 a B	2,0 ab C
Leve	4,6 a A	3,7 a A	1,4 b B
Sem poda	4,6 a A	3,6 a A	1,2 b B
Replantio	4,0 a A	3,0 a B	2,3 a B

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Andrade et al., 2013