

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE TANGERINAS A *Alternaria*
alternata E *Elsinoe fawcettii*: RESISTÊNCIA,
SUSCETIBILIDADE E ACÚMULO DE METABÓLITOS**

Marcelo Claro de Souza
Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE TANGERINAS A *Alternaria*
alternata E *Elsinoe fawcettii*: RESISTÊNCIA,
SUSCETIBILIDADE E ACÚMULO DE METABÓLITOS**

Marcelo Claro de Souza

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes
Co-orientador: Dr. Eduardo Sanches Stuchi

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2009

S729r Souza, Marcelo Claro de
Reação de genótipos de tangerinas a *Alternaria alternata* e *Elsinoe fawcettii*: resistência, suscetibilidade e acúmulo de metabólitos / Marcelo Claro de Souza. – – Jaboticabal, 2009
xii, 70 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Antonio de Goes
Banca examinadora: Antonio Baldo Geraldo Martins, Sérgio Florentino Pascholati
Bibliografia

1. Verrugose. 2. Mancha Marrom de Alternaria. 3. Metabólitos I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:634.322

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

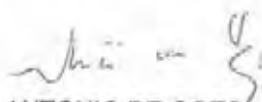
TÍTULO: REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE TANGERINAS A *Alternaria alternata* E *Elsinoe fawcettii*: RESISTÊNCIA, SUSCETIBILIDADE E ACÚMULO DE METABÓLITOS.

AUTOR: MARCELO CLARO DE SOUZA

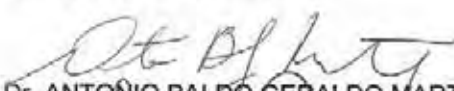
ORIENTADOR: Dr. ANTONIO DE GOES

Co-Orientador(a): Dr. EDUARDO SANCHES STUCHI

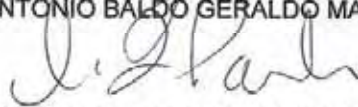
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) pela Comissão Examinadora:



Dr. ANTONIO DE GOES

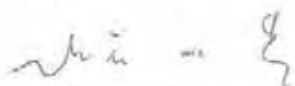


Dr. ANTONIO BALDO GERALDO MARTINS



Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Data da realização: 17 de agosto de 2009.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ANTONIO DE GOES

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCELO CLARO DE SOUZA – Nasceu em Jaboticabal – SP no dia 28 de fevereiro de 1983. Filho de Benedito Claro de Souza e Maria Aparecida Luiz Claro de Souza. Ingressou no curso de Ciências – Habilitação Plena em Biologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá na cidade de Ribeirão Preto – SP em 2003, concluindo-o em janeiro de 2007. Durante a graduação desenvolveu projetos nas áreas de controle biológico e ecologia de plantas daninhas. Ingressou no Programa de Pós-graduação em agosto de 2007 no curso de mestrado em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP campus de Jaboticabal, concluindo-o em agosto de 2009. Possui experiência em fitopatologia, controle biológico, ecologia e alelopatia.

‘Em momentos de crise, só a imaginação é mais importante do que o conhecimento’.
(Albert Einstein)

Aos meus pais, Benedito Claro de Souza e Maria Aparecida Luis Claro de Souza, e meus irmãos, Marina Claro de Souza e Mateus Claro de Souza, por tudo que representam em minha vida, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antonio de Goes, meu ilustre orientador, obrigado por suas inestimáveis contribuições em minha formação (pessoal e profissional), na forma de ensinamentos, companheirismo, dedicação, pela maravilhosa oportunidade de participar de sua equipe de pesquisa e, principalmente, pela confiança em mim depositada.
- Ao Eng. Agro. Dr. Eduardo Sanches Stuchi, agradeço pela co-orientação, pela disponibilização da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB) para a condução dos experimentos, pelos agradáveis momentos de conversa, pelo companheirismo e valiosos ensinamentos.
- Ao Prof. Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves, agradeço por ter aberto as portas do Laboratório de Biologia e Manejo de Plantas Daninhas da FACHV-UNESP para a execução de parte dos experimentos e acima de tudo pela atenção, orientação e companheirismo.
- Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, docente da FCFRP-USP, agradeço pela paciência, amizade e inestimáveis orientações em fitoquímica.
- Agradeço a CAPES pela bolsa de estudo.
- Aos meus amigos, Alan, Bruna, Elton, Fernanda, Gustavo (Guru), Luis, Mateus, Roberta e demais funcionários da FCAV-UNESP e EECB, agradeço de coração por terem contribuído com a execução dos experimentos.

- Aos graduandos e pós-graduandos dos laboratórios de Fitopatologia e Biologia e Manejo de Plantas Daninhas da FCAV-UNESP, muito obrigado por suas amizades, pois através delas esta jornada se tornou muito mais valiosa e gratificante.
- A banca examinadora do exame de qualificação e a banca da defesa de mestrado agradeço acima de tudo pelas valiosas sugestões no trabalho apresentado.
- Aos funcionários da seção de Pós-graduação pelas informações e esclarecimentos.
- As demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	2
2.1. Citricultura.....	2
2.2. Aspectos gerais sobre as tangerinas e híbridos.....	3
2.3. Mancha Marrom de <i>Alternaria</i>	8
2.4. Verrugose dos citros.....	10
2.5. Melhoramento genético de cítricos.....	11
CAPÍTULO 2 - Reação de cultivares de citros a <i>Alternaria alternata</i>	13
RESUMO.....	13
1. Introdução.....	14
2. Material e métodos.....	16
2.1. Seleção dos materiais testados.....	16
2.2. Isolamento e produção de inóculo de <i>Alternaria alternata</i>	16
2.3. Inoculação e avaliação de severidade de doença em frutos.....	18
2.4. Inoculação e avaliação de severidade de doença em folhas destacadas.....	19
2.5. Avaliação de infecção natural por <i>Alternaria alternata</i> em folhas maduras e frutos.....	19
3. Resultados e discussão.....	20
CAPÍTULO 3 - Alteração na composição dos metabólitos em folhas maduras de tangerinas a <i>Alternaria alternata</i>	25
RESUMO.....	25
1. Introdução.....	26
2. Material e métodos.....	28
2.1. Área experimental material vegetal.....	28

2.2. Produção de inóculo de <i>Alternaria alternata</i>	29
2.3. Detecção da atividade antifúngica dos extratos.....	30
2.3.1. Avaliação de compostos antifúngicos pré-formados.....	30
2.3.2. Avaliação de compostos antifúngicos pós-formados	31
2.3.3. Influência dos extratos hexânicos sobre o crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	32
2.3.4. Controle positivo e negativo de inibição de crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	32
3. Resultados.....	33
3.1. Avaliação de metabólitos pré-formados.....	33
3.2. Avaliação de metabólitos pós-formados.....	34
3.3. Influência dos extratos hexânicos sobre o crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	35
3.4. Controle positivo e negativo de inibição de crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	36
4. Discussão.....	36
CAPÍTULO 4 - Reação de tangerinas e híbridos a <i>Elsinoe fawcettii</i> sob condições de infecção natural.....	40
RESUMO.....	40
1. Introdução.....	41
2. Materiais e Métodos.....	43
2.1. Acessos/genótipos avaliados.....	43
2.2. Avaliações de resistência e suscetibilidade.....	43
3. Resultados e Discussão.....	44
REFERÊNCIAS.....	49

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE TANGERINAS A *Alternaria alternata* E *Elsinoe fawcettii*: RESISTÊNCIA, SUSCETIBILIDADE E ACÚMULO DE METABÓLITOS

RESUMO – Este trabalho teve por objetivos: (i) selecionar genótipos de tangerinas resistentes a infecção por *Alternaria alternata*, e estabelecer relações entre níveis de severidade da doença entre folhas e frutos, (ii) avaliar a contribuição de metabólitos na resistência de folhas maduras de tangerinas a *A. alternata*, (iii) selecionar genótipos de tangerina resistentes a infecção por *Elsinoe fawcettii*. Para tais experimentos foram utilizados 22 genótipos de tangerina pertencentes ao banco de germoplasma da Estação experimental de Citricultura de Bebedouro, Bebedouro-SP. (i) Dentre os materiais genéticos resistentes, foram constatados quatro genótipos de clementinas (*Citrus clementina*), seis mandarinas, sendo duas pertencentes a *C. reticulata*, duas a *C. tangerina*, uma a *C. deliciosa* e uma a *C. nobilis*; um tangelo (*C. tangerina* x *C. paradisi*); dois híbridos de mandarinas, sendo um resultante do cruzamento entre *C. nobilis* x *C. deliciosa*, e o outro de *C. clementina* x *C. reticulata*; um híbrido de tangor (*C. clementina* x *C. sinensis*) e dois híbridos de satsumas (*C. unshiu* x *C. deliciosa*). Também foi constatado indícios de relação entre severidade de doença em folhas jovens destacadas e incidência natural de doença em frutos. (ii) Ao final dos experimentos, não foi observado influência desses metabólitos na defesa das folhas maduras de tangerina a MMA. (iii) Dentre os genótipos avaliados, foram observados 10 materiais genéticos resistentes a verrugose. Dentre estes materiais, observou-se que os genótipos Commune, Caffin, Bruno, Burgess, Peau Lisse, Zanzibar, Beuty of Glen Retreat, Rode King e Encore também se apresentaram resistentes a MMA. Estes materiais são promissores para o cultivo de tangerinas em áreas de ocorrência destas doenças, e poderão contribuir com futuros trabalhos de melhoramento genético para resistência a MMA e verrugose.

Palavras chave: Verrugose, Mancha Marrom de *Alternaria*, metabólitos

REACTION OF TANGERINE GENOTYPES TO *Alternaria alternata* AND *Elsinoe fawcettii*: RESISTANCE, SUSCEPTIBILITY AND METABOLITES ACCUMULATION

SUMMARY – The aims of this work were: (i) select tangerine genotypes resistant to *Alternaria alternata* infection and classify relative degrees of disease severity among leaves and fruits, in order to ultimately control the pathogen; (ii) evaluate metabolites contribution on mature leaves of tangerines to *A. alternata*; (iii) select tangerine genotypes resistant to *Elsinoe fawcettii*. For such experiments 22 tangerines genotypes from germoplasm bank at Estação experimental de Citricultura de Bebedouro, Bebedouro-SP were used. (i) Among the resistant genetic materials, four clementines genotypes (*Citrus clementina*), six mandarines, being two of *C. reticulata*, two *C. tangerina*, one *C. deliciosa* and one *C. nobilis*; one tangelo (*C. tangerina* x *C. paradisi*); two mandarines hybrids, being one resulted between *C. nobilis* x *C. deliciosa* crossing, and other at *C. clementina* x *C. reticulata*; one tangor hybrid (*C. clementina* x *C. sinensis*) and two satsumas hybrids (*C. unshiu* x *C. deliciosa*) were found. A consistent relationship was noted among level of susceptibility in leaves (as evaluated following either natural infection or artificial inoculation), severity and susceptibility of fruit, suggesting a new methodology for diagnosis, identification and selection of *Citrus* spp. varieties resistant to *A. alternata*. (ii) At the end of experiments, it was not found any relationship between the presence of these metabolites and resistance to MMA on tangerines mature leaves. (iii) Among the genotypes evaluated, 10 genetic materials resistant to scab were observed. Finally, Commune, Caffin, Bruno, Burgess, Peau Lisse, Zanzibar, Beuty of Glen Retreat, Rode King and Encore cultivars, being resistant to *A. alternata* and also to *E. fawcettii*, exhibited good agronomic characteristics and, consequently, show a promising economic exploration.

Key-words: Citrus scab, *Alternaria* Brown Spot, metabolites

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

O histórico da citricultura evidencia a necessidade de se buscar novas variedades. A diversidade genética dos citros é grande, porém a base genética das espécies economicamente importantes é estreita. Devido ao grande número de espécies sexualmente compatíveis (CAMERON & FROST, 1968), cruzamentos controlados em citros vêm sendo realizados desde o século XIX, obtendo-se vários híbridos com variabilidade genética para diversas características de importância agrônoma (MOREIRA & PIO, 1991). A descontinuidade nos programas de melhoramento e fatores biológicos, como a longa juvenilidade, autoincompatibilidade e incompatibilidade entre algumas espécies, alta heterozigosidade, esterilidade, depressão por endogamia, apomixia e poliploidia têm sido as principais limitações para a obtenção de novas variedades de citros (GROSSER & GMITTER JUNIOR, 1990; SOARES FILHO et al., 2008).

O setor citrícola brasileiro gera aproximadamente 500.000 empregos diretos e indiretos somente no Estado de São Paulo (PASSOS & SANTANA, 2004). Além de sua importância econômica e social para o País, este setor ressenete-se de vários problemas de natureza fitossanitária, onde se insere a Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA) e a Verrugose dos citros. O controle desses patógenos alicerça-se no emprego de fungicidas, cujos resultados nem sempre atingem os níveis de controle desejáveis, tanto do ponto de vista técnico, como econômico e ecológico. Em razão das várias doenças que acometem a citricultura, a busca por novas variedades é o objetivo dos inúmeros programas de melhoramento genético em todo o mundo (CHAGAS et al., 2007). Dessa forma, o emprego de variedades resistentes aos patógenos desponta como um dos marcos mais significativos em termos de avanços tecnológicos na agricultura, onde a utilização de variedades resistentes é o método de controle preferido por ser o mais barato e de mais fácil utilização (CAMARGO & BERGAMIN FILHO, 1995).

2. Revisão de literatura

2.1. Citricultura

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas e de suco concentrado congelado possuindo uma área agrícola de aproximadamente de 890 mil hectares destinados ao plantio de laranjas e tangerinas. A produção nacional de laranja foi de aproximadamente 411 milhões de caixas e a produção de tangerinas foi de 141 mil caixas na safra 2007/2008 (AGRIANUAL, 2009).

Estado de São Paulo é o maior produtor nacional de laranjas, sendo responsável por 85 % da produção nacional (AGRIANUAL, 2009) e as principais variedades utilizadas ainda são Pêra (47%), Natal (26%), Valência (14%) e Hamlin (5%) (AMARO & MAIA, 1997). A distribuição de variedades de citros conhecidas no mundo reflete proporção de 39% de laranjas doces, 21% tangerinas, 15% de limões, 5% de laranja Azeda, 10% de pomelos e toranjas e 10% de outras espécies e híbridos (HODGSON, 1967).

As tangerinas ocupam o segundo lugar em importância, porém estão longe de atingir os 20% da produção total de citros, a qual corresponde à tendência de consumo internacional desta fruta. O número de variedades utilizadas economicamente no Brasil é bastante restrito, apesar de existirem fontes de variabilidade para este tipo de citros disponíveis em Bancos de Germoplasma do país, que ainda são pouco exploradas (DOMINGUES et al., 1999).

No grupo das tangerineiras, a 'Ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco) tem grande importância comercial e representa 59% das variedades cultivadas no Estado de São Paulo, seguido pelo tangor 'Murcott' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata* Blanco). As demais, Mexerica-do-Rio (*C. deliciosa* Tenore) e principalmente a tangerina Cravo (*Citrus reticulata* Blanco) apresentam poucos plantios (Pio et al., 2005). No Brasil, a produção de tangerina alcança expressão econômica em muitos estados brasileiros, principalmente em São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, os quais são os maiores produtores nacionais, sendo responsáveis por 44, 22 e 14 % da produção nacional, respectivamente (AGRIANUAL, 2009).

No caso das tangerinas, em 2006 a produção brasileira foi de 1.270.108 toneladas em uma área de 63 mil hectares, produzidos principalmente na região sudeste, seguida pela região sul do país (AGRIANUAL, 2009). No Estado de São Paulo, a área plantada de tangerina e seus híbridos aproxima-se de 22 mil hectares, correspondente a uma produção de 560 mil toneladas, seguido dos Estados do Paraná com 280 mil e do Rio Grande do Sul com cerca de 173 mil toneladas. Embora a produção brasileira de tangerinas tenha aumentado significativamente, cerca de 70% nos últimos seis anos, ela ainda é muito pequena quando comparada à produção da China e Espanha (AGRIANUAL, 2009).

Em 2007, exportou-se 6.128 toneladas de tangerinas, sendo os principais compradores Canadá, Indonésia, Rússia e Arábia Saudita (AGRIANUAL, 2009).

2.2. Aspectos gerais sobre as tangerinas e híbridos

O gênero *Citrus* spp. pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribos Citreae, subtribo Citrinae, com mais 12 gêneros (SWINGLE, 1943; SWINGLE & REECE, 1967), os quais têm seus prováveis centros de origem na Ásia.

Membros típicos dessa família apresentam glândulas de óleo, ovário apoiado sobre disco floral, manchas transparentes nas folhas e frutos com placentação axial. Poucas espécies são decíduas. Geralmente possuem flores brancas, frutos globosos, com epicarpo de coloração verde, amarela ou laranja (SWINGLE & REECE, 1967).

Espécies do gênero *Citrus* e outras correlacionadas manifestam compatibilidade genética, produzindo híbridos que, muitas vezes, foram caracterizados como espécies puras (SWINGLE & REECE, 1967). Não há separação clara, portanto, entre espécies. Exemplo típico dessa compatibilidade são os híbridos de *Citrus* com *Poncirus trifoliata*. O fato dos citros e os gêneros relacionados, como *Poncirus* e *Fortunella*, se hibridizarem com certa facilidade tem criado um grupo de plantas interessantes para o melhoramento, porém, até o momento, nenhuma linhagem endogâmica foi ainda desenvolvida (ROOSE et al., 1998).

As espécies do gênero *Citrus* reproduzem-se sexuadamente, por meio de autopolinização e polinização cruzada, e assexuadamente, por apomixia nucelar. As plantas de citros podem se autopolinizar, em face da concomitância da deiscência das anteras e receptividade do estigma em suas flores hermafroditas. Algumas variedades são, inclusive, cleistogâmicas, ou seja, promovem o autocruzamento antes mesmo da abertura de suas flores (CAMERON & SOOST, 1969).

As tangerinas e seus híbridos constituem um grupo bastante diversificado, acreditando-se que assim como os demais citros, tenham surgido no nordeste da Índia ou no sudeste da China (SAUNT, 2000), sendo chamadas de 'mandarinas', em muitas regiões. As muitas variedades cultivadas podem ser reunidas em quatro grupos, segundo os caracteres dos frutos:

- a) Frutos doces, de casca solta e de coloração laranja forte: Cravo, Dancy, Beauty, Flórida, Clementina, Ponkan, Satsuma, etc.
- b) Frutos doces, de casca solta e de coloração laranja amarela: Mexerica-do-Rio, Ipanema, Oneco, Imperador, Willowleaf, etc.
- c) Frutos doces, de casca aderente, geralmente híbridos (tangerina x laranja): Sabará, Tangerona, King, Temple, Kara, Kinnow, etc.
- d) Frutos ácidos, casca solta e de coloração laranja forte: limão Cravo, Vinagre, Bravo e Calamondin (MOREIRA & RODRIGUES FILHO, 1967; DONADIO et al., 1998; FIGUEIREDO, 1991).

O grupo das tangerinas, em geral, apresenta grande adaptabilidade e cresce em condições desérticas, semitropicais e subtropicais do Mediterrâneo (SAUNT, 2000) e também em outras regiões espalhadas pelo mundo. De maneira geral, apresenta um curto período de maturação e é muito suscetível às injúrias decorrentes do manuseio na colheita, pós-colheita e transporte.

A 'Ponkan' é originária da Ásia (HODGSON, 1967), e constitui um dos grupos de tangerinas mais cultivados no mundo – China, Japão, Filipinas (Batangas) e Índia (Nagpur Suntara) – e também é o mais popular no Brasil (SAUNT, 2000; PIO et al., 2005). São árvores de porte médio, com crescimento ereto, produtivas, mas com

tendência a apresentar alternância de produção. Frutos grandes, maturação precoce a meia estação (POMPEU JUNIOR, 2001), casca solta e sabor bastante doce, o que as torna muito apreciadas para consumo *in natura* (PIO et al., 2006).

O grande objetivo de pesquisas para esse grupo está relacionado em selecionar variedades que apresentam período de maturação fora da safra. Algumas variedades de tangerina como Satsuma, provenientes do Japão, cujos frutos são semelhantes aos da tangerina 'Ponkan', têm o período da maturação iniciando em fevereiro e, apesar de não apresentarem características de sabor muito adequadas ao paladar do brasileiro, entram no mercado quando há escassez desse tipo de citros, conseguindo assim boas vendas e bons preços (PIO et al., 2005).

O tangor 'Murcott' (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* L. Osbeck) é a segunda variedade mais importante cultivada em São Paulo (POMPEU JUNIOR, 2001), superada apenas para a tangerina 'Ponkan', servindo tanto para indústria como para consumo *in natura*. Originado de progenitores desconhecidos, foi obtido por W.T. Swingle, na Flórida, onde, já em 1933, acreditava-se que poderia ter valor comercial e foi propagado por Charles Murcott Smith e J. Ward Smith. Nos Estados Unidos, é chamado de tangerina 'Honey' (SAUNT, 2000).

Entre as variedades selecionadas a partir de 'Murcott', vale ressaltar a 'Murcott J', que apresenta as mesmas características de 'Murcott' tradicional, exceto pelo fato de conter a metade do número de sementes (POMPEU JUNIOR, 2001), e a 'Afourer', que não tem bem clara a sua origem. Acredita-se que surgiu de semente, no Marrocos, de uma planta de 'Murcott' com 35 anos de idade, em Afourer, próximo a Beni Mellal. De acordo com as características do fruto, é provável que a 'Afourer' seja um híbrido de 'Murcott' com 'Clementina' (SAUNT, 2000).

O grupo das mexericas (*C. deliciosa*), é também conhecido como o das tangerinas do Mediterrâneo. Seus parentais e sua origem não são conhecidos, mas há indícios de que a espécie tenha surgido a partir de uma tangerina chinesa (HODGSON, 1967). Entretanto, é possível que ela seja constituída por híbridos verdadeiros da tangerina comum (*C. reticulata*) (MACHADO et al., 1996). Ao longo das décadas passadas, esse grupo foi perdendo importância na Europa, com substituição pelas

clementinas. Este grupo é mundialmente conhecido como 'Willowleaf' mandarin. No Brasil recebeu diversos nomes, como mimosa e bergamota. Entre as variedades cultivadas no Brasil, tem-se a tradicional 'Mexerica-do-Rio' e a 'Montenegrina'.

O mais importante híbrido de tangerina é o tangor 'Murcott'; entretanto há outros igualmente promissores. Segundo Pio (1997) e Pio et al. (2006) as variedades Thomas, Sul-da-África, Szuwinkon, Szuwinkon x Szuwinkon-Tizon e Fremont poderão ampliar o quadro varietal da citricultura paulista.

Apesar de toda a diversidade mencionada, o cultivo de tangerinas vem, ao longo dos anos, baseando-se em um pequeno número de híbridos e variedades. Devido ao pequeno número de variedades plantadas comercialmente e à produção de tangerinas ser de variedades com sementes, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para disponibilizar outras variedades, mais bem aceitas no mercado internacional, e também colocar à disposição do consumidor frutas cítricas em época em que não estão presentes no mercado brasileiro.

O histórico da citricultura brasileira evidencia a necessidade de se buscar novas variedades. A diversidade genética dos citros é grande, porém a base genética das espécies economicamente importantes é estreita. Devido ao grande número de espécies sexualmente compatíveis (CAMERON & FROST, 1968), cruzamentos controlados em citros vêm sendo realizados desde o século XIX, obtendo-se vários híbridos com variabilidade genética para diversas características de importância agrônômica (MOREIRA & PIO, 1991).

A descontinuidade nos programas de melhoramento e fatores biológicos, como a longa juvenilidade, auto-incompatibilidade e incompatibilidade entre algumas espécies, alta heterozigosidade, esterilidade, depressão por endogamia, apomixia e poliploidia têm sido as principais limitações encontradas à obtenção de novas variedades de citros (GROSSER & GMITTER JUNIOR, 1990) como o tangelo Nova (BORGES & PIO, 2003) e a mandarina Fortune (FURR, 1964).

A poliembrionia tem sido uma das maiores limitações ao melhoramento dos citros, pois dificulta o desenvolvimento e a identificação dos híbridos, embora

proporcione a multiplicação de clones nucelares sadios para serem utilizados como porta-enxertos (BALLVE et al., 1991).

Diversas técnicas podem ser utilizadas na identificação de híbridos, desde as baseadas em caracteres morfológicos, até análises da composição de óleos essenciais das folhas (SAKAMOTO et al., 1997), cromatografia líquida de compostos flavonóides (ORTIZ et al., 1981), e análises bioquímicas com sistemas isoenzimáticos (ABDULLAH et al., 1979). De modo que as análises baseadas na morfologia das plantas são as mais simples e de menor custo, sendo eficientes quando os parentais apresentam características distintas (FROST & SOOST, 1968; BALLVE et al., 1991, SOARES FILHO et al., 2007). Porém, o uso de caracteres morfológicos não possibilita a identificação precisa de híbridos, quando as espécies parentais são semelhantes fenotipicamente. Assim, os marcadores moleculares são considerados excelentes ferramentas para avaliação da diversidade genética em muitas espécies de plantas (Garcia et al., 1998).

No melhoramento de espécies perenes de longo ciclo vegetativo como os citros, essa ferramenta pode direcionar a seleção precoce de híbridos mais próximos ao parental de interesse. Em citros, marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) têm sido utilizados com maior frequência em estudos de diversidade genética (MACHADO et al., 1995; SOARES FILHO et al., 1997; BASTIANEL et al., 1998; NICOLOSI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; ANDRADE et al., 2004). Os marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), por sua vez, são considerados mais eficientes que RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD e SSR (Single Sequence Repeat), pela sua alta reprodutibilidade e elevada taxa multiplex, ou seja, número de marcadores simultaneamente analisados em um mesmo gel, e vêm sendo utilizados para análise de diversidade genética em muitas espécies vegetais (PEJIC et al., 1998). Na citricultura, a utilização de marcadores AFLP e faFLP (Fluorescence Amplified Fragment Length Polymorphism) é recente e apesar destes marcadores mostraram-se mais eficientes do que RAPD, na construção de dendrogramas de similaridade genética em híbridos de citros, poucos

trabalhos foram relatados até o momento utilizando essa categoria de marcadores (SIMONE et al., 1998; GUO et al., 2002; OLIVEIRA, 2003; BASTIANEL et al., 2006).

2.3. Mancha Marrom de *Alternaria*

O primeiro relato da Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA) ocorreu em mandarina “Emperor” na Austrália em 1903, por Cobb, citado por KIELY (1964), e o agente causal foi designado como *Alternaria citri* Ellis & N. Pierce (KIELY, 1964; PEGG, 1966).

A MMA é causada pelo fungo *Alternaria alternata*, cuja ocorrência se dá em várias regiões do mundo (TIMMER et al., 2003).

Em 1974, observou-se a MMA na Flórida, infectando frutos e ramos de tangerina ‘Dancy’ (*Citrus reticulata* Blanco) (WHITESIDE, 1976). Em 1989 foi relatada em Israel (SOLEL, 1991) e sequencialmente encontrada na África do Sul (SCHUTTE et al., 1992), Cuba (HERRERA, 1992), Colômbia (CASTRO-CAICEDO et al., 1994), Turquia (CANIHOS et al., 1997), Espanha (VICENT et al., 2000), Itália (BELLA et al., 2001), Argentina (PERES et al., 2003) e no Peru (MARÍN et al., 2006).

No Brasil, o primeiro relato de MMA ocorreu em plantas de tangerina ‘Dancy’ (*C. reticulata*) em pomares localizados no estado do Rio de Janeiro (GOES et al., 2001). Nos anos subseqüentes, sua presença foi identificada nos estados de São Paulo, Minas gerais e Rio Grande do Sul (SPÓSITO et al., 2003). Esta doença vem se constituindo em fator limitante à produção de tangerinas e, principalmente do tangor ‘Murcott’, devido à sua alta suscetibilidade e condições ambientais favoráveis à ocorrência da doença.

Dois patotipos de *Alternaria alternata* são conhecidos por causarem mancha marrom em folhas e em frutos de certas espécies de citros, cuja distinção tem sido baseada na especificidade da produção de toxina (HST) aos seus hospedeiros (KOHMOTO et al., 1979). Um patotipo é chamado de ACT – toxina ou ACTG – toxina do patotipo tangerina, relatado em Queensland, na Austrália (PEGG, 1966) e na Flórida, nos EUA (WHITESIDE, 1976). O outro patotipo é chamado de ACR – toxina ACRL – toxina do patotipo limão ‘Rugoso’, específico somente para os limoeiros

'Rugoso' (*C. jambhiri*) e 'Cravo' (*C. limonia*), também reportado na Flórida por WHITESIDE (1976). A ACT toxina do patótipo tangerina, além de infectar seus híbridos como os tangelos 'Minneola' e 'Orlando', também infecta o tangor 'Murcott' e híbridos de mandarinas como 'Sunburst', 'Nova', 'Robinson', 'Lee' e 'Page' (NISHIMURA & KOHMOTO, 1983; KOHMOTO et al., 1991; SOLEL, 1991; PEEVER et al., 2000).

Os sintomas da doença aparecem na forma de manchas de coloração marrom para preta, de tamanho variado, em folhas, ramos e frutos. Os sintomas podem aparecer em até 24h após a infecção. Entretanto, as lesões usualmente continuam a expandir, e grandes áreas da folha podem ser mortas pela ação da toxina, devido à seletividade do hospedeiro, sempre com a colonização da área do tecido (KOHMOTO et al., 1993).

Em folhas jovens, as lesões variam de 3-6 mm de diâmetro e de 1-3 mm de profundidade. Em folhas maduras a MMA aparece como distintas manchas amarronzadas, circundadas por um halo amarelo. Em ramos, ocorrem de forma arredondada ou alongada, medindo de 3-8 mm (SOLEL, 1991). Entretanto, o tamanho das lesões em folhas depende da quantidade de inóculo, grau de suscetibilidade e idade dos órgãos vegetais (GARDNER et al., 1986; REIS et al., 2006a). Em frutos podem ocorrer também de forma circular, variando de pequenas para grandes lesões, podendo aparecer na forma de saliências eruptivas corticosas, formando uma pequena bolsa na superfície dos frutos (TIMMER et al., 2000).

De acordo com WHITESIDE (1976), há uma relação entre idade e tamanho de frutos na suscetibilidade, como verificado em frutos de tangerina 'Dancy', em mandarina da cultivar 'Fortune' (VICENT et al., 2004) e em frutos do tangor 'Murcott' (REIS et al., 2006a).

Os fungicidas à base de cobre, iprodione, procimidone, mancozeb e chlorothalonil têm sido eficientes no controle da doença (WHITESIDE, 1979; TIMMER & ZITKO, 1997; TIMMER et al., 2000), porém nem todos esses fungicidas são registrados para a cultura, nas diferentes regiões produtoras. Entretanto, com o uso excessivo do fungicida iprodione do grupo da dicarboximida, tem-se verificado resistência do patógeno em Israel (SOLEL et al., 1996). Fungicidas do grupo dos triazóis e das

estrobilurinas também têm se mostrado eficientes no controle da doença (TIMMER, 2002; SADOWSKY et al., 2002; REIS et al., 2006b). Azoxystrobin e pyraclostrobin, geralmente, são mais eficientes em relação ao trifloxystrobin. As estrobilurinas possuem um único modo de ação, o que pode levar facilmente à resistência do fungo ao fungicida e, dessa forma, faz-se imprescindível que este deva ser empregado de forma alternada com fungicidas de outros grupos químicos, ou usado em mistura com fungicidas protetores (SIEROTSKI et al., 2000).

Desde a identificação dos primeiros focos da doença em pomares citrícolas brasileiros, tem havido uma mobilização conjunta de várias instituições no sentido não só de conhecer a sua causa e a forma de controle, como também oferecer possibilidades de obtenção de material genético tolerante e/ou resistente à doença.

Auxiliando nessa busca, REIS et al., (2007) realizaram testes de resistência a *A. alternata* em folhas de 79 variedades/híbridos de citros pertencentes ao Banco de Germoplasma da Estação Experimental da Citricultura de Bebedouro, Bebedouro-SP, encontrando cinco variedades de Clementinas, uma de Mandarina e um tangelo resistentes a essa doença.

2.4. Verrugose dos citros

A verrugose dos citros é causada pelo fungo *Elsinoe fawcettii* e afeta folhas, ramos e frutas (SIVANESAN & CRITCHETT, 1974) e botões florais (TIMMER et al., 1996) de um pequeno número de gêneros e espécies dentro das rutáceas. Possui distribuição generalizada em áreas de condições climáticas próprias. O grau e ordem de suscetibilidade dentro desse grupo variam de acordo com fatores varietais, climáticos ou geográficos (PELTIER & FREDERICH, 1924; BURN, 1971). Dentre as plantas relatadas como suscetíveis estão diversas variedades de tangerinas, algumas variedades de mandarinas, King, Satsuma e Cravo, laranja azeda, limões Rugoso, Siciliano, Doce e Cravo, pomelos, *Poncirus trifoliata*, calamondim (*Citrus mitis*) e 'Pointed Leaf papeda' (*C. hystrix*). Kunquats (*Fortunella* spp) e a maioria das variedades de laranja doce e lima são geralmente mais resistentes, embora exemplos de infecção

nestes hospedeiros sejam conhecidos (BITANCOURT & JENKINS, 1937; JOTANI, 1957; BURN, 1971). Além de *E. fawcettii* também encontra-se no Brasil *E. australis*, que afeta quase que exclusivamente frutos e laranja doce, sendo muito raramente encontrada em folhas (ROSSETTI, 1980).

Ambos os agentes causais afetam apenas tecidos novos. Os frutos são suscetíveis até atingirem o tamanho aproximado de um quarto do seu diâmetro final, sendo que as lesões serão maiores quanto mais novo for o fruto no momento da infecção (FEICHTENBERGER et al., 1986).

As lesões foliares causadas por *E. fawcettii* são anfígenas, inicialmente pontos semi-translúcidos, tornando-se papiladas, creme a amarelo pálido ou de cores variadas, maiores que 3 mm de diâmetro. As lesões são irregularmente discóides a subglobosas, confluentes, principalmente ao longo das nervuras principais, cor de mel ou canela, papiladas, verrugosas, profundamente fendidas e rachadas quando velhas, maiores que 1 mm de diâmetro. Frutas e brotos jovens podem mostrar distorções e pode ocorrer abscisão de frutas doentes, folhas e partes de folhas (WINSTON, 1923; SIVANESAN & CRICHTON, 1974), comprometendo assim a comercialização *in natura* dos frutos devido ao mau aspecto causado pela doença.

Atualmente a verrugose dos citros é vista como doença secundária na cultura dos citros, sendo seu controle feito por fungicidas (VICENT et al., 2006), visando sempre a proteção de tecidos suscetíveis muito jovens. Por essa razão o controle é sempre iniciado durante ou próximo do período de florescimento das plantas (FEICHTENBERGER et al., 1986), juntamente ao controle de *A. alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Guignardia citricarpa* e outros patógenos mais.

2.5. Melhoramento genético de cítricos

Visando especificamente o melhoramento genético como variedade-copa, busca-se a obtenção de variedades produtivas, de frutos com poucas ou nenhuma semente, alto teor de suco, polpa firme, casca lisa e de fácil descascamento (SARTORI et al., 1997). A nova variedade também deverá apresentar boa compatibilidade aos porta-

enxertos e resistência ou tolerância às pragas e moléstias existentes ou potenciais na região citrícola (SCHWARZ, 2009). O melhoramento genético visando à resistência das plantas às moléstias é uma das maneiras de controle mais eficientes, simples e de reduzido impacto na natureza, porém suas conquistas geralmente não são muito expressivas, pois os patógenos apresentam algumas vantagens seletivas sobre os genótipos hospedeiros, entre elas, curto ciclo de vida e facilidade de liberação de novas combinações genéticas de patogenicidade, principalmente devido às mutações espontâneas e seus mecanismos próprios de recombinação sexual ou assexual (MATIELLO et al., 1997).

Desta forma, o melhoramento genético de citros apresenta-se como uma importante alternativa na busca por solução para os problemas citados, embora ainda não se tenha apresentado o resultado esperado. Segundo CRISTOFANI (1991), as limitações do melhoramento genético convencional dos *Citrus* são um reflexo do comportamento genético e reprodutivo deste gênero, influenciadas por fatores tais como, longo ciclo reprodutivo, apomixia, alto grau de heterozigosidade e sementes poliembriônicas.

CAPÍTULO 2 - Reação de genótipos de tangerina a *Alternaria alternata*

RESUMO: A Mancha Marrom de Alternaria, causada por *Alternaria alternata*, constitui uma das principais doenças fúngicas em certas espécies de tangerinas, tangores, mandarinas e pomelos, tanto no Brasil como em âmbito internacional, podendo causar necroses em frutos, ramos e folhas, gerando prejuízos. No presente trabalho, em condições de laboratório e em campo, foi avaliada a resistência ao fungo, em folhas e frutos, de 22 cultivares de tangerinas. Para tal foram avaliados genótipos pertencentes ao Banco de Germoplasma da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, Bebedouro-SP. Dentre os materiais genéticos resistentes, foram constatados quatro variedades de clementinas (*Citrus clementina*), seis mandarinas, sendo duas pertencentes a *C. reticulata*, duas a *C. tangerina*, uma a *C. deliciosa* e uma a *C. nobilis*; um tangelo (*C. tangerina* x *C. paradisi*); dois híbridos de mandarinas, sendo um resultante do cruzamento entre *C. nobilis* x *C. deliciosa*, e o outro de *C. clementina* x *C. reticulata*; um híbrido de tangor (*C. clementina* x *C. sinensis*) e dois híbridos de satsumas (*C. unshiu* x *C. deliciosa*.). Também foi constatado indícios de relação entre severidade de doença em folhas jovens destacadas e incidência natural de doença em frutos.

Palavras chave: *Citrus* sp., Mancha Marrom de Alternaria, resistência varietal

1. Introdução

O primeiro registro da Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA) foi em mandarina 'Emperor', na Austrália, em 1903 (PEGG, 1966), e o agente causal foi designado como *Alternaria citri*.

Na Florida, EUA, a MMA foi observada em 1974, infectando frutos e ramos de tangerina 'Dancy' (*Citrus reticulata*) (WHITESIDE, 1976). Em 1989 foi relatada em Israel (SOLEL, 1991) e posteriormente encontrada na África do Sul (SCHUTTE et al., 1992), Cuba (HERRERA, 1992), Colômbia (CASTRO-CAICEDO et al., 1994), Turquia (CANIHOS et al., 1997), Espanha (VICENT et al., 2000), Itália (BELLA et al., 2001), Argentina (PERES et al., 2003) e no Peru (MARÍN et al., 2006).

No Brasil, os sintomas iniciais da doença foram verificados em plantas de tangerina 'Dancy' (*C. reticulata*), em pomares localizados no Estado do Rio de Janeiro (GOES et al., 2001). Nos anos subseqüentes, sua presença foi identificada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (SPÓSITO et al., 2003). Desde então, esta doença vem se constituindo em fator limitante à produção de tangerinas e, principalmente, do tangor 'Murcott'.

Existem dois patotipos de *A. alternata* que ocorrem em plantas cítricas, cuja distinção baseia-se na especificidade da produção de toxina (HST) aos seus hospedeiros (KOHMOTO et al., 1979). Um patotipo é chamado de ACT – toxina ou ACTG – toxina do patotipo tangerina, relatado em Queensland, na Austrália (PEGG, 1966) e na Flórida, nos EUA (WHITESIDE, 1976), e o outro, chamado de ACR – toxina ACRL – toxina do patotipo limão 'Rugoso'. Este último, também reportado na Flórida por Whiteside (1976), é específico aos limoeiros, especialmente o 'Rugoso' (*Citros jambhiri*) e 'Cravo' (*Citrus limonia*). A toxina ACT, além de se expressar em tecidos de tangor 'Murcott' e em seus híbridos, também se expressa em tecidos jovens de tangelos 'Minneola' e 'Orlando', e em híbridos tipo mandarina como 'Sunburst', 'Nova', 'Robinson', 'Lee' e 'Page' (NISHIMURA & KOHMOTO, 1983; KOHMOTO et al., 1991; SOLEL, 1991; PEEVER et al., 2000).

Os sintomas da doença aparecem na forma de manchas de coloração marrom para preta, de tamanho variado, em folhas, ramos e frutos. Os sintomas podem aparecer em até 24h após o início da infecção. Entretanto, as lesões usualmente continuam a expandir, e grandes áreas dos tecidos foliares podem necrosar pela ação da toxina (KOHMOTO et al., 1993).

Em folhas jovens, as lesões variam de 3-6 mm de diâmetro e de 1-3 mm de profundidade. Tais folhas, quando não caem prematuramente, exibem manchas amarronzadas, circundadas por um halo amarelo. O tamanho dessas lesões depende da quantidade de inóculo, grau de suscetibilidade e idade dos órgãos vegetais (GARDNER et al., 1986; REIS et al., 2006b). Em ramos, ocorrem de forma arredondada ou alongada, medindo de 3-8 mm (SOLEL, 1991) e nos frutos, também podem ser de forma circular, de tamanho variado de 2 a até mais de 10 mm de diâmetro, podendo aparecer na forma de saliências eruptivas e corticosas, formando uma pequena bolsa na superfície dos frutos (TIMMER et al., 2000), existindo relação idade e tamanho dos frutos em relação à suscetibilidade (WHITESIDE, 1976), como verificado em frutos de tangerina 'Dancy', em mandarina 'Fortune' (VICENT et al., 2004) e em tangor 'Murcott' (REIS et al., 2006a).

O controle da MMA baseia-se na utilização de fungicidas (WHITESIDE, 1979; TIMMER & ZITKO, 1997; TIMMER et al., 2000; MONDAL et al., 2009). Porém, uma grande dificuldade inerente ao controle resulta da necessidade da realização freqüente de pulverizações. Em decorrência do uso excessivo e continuado de alguns produtos, linhagens resistentes estão se firmando em algumas regiões dificultando ainda mais o controle da doença, como observado em Israel (SOLEL et al., 1996). Em vista do exposto, o emprego de variedades resistentes seria uma alternativa valiosa, com uma grande multiplicidade de benefícios.

Estudos visando determinar o comportamento de genótipos de tangerinas em relação à resistência a *A. alternata* foram realizados por REIS et al (2007). Neste estudo, mediante utilização de testes em folhas destacadas foram testados 79 genótipos. Dentre os quais, foram identificados vários materiais resistentes, sendo alguns com notável potencial agrônomo com evidências promissoras quanto ao seu

pleno atendimento às exigências do mercado consumidor, entre elas destaca-se facilidade para descascamento, coloração e palatabilidade.

Diante do exposto, o presente trabalho fundamentou-se em avaliações com o propósito de selecionar genótipos de tangerinas resistentes a infecção de *A. alternata*, e estabelecer relações de severidade de doença, em folhas e frutos

2. Material e métodos

2.1. Seleção dos materiais testados

Foram realizados dois experimentos e, em ambos foram empregados materiais pertencentes ao Banco de Germoplasma da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB), Bebedouro-SP. A classificação botânica dos genótipos foi realizada segundo as descrições feitas por HODGSON (1967), ORTIZ MARCIDE (1985) e ORTIZ MARCIDE (1986), seguido de seleção com base em perspectivas agronômicas desejáveis, determinadas mediante avaliações preliminares referentes à características fenotípicas, como aparência, coloração, facilidade para descascamento e sabor (Tabela 1).

Tabela 1 – Genótipos de tangerinas pertencentes ao banco de germoplasma da EECB com potencial agrônômico. Bebedouro. 2008.

Clementinas	Mandarinas
(<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan.)	(<i>C. reticulata</i> Blanco)
Clementina 2 Kr Monreal	Burgess SRA 412
Commune SRA-88	Fewtrell SRA-418
Caffin SRA-385	Daisy Mandarin
Bruno SRA-531	
	(<i>C. deliciosa</i> Ten.)
Satsumas	Peau Lisse SRA 267
(<i>C. unshiu</i> Marc.)	
Satsuma CN (clone nucelar)	(<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.)
	Zanzibar SRA 442
Tangelos	Beuty Of Glen Retreat SRA 261
(<i>C. tangerina</i> x <i>C. paradisi</i> Macf.)	
Nocatee SRA-452	(<i>C. nobilis</i> Lour.)
	Rode king SRA 431
Mandarinas (híbridos)	Satsuma (híbridos)
(<i>C. nobilis</i> x <i>C. deliciosa</i>)	(<i>C. unshiu</i> Marc. x (<i>C. reticulata</i> Bla. x <i>C. sinensis</i> Osb.))
Encore SRA 190	

Continuação	
(<i>C. clementina</i> x <i>C. reticulata</i>)	Satsuma x Murcott (EECB 34)
Fremont	Satsuma x Murcott 4 (EECB 3)
Tangor (híbridos)	(<i>C. unshiu</i> Marc. x <i>C. sinensis</i> Ten.)
(<i>C. temple</i> Hort. ex. Y. Tan. x <i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.)	Satsuma x Natal (EECB 30)
Temple x Dancy Mandarin	Satsuma x Natal (EECB 41)
	Satsuma x Natal 3 (EECB 12)
(<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan. x <i>C. sinensis</i> (L.) Osb.)	
tangerina Clementina x laranja Tarocco	

2.2. Isolamento e produção de inóculo de *Alternaria alternata*

Folhas sintomáticas de tangor 'Fortune' foram obtidas de plantas pertencentes à EECB e levadas para o Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade da UNESP, em Jaboticabal. Para o isolamento do fungo, pequenos fragmentos de tecido foliar com sintomas da doença foram imersos em álcool etílico a 50% (v/v), por 30 segundos, e em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 1% e água na proporção de 1:3 (v/v), durante dois minutos. Esses fragmentos foram enxaguados em água destilada estéril e depositados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-água). As placas contendo meio de cultura e fragmentos de tecidos foram incubadas em estufa tipo B.O.D. a 25°C, sob luz fluorescente em fotofase (12 horas). Após sete dias, foram realizadas repicagens para obtenção de colônias puras do fungo.

A partir de culturas puras e patogenicamente comprovadas através de inoculações prévias em folhas jovens de tangor 'Murcott' (Reis et al., 2007), discos de 5 mm de diâmetro de colônias do fungo foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA. Nesses tubos, após o crescimento do fungo foi depositado óleo mineral estéril para supressão do metabolismo do fungo. Concomitantemente ao processo mencionado, discos de colônias do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo BDA e incubados em estufas tipo B.O.D. a 25°C, sob luz fluorescente em fotofase de 12 horas.

Para obtenção do inóculo, nas culturas puras existentes nas placas foram adicionados cinco mililitros de água destilada esterilizada à sua superfície, raspando-as posteriormente com uma lâmina de vidro para a remoção do micélio. As placas de Petri contendo as colônias foram mantidas abertas em temperatura ambiente por 3-4 dias em luz constante para a produção de conídios. A seguir, foram adicionados 10 mL de água destilada estéril contendo Tween-20[®] a 0,02% (v/v), seguido de raspagem superficial das colônias através de pincel de cerdas macias. A suspensão obtida foi filtrada em dupla camada de gaze esterilizada. A suspensão obtida foi ajustada para uma concentração de 10^4 conídios.mL⁻¹.

2.3. Inoculação e avaliação de severidade de doença em frutos

Em Fevereiro de 2008, 20 frutos com cerca de 20 a 40 mm de diâmetro, localizados na porção mediana dos corpos das plantas e distribuídos nos quatro quadrantes das mesmas, foram marcados e inoculados com uma suspensão de *A. alternata*. A inoculação ocorreu ao entardecer, sendo empregado atomizador manual, do tipo De Vilbs, utilizando aproximadamente um mililitro por fruto (CANIHOS et al., 1999). Após a inoculação todos os frutos foram ensacados com sacos de papel cristal previamente borrifados internamente com água para formação de câmara úmida. No dia seguinte, na parte da manhã e ao entardecer, os saquinhos foram novamente borrifados com água para manutenção da umidade até a manhã do dia seguinte, quando foram removidos. Frutos correspondentes à testemunha foram submetidos aos mesmos tratamentos, sem, porém, contar com a inoculação do patógeno.

Foram utilizadas de duas a três plantas por genótipo de tangerina com potencial agrônomo (Tabela 1). As avaliações foram realizadas a partir do quarto dia após a inoculação (DAI), estendendo-se aos sete dias subseqüentes através da utilização de uma escala de notas que variou de zero a três: zero (ausência de sintomas), 1 (presença de 1 a 2 lesões por fruto); 2 (presença de 3 a 6 lesões) e 3 (7 ou mais lesões) (REIS et al., 2007).

2.4. Inoculação e avaliação de severidade de doença em folhas destacadas

Utilizando-se tesoura de poda, foram coletados ramos jovens com cerca de 20 a 30 dias, contendo folhas igualmente jovens e pertencentes ao mesmo estágio fenológico. Tais ramos foram acondicionados em caixas de isopor e levados para o Laboratório de Fitopatologia da UNESP, em Jaboticabal/SP, poucas horas após a coleta. A partir de tais ramos foram coletadas folhas de 20-40 mm de comprimento, íntegras e uniformes quanto à sua maturidade, as quais tiveram o pecíolo envolvido por chumaço de algodão, seguido do seu umedecimento e deposição em placas de Petri de 15 cm x 2cm.

Para inoculação por aspersão utilizou-se critério semelhante ao descrito anteriormente, inclusive em termos de isolado, porém com as placas mantidas em plano horizontal, sobre bancada do laboratório. Para cada cultivar foram utilizadas três repetições, sendo cada uma delas constituída por 20 folhas. O mesmo procedimento foi adotado para as folhas testemunhas, porém utilizando-se apenas o borrifamento com água (CANIHOS et al., 1999). Após inoculação as placas de Petri contendo as folhas inoculadas foram mantidas em temperatura ambiente, sob fotofase de 12h. A avaliação foi realizada 48 horas após a inoculação utilizando a mesma escala de notas adotado para avaliação em frutos (REIS et al., 2007) (Tabela 1).

2.5. Avaliação de infecção natural por *Alternaria alternata* em folhas maduras e frutos

Durante o mês de março de 2008 foram realizadas avaliações de severidade de doenças por infecção natural em folhas maduras e frutos de genótipos de tangerina a campo (Tabela 1). Os materiais avaliados foram coletados de forma aleatória e submetidos à avaliação de severidade de doença pela mesma escala de notas utilizada nos experimentos anteriores (Reis et al., 2007).

3. Resultados e discussão

As respostas às infecções naturais, como às resultantes de inoculação artificial de *A. alternata* em frutos foram semelhantes para a mandarina 'Daisy', o tangor (híbrido) 'Temple' x mandarina 'Dancy' (*C. temple* x *C. tangerina*) e a satsuma (híbrido) Satsuma x tangor 'Murcott 4' (EECB 3) (*C. unshiu* x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)), as quais apresentaram baixa susceptibilidade (Tabela 2). Os demais genótipos avaliados mostraram-se resistentes, não sendo observados sintomas, tanto após inoculação artificial, como em infecções naturais.

Nas avaliações em folhas destacadas verificou-se alta suscetibilidade para a mandarina 'Daisy' (*C. reticulata*), o tangor (híbrido) Temple x mandarina 'Dancy' (*C. temple* x *C. tangerina*) e a satsuma (híbrido) Satsuma x tangor 'Murcott 4' (EECB 3) (*C. unshiu* x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)) e baixa susceptibilidade para 'Satsuma CN' (clone nucelar) (*C. unshiu*) e satsumas (híbrido) Satsuma x tangor 'Murcott' (EECB 34) (*C. unshiu* x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)) e Satsuma x Natal (EECB 41) (*C. unshiu* x *C. deliciosa*). Os demais genótipos não apresentaram sintomas de MMA. Por outro lado, a avaliação de infecção natural em folhas, foi verificado que a mandarina 'Daisy' (*C. reticulata*), o tangor (híbrido) Temple x mandarina 'Dancy' (*C. temple* x *C. tangerina*) e a satsuma (híbrido) Satsuma x tangor 'Murcott 4' (EECB 3) (*C. unshiu* x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)) apresentaram baixa suscetibilidade, enquanto as demais se mostraram altamente resistentes, com ausência de sintomas nas folhas avaliadas.

Tabela 2 – Comportamento de genótipos de *Citrus* spp. quanto à inoculação natural e artificial em frutos e em folhas com *Alternaria alternata*, agente causal da Mancha Marrom de Alternaria. EECB, Bebedouro-SP, 2008.

Cultivares	Resultado da inoculação			
	Infecção natural de frutos	Infecção por inoculação em frutos	Infecção natural em folhas	Infecção por inoculação em folhas destacadas
Clementinas				
<i>(C. clementina</i> Hort. ex Tan.)				
Clementina 2 Kr Monreal	-	-	-	-
Commune SRA-88	-	-	-	-
Caffin SRA-385	-	-	-	-
Bruno SRA-531	-	-	-	-
Mandarinas				
<i>(C. reticulata</i> Blanco)				
Burgess SRA 412	-	-	-	-
Fewtrell SRA-418	-	-	-	-
Daisy Mandarin	+	+	+	+++
<i>(C. deliciosa</i> Ten.)				
Peau Lisse SRA 267	-	-	-	-
<i>(C. tangerina</i> Hort. ex Tan.)				
Zanzibar SRA 442	-	-	-	-
Beuty Of Glen Retreat SRA 261	-	-	-	-
<i>(C. nobilis</i> Lour.)				
Rode king SRA 431	-	-	-	-
Satsumas				
<i>(C. unshiu</i> Marc.)				
Satsuma CN (clone nucelar)	-	-	-	+
Tangelos				
<i>(C. tangerina</i> x <i>C. paradisi</i> Macf.)				
Nocatee SRA-452	-	-	-	-
Mandarinas (híbridos)				
<i>(C. nobilis</i> x <i>C. deliciosa</i>)				
Encore SRA 190	-	-	-	-

Continuação

(C. *clementina* x C. *reticulata*)

Fremont	-	-	-	-
---------	---	---	---	---

Tangor (híbridos)(C. *temple* Hort. ex. Y. Tan. x C. *tangerina* Hort. ex Tan.)

Temple x Dancy Mandarin	+	+	+	+++
-------------------------	---	---	---	-----

(C. *clementina* Hort. ex Tan. x C. *sinensis* (L.) Osb.)

tangerina Clementina x laranja Tarocco	-	-	-	-
--	---	---	---	---

Satsuma (híbridos)(C. *unshiu* Marc. x (C. *reticulata* Bla. x C. *sinensis* Osb.))

Satsuma x Murcott (EECB 34)	-	-	-	+
Satsuma x Murcott 4 (EECB 3)	+	+	+	+++

(C. *unshiu* Marc. x C. *sinensis* Ten.)

Satsuma x Natal (EECB 30)	-	-	-	-
Satsuma x Natal (EECB 41)	-	-	-	+
Satsuma x Natal 3 (EECB 12)	-	-	-	-

(-) ausência de lesões, (+) uma a duas lesões, (++) três a seis lesões, (+++) sete ou mais lesões

Testes de resistência e suscetibilidade às patotoxinas ACT e ACR em citros foram realizados por vários pesquisadores, incluindo KOHMOTO et al. (1979), SOLEL & KIMCHI (1997) e PEEVER et al. (2000). A toxina do tipo ACT, produzida por *A. alternata* é específica para uma determinada gama de hospedeiros (HST) (KOHMOTO et al., 1991; PEEVER et al., 1999), identificando algumas tangerinas e seus híbridos como suscetíveis (PEGG, 1966). No presente trabalho, em relação ao já descrito na literatura por diversos autores, foi verificada susceptibilidade a ACT toxina em plantas provenientes de cruzamento cujos parentais eram provenientes de *C. reticulata*, *C. temple*, *C. tangerina*, *C. unshiu*, *C. sinensis* e *C. deliciosa*. REIS et al. (2007) também relataram susceptibilidade ao patógeno em alguns genótipos de *C. deliciosa* e *C. temple* e PEGG (1966) também relatou a ocorrência de *A. alternata* para *C. tangerina*.

Entre as mandarinas estudadas e provenientes de *C. reticulata*, somente o genótipo de mandarina 'Daisy' mostrou-se suscetível quando da inoculação em frutos e em folhas, fato esse também observado quando da sua exposição a infecções natural. Resultados semelhantes ocorreram em tangor (híbrido) Temple x mandarina Daisy (*C. temple* x *C. tangerina*) e satsuma (híbrido) Satsuma x Murcott 4 (EECB 3) (*C. unshiu* x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)). Nos três casos observou-se que as infecções em folhas destacadas foram mais severas do que observadas em condições naturais, em folhas e em frutos e em frutos inoculados. Resultados semelhantes foram encontrados em inoculações de Satsuma CN (clone nucelar) (*C. unshiu*) e satsumas (híbrido) Satsuma x Murcott (EECB 34) (*C. unshiu* x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)) e Satsuma x Natal (EECB 41) (*C. unshiu* x *C. sinensis*).

Nos cruzamentos entre Satsuma x Natal (*C. unshiu* x *C. sinensis*) foram obtidos dois híbridos resistentes, os quais não expressaram sintomas, complementado por híbrido adicional resultante de Satsuma x Natal (EECB 41), o qual apresentou baixa infecção em folhas destacadas. Tal fato, no entanto, requer estudos complementares, já que não se pode descartar que folhas destacadas apresentem alterações fisiológicas que possam se refletir no seu nível de resistência, tornando mais suscetível a *A. alternata*, e outros microrganismos.

Em termos gerais, quando do emprego de progenitores teoricamente semelhantes, há a possibilidade de que o comportamento dos híbridos quanto a *A. alternata* seja fenotipicamente semelhante. Entretanto, no presente caso foram verificadas variações nos níveis de respostas dos mesmos, quando expostos à inoculação desse fungo. Esse comportamento diferenciado, embora seja conhecido na literatura (VICENT et al., 2004; CHAGAS et al., 2007), as razões para a sua ocorrência não são ainda conhecidas, já que a totalidade das condições de ambiente e metodologia, incluindo o método de inoculação foram igualmente favoráveis e seguiram os preceitos adotados por vários investigadores (CANIHOS et al., 1999; REIS et al., 2006; REIS et al., 2007). Embora vários fatores possam contribuir para tais variações, como por exemplo os pertinentes às relações intrínsecas hospedeiro-patógeno, incluindo uma melhor especialização do patógeno. Nesse contexto, KOHMOTO et al.

(1991) verificaram que as tangerinas King e seus híbridos Encore e Kara-Kara foram resistentes a isolados Aac oriundos da Flórida. No caso do híbrido Kara-Kara, segundo esses autores essa resistência também foi observada quando da inoculação com isolados de Aac, oriundo da Austrália. Todavia, esse híbrido, juntamente com o 'Wilking' e a tangerina 'King' mostraram-se suscetíveis quando inoculados com o isolado Aac, oriundo de Israel (SOLEL & KIMCHI, 1997). Em vista disso, não se pode descartar um possível efeito genético dos próprios genótipos testados, por tratar-se de planta predominantemente alógama e mantidas e/ou cultivadas em áreas comuns ou limítrofes.

Dessa forma, há indícios de relação entre nível de suscetibilidade em folhas jovens destacadas, infecção natural de folhas e frutos, e infecção artificial por inoculação em frutos, podendo assim, se constituir numa nova metodologia para o prognóstico, identificação e seleção de genótipos de *Citrus* spp. resistentes a *A. alternata*.

CAPÍTULO 3 – Alteração na composição dos metabólitos em folhas maduras de tangerinas a *Alternaria alternata*

RESUMO - *Alternaria alternata* é o fungo causador da Mancha Marrom de Alternaria (MMA) em alguns genótipos de tangerinas e tangores. Os sintomas ocorrem em tecidos jovens, abrangendo folhas, frutos e brotações. Em folhas maduras, tanto de espécies suscetíveis como nas resistentes não há expressão de sintomas. Em vista disso, avaliou-se a contribuição de metabólitos pré e pós-formados em relação à defesa das folhas ao agente causal, *A. alternata*. Para os bioensaios foram utilizados extratos hexânicos obtidos de 22 genótipos de tangerinas, além de extratos hexânicos de Mexerica-do-Rio e tangor 'Murcott', como respectivos padrões de resistência e suscetibilidade. Como controle positivo e negativo de inibição de crescimento micelial foi utilizado, respectivamente, o fungicida azoxistrobina (Amistar®) 50% nas concentrações de 0,075 g.L⁻¹ e 0,150 g.L⁻¹ e o fungicida tiofanato metílico (Spring®) 85% nas doses 1 g.L⁻¹ e 2 g.L⁻¹. Ao final dos experimentos, não foi observado influência desses metabólitos na defesa das folhas maduras de tangerina a MMA, havendo sinais de inibição de crescimento micelial apenas nos controles utilizando o fungicida Amistar®.

Palavras chave: fitoquímica, Mancha Marrom de Alternaria, variedade resistente

1. Introdução

A Mancha Marrom de Alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata*, ocorre em várias regiões do mundo (TIMMER et al., 2003) e se constitui em fator limitante à produção de tangerinas e, principalmente, do tangor 'Murcott', devido à sua alta suscetibilidade.

Os sintomas da MMA caracterizam-se pela presença de manchas de coloração marrom, inicialmente diminutas, que posteriormente pode alcançar diâmetro superior a 1 cm. Sempre as lesões mostram-se circundadas por um halo amarelo típico, resultante da toxina produzida pelo fungo. Independente do tamanho das lesões, frequentemente ocorre a queda das folhas, assim como dos frutos jovens, e, no caso dos ramos, há a morte do ponteiro e brotações laterais. As lesões podem aparecer próximo às 24h após a infecção e continuam a se expandir, de modo que grandes áreas da folha podem ser mortas pela ação da toxina, dependendo da suscetibilidade do hospedeiro (KOHMOTO et al., 1993). Em folhas maduras, a MMA aparece como distintas lesões amarronzadas, circundadas por um halo amarelo e, em ramos, as lesões ocorrem de forma arredondada ou alongada (SOLEL, 1991). Entretanto, o tamanho das lesões em folhas depende da quantidade de inóculo, grau de suscetibilidade e idade dos órgãos vegetais (GARDNER et al., 1986; REIS et al., 2006c). As lesões em frutos podem ocorrer também de forma circular, variando de pequenas para grandes lesões, maiores que 5 mm de diâmetro. As lesões podem aparecer na forma de saliências eruptivas corticosas, formando uma pequena bolsa na superfície dos frutos (TIMMER et al., 2000) e/ou na região do albedo.

Praticamente todas as variedades de tangerinas e tangores de importância econômica são suscetíveis ao patógeno. Dessa forma, o controle da MMA baseia-se na utilização de fungicidas (TIMMER et al., 2000). Porém, o uso contínuo destes, associado a aplicações inadequadas, podem levar a seleção de linhagens fúngicas resistentes, como verificado em Israel (SOLEL et al., 1996), além dos resultados nem sempre atenderem aos níveis de controle desejáveis, tanto do ponto de vista técnico, como econômico e ecológico. Dessa forma, o emprego de cultivares resistentes ao

patógeno desponta como um dos marcos mais significativo em termos de avanços tecnológicos na agricultura. O uso de materiais resistentes é o método de controle preferido por ser o mais barato e de utilização mais fácil (CAMARGO & BERGAMIN FILHO, 1995).

Estudos com vistas à obtenção de genótipos de tangerina e tangores resistentes à MMA têm sido realizados por vários pesquisadores (GARDNER et al., 1986; KOHMOTO et al., 1991; PEEVER et al., 2000; REIS et al., 2007). Como resultado desses estudos tem-se obtidos genótipos promissores, estando em alguns casos com avanços significativos.

De um modo geral, há indicações de resultados de pesquisas que relacionam a resistência de folhas, ramos e frutos à maturidade dos tecidos (PEGG, 1966; GARDNER et al., 1986; SOLEL, 1991; REIS et al., 2006). Segundo estes autores, folhas de tangerinas tornam-se resistentes ao patógeno quando atingem a sua maturidade, enquanto frutos mais desenvolvidos tornam-se menos suscetíveis, particularmente após o estágio de maturação, no qual as glândulas de óleo tornam-se proeminentes (PEGG, 1966).

Como resposta ao ataque de patógenos, as plantas podem mobilizar diferentes mecanismos de defesa, incluindo lignificação, suberização, síntese de fitoalexinas (BROETTO, 1995; MARSCHNER, 1995), fitoanticipinas (VANETTEN et al., 1994) e indução de enzimas hidrolíticas. Dentre as alterações fisiológicas ocorridas no hospedeiro induzidas por fitopatógenos, incluem-se modificação na taxa de respiração e fotossíntese, translocação e metabolismo de carboidratos, transpiração, alterações na atividade de enzimas, metabolismo do nitrogênio e de hormônios, formação de ácidos nucléicos e proteínas (LEITE & PASCHOLATI, 1995).

Fitoalexinas são definidas como metabólitos secundários antimicrobianos, com baixo peso molecular, que são formados a partir de ações físicas, químicas ou estresses biológicos suprimindo a atividade de fungos e bactérias patogênicas. A taxa de produção e acúmulo destes metabólitos é dependente do genótipo e das condições sanitárias do hospedeiro em relação ao patógeno (PURKAYASTHA, 1994). Por outro lado, as fitoanticipinas, apesar de também apresentarem baixo peso molecular, diferem

das fitoalexinas por serem compostos pré-existent nas plantas agindo como compostos antimicrobianos (VANETTEN et al., 1994).

Outro mecanismo de defesa dos citros a agente patogênicos, como fungos e bactérias, são os óleos essencial. Estes óleos atuam muitas vezes associados a componentes fitoquímicos e desfavorecendo a sobrevivência do agente patogênico por meio de lise celular do patógeno (SOKOVIC & GRIENSVEN, 2006; MATASYOH et al., 2007).

Assim, diante do exposto, e considerando as respostas prévias obtidas mediante testes de patogenicidade em diversas espécies de tangerinas, resistentes e suscetíveis, julgou-se oportuno avaliar a contribuição de metabólitos secundários pré e pós-formados em folhas maduras, de diversas cultivares de tangerina, como fator de resistência ao fungo *Alternaria alternata*.

2. Material e métodos

2.1. Área experimental material vegetal

Os materiais genéticos estudados (Tabela 1) foram coletados no Banco de Germoplasma da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB), em Bebedouro - SP.

Tabela 1 – Relação de genótipos de tangerinas com potencial agrônomo pertencentes ao Banco de Germoplasma da EECB.

Clementinas	Mandarinas
(<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan.)	(<i>C. reticulata</i> Blanco)
Clementina 2 Kr Monreal	Mand. Burgess SRA 412
Commune SRA-88	Fewtrell SRA-418
Caffin SRA-385	Daisy Mandarin
Bruno SRA-531	
	(<i>C. deliciosa</i> Ten.)
Satsumas	Peau Lisse SRA 267
(<i>C. unshiu</i> Marc.)	
Satsuma CN (clone nucelar)	(<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.)
	Zanzibar SRA 442
	Beuty Of Glen Retreat SRA 261

Continuação

Tangelos (<i>C. tangerina</i> x <i>C. paradisi</i> Macf.) Nocatee SRA-452	(<i>C. nobilis</i> Lour.) Rode king SRA 431
Mandarinas (híbridos) (<i>C. nobilis</i> x <i>C. deliciosa</i>) Encore SRA 190 (B)	Satsuma (híbridos) (<i>C. unshiu</i> Marc. x (<i>C. reticulata</i> Bla. x <i>C. sinensis</i> Osb.)) Satsuma x Murcott (EECB 34) Satsuma x Murcott 4 (EECB 3)
(<i>C. clementina</i> x <i>C. reticulata</i>) Fremont	(<i>C. unshiu</i> Marc. x <i>C. sinensis</i> Ten.) Satsuma x Natal (EECB 30) Satsuma x Natal (EECB 41) Satsuma x Natal 3 (EECB 12)
Tangor (híbridos) (<i>C. temple</i> Hort. ex. Y. Tan. x <i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.) Temple x Dancy Mandarin	Tangor Murcott (<i>C. sinensis</i> X <i>C. reticulata</i>) (padrão de susceptibilidade)
(<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan. x <i>C. sinensis</i> (L.) Osb.) tangerina Clementina x laranja Tarocco	Mexerica-do-Rio (<i>C. deliciosa</i>) (padrão de resistência)

2.2. Produção de inóculo de *Alternaria alternata*

Foi utilizado um isolado de *A. alternata* pertencente à micoteca do Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, de Jaboticabal-SP, obtido a partir de folhas sintomáticas de tangor 'Fortune' (*C. Clementina* x *C. tangerina*), coletadas de plantas pertencentes ao banco de germoplasma da EECB. Tal isolado mostrou-se patogênico através de testes de inoculação realizados previamente em folhas jovens de tangor 'Murcott' (*C. reticulata* x *C. sinensis*).

Discos de 5 mm de diâmetro retirados da borda de colônias estoque foram transferidas para placas de Petri (9,0 cm) onde permaneceram por 15 dias a 25°C e fotofase de 12 horas.

Para obtenção do inóculo foi acrescido cinco mililitros de água destilada esterilizada sobre as colônias, as quais foram raspadas com uma lâmina de vidro para a remoção do micélio. Posteriormente, tais colônias foram incubadas a 20°C por 3 dias para a produção de conídios. Sequencialmente foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada contendo Tween-20® a 0,02% (v/v), seguido de raspagem

superficial das colônias com pincel de cerdas macias. A suspensão obtida foi filtrada em camadas duplas de gaze esterilizada.

Em testes preliminares, observou-se que em 24 horas após inoculação de *A. alternata* em suspensão ajustada a 10^4 conídios.mL⁻¹ sobre folhas maduras destacadas do tangor 'Murcott', havia 80% de germinação dos conídios. Nessas mesmas condições, após 32 horas 100% dos conídios encontravam-se germinados.

2.3. Detecção da atividade antifúngica dos extratos

2.3.1. Avaliação de compostos antifúngicos pré-formados

Ramos contendo folhas maduras dos genótipos de tangerinas citados na Tabela 1, em adequado estado sanitário, foram coletados manualmente com o auxílio de tesoura. Tais ramos foram em seguida acondicionados em caixas de isopor e levadas para o laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, em Jaboticabal. Em seguida, as folhas foram destacadas, lavadas em água esterilizada, secas em papel absorvente macio, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação de ar a 40°C até atingir massa constante.

Foram utilizados 10g de material seco, os quais foram triturados em pequenos fragmentos com a utilização de um homogenizador na presença de hexano (1/10, m:v) e deixados em repouso por 24 horas. Em seguida, o extrato foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e concentrado a vácuo em evaporador rotativo, com temperatura de banho-maria a 40°C ± 2°C. O extrato seco foi ressuspenso em diclorometano e armazenado em microtubos Eppendorf® de 2,0 mL a -18 °C, até o momento da utilização, conforme metodologia empregada por KIM et al. (1991).

Cinco miligramas de cada extrato foram dissolvidos em 0,5 mL de diclorometano. Após diluição, 30 µL de cada extrato foram aplicados sobre placas de CCD de sílica gel 60 F₂₅₄ 0,2 mm (Merck). Como fase móvel foi utilizado hexano/acetato de etila (7:3, v/v) + 1% de ácido acético. As placas foram reveladas em luz UV nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm para detecção de compostos fluorescentes (adaptado de KIM et al., 1991). Para a visualização e documentação dos eluentes cromatografados, as

placas foram borrifadas com uma mistura de vanilina, etanol absoluto e ácido sulfúrico concentrado (1g vanilina + 100 mL de etanol absoluto + 1 mL ácido sulfúrico concentrado).

Para identificação de atividade antifúngica, 24 horas após o preparo das CCD (sem revelação química), foi aplicado em ambiente estéril uma fina camada de meio de cultura Czapek-Dox contendo Tween-20[®] a 0,02% sobre as placas. Após endurecimento do meio de cultura foi aplicada uma suspensão fúngica de *A. alternata* (10^5 conídios.mL⁻¹) (ALEF, 1995 adaptado). Cada placa de CCD foi armazenada individualmente em placas de Petri (15 cm x 2 cm) estéreis e vedadas utilizando filme de PVC para manter a umidade necessária à germinação dos conídios, por 3-4 dias a 25°C e fotofase de 12 horas.

2.3.2. Avaliação de compostos antifúngicos pós-formados

As inoculações foram realizadas em folhas maduras de plantas adultas de 'Mexerica-do-Rio' e tangor 'Murcott' (Tabela 1), de acordo com CANIHOS et al. (1999). A inoculação ocorreu ao entardecer, sendo empregado nebulizador manual, do tipo De Vilbs, com vazão suficiente para boa cobertura das folhas (1 mL), na concentração de 10^4 conídios.mL⁻¹. Após inoculação, as folhas foram acondicionadas em sacos de papel cristal, previamente borrifados internamente com água destilada, para formação de câmara úmida. Como testemunha, folhas maduras de Mexerica-do-Rio e tangor 'Murcot' foram submetidas aos mesmos tratamentos, sem, porém, ser empregada suspensão conidial, mas somente o borrifamento com água destilada. Os materiais inoculados foram coletados 24 e 48 horas após a inoculação.

Os procedimentos de secagem, preparo dos extratos vegetais, aplicação sobre as placas de CCD, revelação e avaliação de atividade antifúngica foram os mesmos descritos na avaliação de compostos antifúngicos pré-formados.

2.3.3. Influência dos extratos hexânicos sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata*

Para estudar o potencial antimicrobiano dos extratos hexânicos utilizados nos experimentos 2.3.1 e 2.3.2, discos de papel de filtro de sete milímetros de diâmetro foram saturados com os extratos cítricos ressuspensos em diclorometano na proporção de 1:1 (mL:μL) e mantidos protegidos da luz por 24 horas para evaporação do solvente e evitar fotodegradação dos mesmos.

Vinte e quatro horas após a saturação dos discos de papel, com o auxílio de uma alça de vidro procedeu-se o espalhamento de um mililitro de suspensão fúngica de *A. alternata* (10^4 conídios.mL⁻¹) em meio de cultura BDA, contido em placas de Petri (15 cm x 2 cm). Sequencialmente, discos saturados pelos extratos foram equidistantemente distribuídos de forma circular nas placas, num total de oito amostras por placa. Foram utilizadas três repetições por tratamento. Discos de papel saturados apenas com água destilada estéril foram utilizados como testemunhas sendo inoculados como os demais tratamentos.

As placas foram mantidas a 25°C e fotofase de 12 horas durante 6 dias, sendo observada diariamente a formação ou ausência de zonas inibitórias de crescimento micelial ao redor dos discos de papel.

2.3.4. Controle positivo e negativo de inibição de crescimento micelial de *Alternaria alternata*

Como controle positivo e negativo de inibição de crescimento micelial de *A. alternata* foi utilizado, respectivamente, em todos os experimentos os fungicidas azoxistrobina 50% (Amistar®) nas concentrações de 0,075 g.L⁻¹ e 0,150 g.L⁻¹, e tiofanato metílico 85% (Spring®) nas doses 1 g.L⁻¹ e 2 g.L⁻¹, aplicados nas placas de CCD nos experimentos 2.3.1 e 2.3.2 e na forma de discos de papel de filtros saturados, no experimento 2.3.3.

3. Resultados

3.1. Avaliação de metabólitos pré-formados

Observou-se que todos os genótipos apresentaram o mesmo padrão cromatográfico (figura 1), e inexistência de zonas inibitória de crescimento micelial para todos os materiais avaliados, incluindo em folhas de tangor 'Murcott' (padrão de suscetibilidade) e em folhas de 'Mexerica-do-Rio' (padrão de resistência).

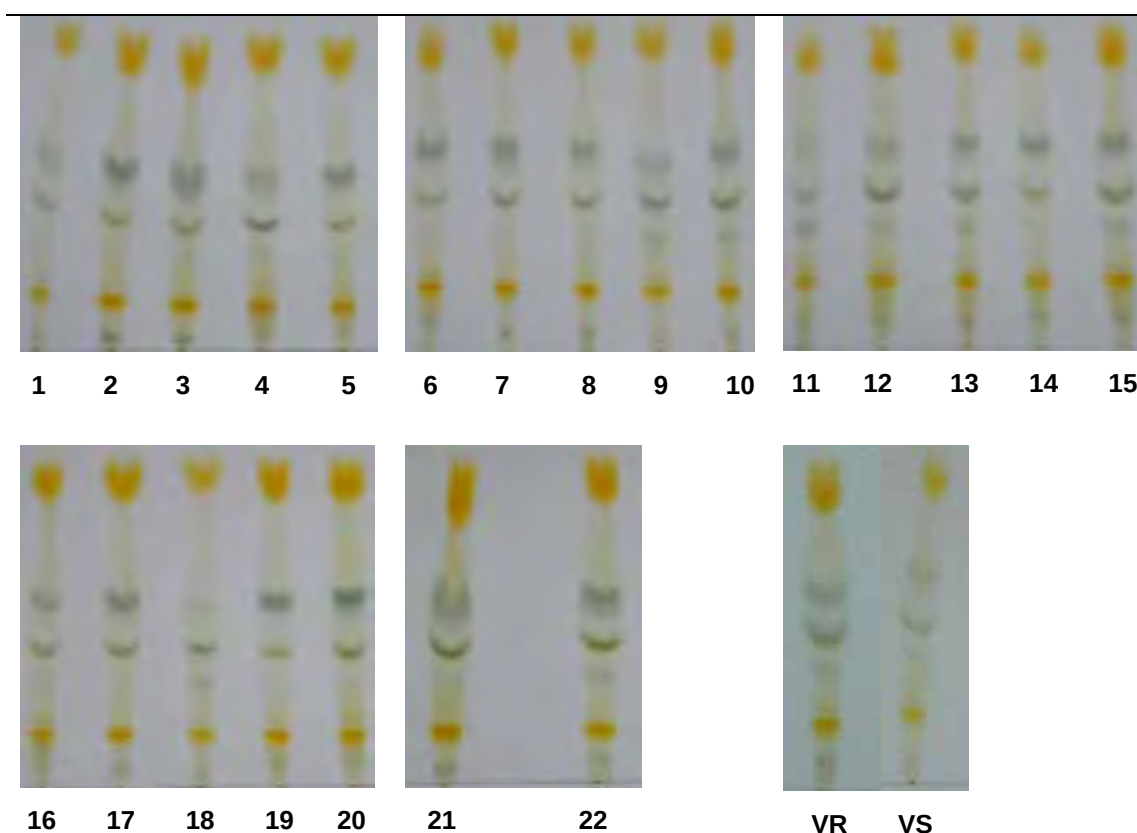


Figura 1 – Padrão cromatográfico dos genótipos avaliados: 1 (Peau Lisse SRA 267), 2 (Zanzibar SRA 442), 3 (Beuty of Glen Retreat SRA 261), 4 (Rode King SRA 431), 5 (Satsuma CN), 6 (Burgues SRA 412), 7 (Fewtrell SRA 418), 8 (Daisy Mandarin), 9 (Encore SRA 190), 10 (Fremont), 11 (Clementina 2 Kr Monreal), 12 (Commune SRA 88), 13 (Caffin SRA 385), 14 (Bruno SRA 531), 15 (Nocatee SRA 452), 16 (EECB 34), 17 (EECB 3), 18 (EECB 30), 19 (EECB 41), 20 (EECB 12), 21 (Temple x Dancy Mandarin), 22 (tangerina Clementina x laranja Tarocco), VR (Mexerica-do-Rio) e VS (tangor 'Murcot').

3.2. Avaliação de metabólitos pós-formados

A partir da análise comparativa das bandas e dos Rf existentes nas placas de CCD não foram verificadas diferenças entre a testemunha e os tratamentos 24 e 48 horas para 'Mexerica-do-Rio' e para o tangor 'Murcot'(Figura 2 e 3), respectivamente, indicando a não formação de metabólitos antifúngicos pós-formados em relação a *A. alternata*.

Quando avaliado o crescimento micelial sobre as placas de CCD não foi verificada nenhuma zona inibitória de crescimento para as duas variedades nos dois tratamentos, e nem nas testemunhas.

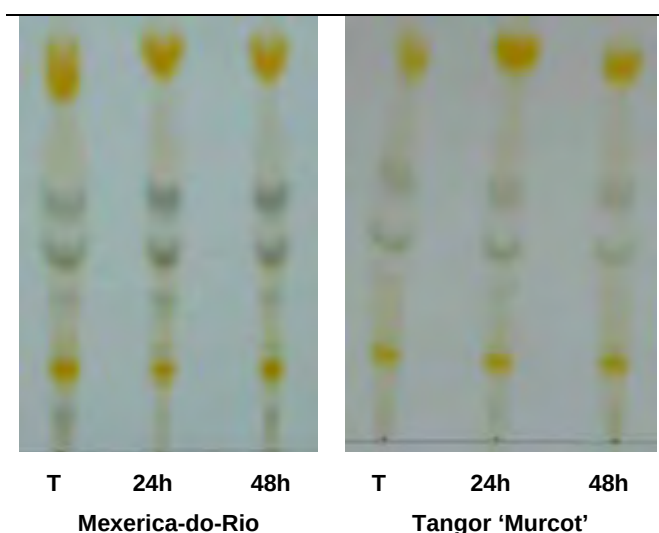


Figura 2 – Padrão cromatográfico de Mexerica-do-Rio e tangor 'Murcot': T (sem inoculação de *Alternaria alternata*), 24 e 48 horas após inoculação de *Alternaria alternata*.

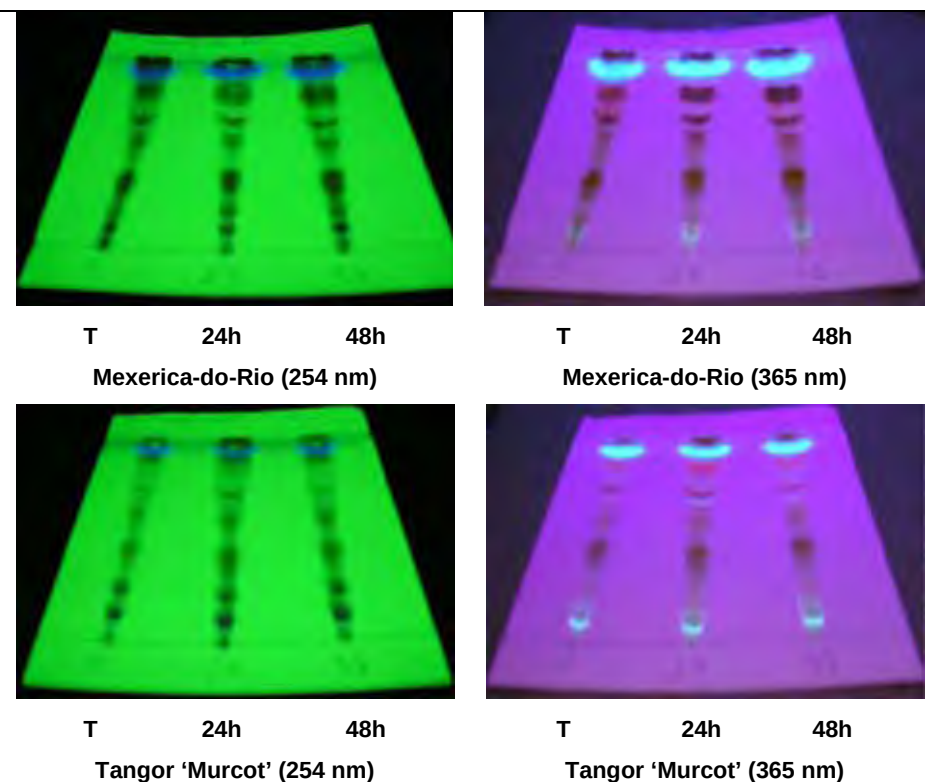


Figura 3 – Padrão cromatográfico de Mexerica-do-Rio e tangor 'Murcot': T (sem inoculação de *Alternaria alternata*), 24 e 48 horas após inoculação de *Alternaria alternata*, reveladas em luz UV nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm

3.3. Influência dos extratos hexânicos sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata*

Assim como apresentado nos itens 3.1 e 3.2 não foi observado nenhum sinal de inibição no crescimento micelial de *A. alternata* pela utilização dos extratos hexânicos a base folhas maduras de tangerinas e híbridos.

3.4. Controle positivo e negativo de inibição de crescimento micelial de *Alternaria alternata*

Em todos os experimentos foram observadas zonas de inibição de crescimento micelial nos tratamentos a base do fungicida Amistar®. Para o fungicida Spring® não foi verificado inibição micelial em nenhuma das doses utilizadas.

4. Discussão

Segundo VANETTEN et al. (1994), há dificuldade em se elucidar o papel dos compostos pré-formados (fitoanticipinas) na resistência a doenças. Dentre as dificuldades apontadas pelos autores inclui-se a ausência de relação entre concentrações de compostos inibitórios e a magnitude das alterações ocorridas no transcorrer da formação dos sintomas.

Diversos estudos (AFEK & SZTEJNBERG, 1988, 1993; AFEK et al., 1986; ARIMOTO et al., 1986; ARIMOTO & HOMMA, 1988; DE LANGE et al., 1976; KHAN et al., 1985; STANGE et al., 1993; SULISTYOWATI et al., 1990; VERNENGHI et al., 1987, KIM et al., 1991) demonstraram relação entre formação de fitoalexinas (xantiletina, seselina e escoparone), quando das infecções por agentes patogênicos, e a resistência aos mesmos em frutos de limão, laranja e tangerina. Entretanto, há casos em que nem sempre as respostas mostram-se convergentes. Por exemplo, BAUDOIN & ECKERT (1985), em seus estudos não encontraram relação entre a formação de fitoalexinas em frutos de limão quando inoculados com *Geotrichum candidum*. De acordo com esses autores, foi, porém, verificado aumento de lignificação, agindo assim como barreira à colonização do fungo.

Nos citros já foram descritos aproximadamente 50 tipos de óleos essenciais, predominando entre eles, em termos de quantidade destaca-se o limoneno, mirceno, geranial e citronela (ALONZO, et al., 2000; CHOI et al., 2000; CHUTIA et al., 2009). Dada à essa condição e, em razão do processo de secagem e extração o qual o material vegetal foi submetido é possível que tais óleos possam ter perdidos, como já verificado por VENKATESHWARLU & SELVARAJ (2000) e NJOROGUE et al. (2006).

Segundo a literatura, uma das funções biológicas dos óleos essenciais está relacionada à defesa contra fungos e bactérias. Comprovação científica dessas propriedades já foram realizadas a partir da sua obtenção a partir de plantas de diversas famílias botânicas, incluindo Rutaceae, Myrtaceae e Myricaceae, os quais exibiram atividade fungicida (CARLTON et al., 1992; BARATTA et al., 1998; SOUZA et al., 2005; VIUDA-MARTOS et al., 2008). Essa atividade foi demonstrada em fungos dos gêneros *Guignardia* spp. (BRODRICK, 1971), *Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp. (DUBEY & MISHRA, 1993), *Alternaria* spp. (FENG & ZHENG, 2007; CHUTIA et al., 2009).

No caso de outras espécies de plantas igualmente suscetíveis a *A. alternata*, como por exemplo, o tomateiro (AKHTAR et al., 1994), FENG & ZHENG (2007) mediante utilização de cinco óleos essenciais obtidos de plantas de diferentes espécies botânicas, e testados em uma linhagem de *A. alternata* infectante de tomate, foi observado *in vitro* e *in vivo* a possibilidade da utilização desses compostos como fungicidas biológicos. A viabilidade da exploração do uso de óleos essenciais como agentes antifúngicos, antimicrobianos, antioxidantes e no controle biológico de fungos foi também ressaltada por vários outros pesquisadores (SACCHETTI et al., 2005; SOKOVIC & GRIENSVEN, 2006; CHUTIA et al., 2006; SOKOVIC & GRIENSVEN, 2006).

A constituição dos óleos essenciais é influenciada pela origem, variedade, práticas culturais e principalmente do estágio fenológico das plantas (VENKATESHWARLU & SELVARAJ, 2000; NJOROGE et al., 2006). No caso particular das plantas cítricas, durante o processo de maturação das folhas ocorre acentuada elevação no acúmulo dos óleos essenciais pelo aumento na relação glândulas de óleos/unidade foliar, tornando as folhas resistentes quando atingem sua maturidade, e tornando os frutos menos suscetíveis após o estágio de maturação, no qual, as glândulas de óleo tornam-se proeminentes (PEGG, 1966; WHITESIDE, 1976). Esse fato, e considerando o potencial de eficiência dos óleos essenciais no controle de vários fungos, permite pressupor que a redução da suscetibilidade das folhas de tangor 'Murcott', quando já amadurecidas, deve-se à maior concentração de óleos essenciais.

Entretanto, não se pode subestimar a possibilidade de que a redução da suscetibilidade tenha decorrido da maior lignificação e resistência física dos tecidos, refletindo em defesa estrutural.

KUATE et al. (2006) observaram que óleos essenciais de *C. limon* e de *C. aurantifolia*, cujas folhas e frutos são tolerantes a *Phaeoramularia angolensis*, inibiram fortemente o crescimento desse fungo, quando comparado às espécies cítricas suscetíveis como *C. paradisi* e *C. sinensis*. Em estudo adicional CHUTIA et al. (2009) observaram mediante o emprego de óleos essenciais de *C. reticulata* redução de 84% a 100% no crescimento de colônias de *A. alternata*, além de significativa redução na produção de conídios. Segundo esses autores tais óleos inibiram também o crescimento de colônias de *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* e *Helminthosporium oryzae*.

A atividade antimicrobiana promovida pelos óleos essenciais geralmente está associada a componentes fitoquímicos (MATASYOH et al., 2007), os quais difundem-se pela membrana celular gerando lise celular do patógeno, como demonstrado por SOKOVIC & GRIENSVEN (2006) ao avaliar o efeito de limoneno e α -pineno sobre *Verticillium fungicola* e *Trichoderma harzianum*.

No presente estudo a ausência da formação de novas bandas cromatográficas após 24h e 48h da inoculação de *A. alternata* e a ausência de zonas inibitórias do crescimento das colônias de *A. alternata* em placas de CCD contendo meio de cultura, sugere que a resistência encontrada em folhas maduras de tangerinas, tanto para as variedades resistentes quanto para as variedades suscetíveis, não está relacionada a vias metabólicas produtoras de fitoalexinas. É possível, todavia, que a ausência de expressão de sintomas nas folhas inoculadas com *A. alternata* se decorreu do amadurecimento foliar, com reflexos na lignificação dos tecidos, e provável incremento na concentração de óleos essenciais nas espécies cítricas suscetíveis a *A. alternata*, como igualmente evidenciado em estudos anteriores de outros autores. No caso da lignificação, resultados semelhantes foram obtidos por BAUDOIN & ECKERT (1985) em experimento envolvendo a interação limão-*Geotrichum candidum*. Entretanto, tornam-se imprescindíveis, estudos complementares quanto à interação *Citrus-A. alternata*

visando a mensuração do efeito dos óleos essenciais e dos mecanismos estruturais na expressão dos sintomas oriundos de infecções causadas pelo patógeno.

CAPÍTULO 4 - Reação de genótipos de tangerina a *Elsinoe fawcettii* sob condições de infecção natural

RESUMO - A verrugose dos citros, causada por *Elsinoe fawcettii*, encontra-se presente em todas as áreas citrícolas do Brasil, onde, sob certas circunstâncias ambientais pode depreciar significativamente a comercialização de frutos voltados para o comércio *in natura*. Dessa forma, dada a importância do agente causal, foi avaliado sob condições naturais de infecção, o comportamento de acessos de tangerinas e híbridos pertencentes ao Banco de Germoplasma da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (Bebedouro - SP, Brasil) a esse patógeno. Foram empregados plantas de 15 anos de idade, localizadas em pomar não irrigado. Para tal, no período foram coletados 100 frutos de 3 plantas na fase de colheita dos frutos e, mediante o emprego de escala de notas que variaram de 0 (ausência de sintomas) a 6 (sintomas severos), procedeu-se a avaliação do nível de severidade da doença. Dentre as espécies e/ou híbridos que mostraram-se resistentes incluem-se *C. deliciosa* Ten., *C. tangerina* Hort. ex Tan., *C. nobilis* Lour.; um híbrido de mandarina (*C. nobilis* x *C. deliciosa*) e um híbrido de satsuma (*C. unshiu* Marc. x *C. sinensis* Ten.). Nos demais genótipos foram encontrados sintomas, cujos níveis de severidade variaram de 1 a 3, enquadrando-se como de moderada resistência.

Palavras chave: verrugose, citros, variedades resistentes

1. Introdução

O patógeno *Elsinoe fawcettii* causa uma das principais doenças fúngicas dos citros, nas diversas áreas produtoras em todo o mundo. Esse patógeno causa sintomas em folhas, frutos e brotações de muitas espécies cítricas suscetíveis (TIMMER et al., 1996; HYUM et al., 2007; GOES & REIS, 2009).

Dependendo do patotipo envolvido, esta doença pode afetar espécies cítricas de valor comercial como laranjas (*C. sinensis*), limões (*C. limon*), 'grapefruit' (*C. paradisi*), muitas tangerinas e mandarinas (*C. reticulata*), satsumas (*C. unshiu*), clementinas (*C. Clementina*), e seus híbridos, e espécies utilizadas como porta-enxertos, como laranja azeda (*C. aurantium*), limão rugoso (*C. jambhiri*) e tangernina cleópatra (*C. reshni*) (HYUM et al., 2009)

No Brasil, *E. fawcettii* é responsável pela verrugose, e sua importância destaca-se principalmente para tangerinas, tangores e limões nos casos em que os frutos destinam-se ao consumo *in natura*, já que frutos sintomáticos tornam-se impróprios para comercialização visando o mercado externo e, no caso do mercado interno, seu valor econômico torna-se significativamente depreciado (FEICHTENBERGER et al., 1986; HYUN et al., 2001). Quando ainda jovens, sob infecções severas os frutos podem ter queda significativa (BURN, 1971). Além disso, as rugosidades na casca dos frutos, resultantes da doença, também se refletem em dificuldade no controle de algumas pragas de importância econômica, com destaque para o ácaro da leprose dos citros (*Brevipalpus phoenicis*), já que estas contribuem para esconderijo dos mesmos, reduzindo sua exposição aos acaricidas e aos inimigos naturais (RODRIGUES et al., 2003).

As lesões foliares são irregularmente discóides a subglobosas, confluentes, principalmente ao longo das nervuras principais, cor de mel ou canela, papiladas, verrugosas, profundamente fendidas e rachadas quando velhas, maiores que 1 mm de diâmetro. Frutas e brotos jovens podem desenvolver sintomas semelhantes. Tecidos infectados podem mostrar distorção e pode ocorrer abscisão de folhas e partes de

folhas, assim como dos frutos doentes (SIVANESAN & CRITCHETT, 1974; WANG et al., 2009).

O controle do patógeno baseia-se no uso de fungicidas (FEICHTENBERGER et al., 1986; BETTIOL et al, 1994; MONDAL et al, 2007), e dentre eles destacam-se os cúpricos. As pulverizações devem ser realizadas na fase de queda de $\frac{3}{4}$ de pétalas, da florada principal, seguida de uma aplicação adicional quatro semanas após a primeira (CATI, 1991). Medidas de controle alternativos têm também sido avaliados, com resultados promissores (COSTA & KUPPER, 2006). Outra alternativa consiste no emprego de variedades resistentes, destacando-se por ser o mais barato e de mais fácil utilização (CAMARGO & BERGAMIN FILHO, 1995).

FALING et al.(2009) cita o tangor 'Kiyomi', híbrido proveniente do cruzamento entre mandarina e laranja, como resistente ao cancro cítrico e a verrugose, AIJUM (2009) apresenta a cultivar 'Cuipijingan' (*Fortunella japonica*) como resistente ao cancro cítrico e a verrugose, e tolerante a tristeza dos citros (*Citrus tristeza vírus*) e YOSHIDA et al. (2003) apresenta a cultivar 'Puchimaru' (*Fortunella* sp.), cruzamento entre 'Naga Kinkan' e o tetraplóide 'Ninpou Kinkan', como resistente ao cancro cítrico e moderadamente resistente a verrugose.

Dentre os hospedeiros suscetíveis a *E. fawcettii* incluem-se diferentes espécies de limões e laranja azeda (DEDE & VARMA, 1987; (LARANJEIRA et al, 2005), pomelo, algumas variedades de mandarinas, tangerinas 'King', 'Satsuma' e 'Cravo', *Poncirus trifoliata*, calamondim (*Citrus mitis*) e lima-de-caffir (*Citrus hystrix*). Já os kumquats (*Fortunella* spp.), sendo que a maioria das variedades de laranjas doce e limas são geralmente mais resistentes, embora exemplos de infecção nestes hospedeiros sejam conhecidos (BITANCOURT & JENKINS, 1937; JOTANI, 1957; BURN, 1971).

O presente trabalho objetivou avaliar o comportamento de genótipos de tangerinas de potencial agrônômico a infecções de *E. fawcettii*, sob condições naturais de infecção.

2. Materiais e Métodos

2.1. Genótipos avaliados

Para a classificação botânica dos genótipos empregados adotaram-se os critérios descritos por HODGSON (1967) e ORTIZ MARCIDE (1986). Tais genótipos correspondem a parte da coleção de espécies cítricas do Banco de Germoplasmas da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB), Bebedouro-SP, Brasil. Nessa área experimental, dado aos antecedentes da doença em anos anteriores, tornou-se dispensável a realização da inoculação do patógeno. Entretanto, para garantir um nível de inóculo adequado não foi realizada pulverização com fungicidas nas fases críticas de suscetibilidade de folhas e frutos, dois anos antes da implantação do experimento. As demais práticas culturais foram realizadas em conformidade às adotadas nos pomares comerciais.

Previamente à realização das avaliações quanto ao comportamento dos genótipos a *E. fawcettii*, no ano anterior foi realizada avaliação e seleção dos mesmos quanto ao seu potencial agrônomo. Para tal foram realizadas avaliações fenotípicas como aparência, coloração e facilidade para descascamento, assim como a resistência e suscetibilidade a *A. alternata*, empregando-se testes em folhas destacadas e frutos jovens. Os genótipos avaliados encontram-se apresentados na Tabela 1.

2.2. Avaliações de resistência e suscetibilidade

Nos meses de abril e maio de 2008, quando do início da maturação, foram coletados entre 100 e 150 frutos por genótipo, sendo utilizado de duas a três plantas por genótipo, dependendo da disponibilidade de plantas no banco de germoplasma da EECB, totalizando 300 frutos por genótipo. Para tal, os frutos foram coletados nos quatro quadrantes das plantas.

Na avaliação foi utilizada escala de notas, sendo: 0 – ausência de sintomas, 1 – 0,5; 2 – 2,5; 3 – 6,0; 4 – 12,5; 5 – 25; e 6 – 50 % da área infectada

(FEICHTENBERGER et al.,1986). Plantas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* L. Osbeck) foram utilizadas como padrão por sua alta suscetibilidade a *E. fawcettii*.

3. Resultados e Discussão

Dentre os genótipos resistentes incluíram-se cinco mandarinas, sendo uma correspondente a *C. reticulata*, uma *C. deliciosa*, duas a *C. tangerina*, uma *C. nobilis*, uma mandarina (híbrido) resultante do cruzamento *C. nobilis* x *C. deliciosa* e uma satsuma (híbrido) resultante do cruzamento entre *C. unshiu* x *C. deliciosa* (Tabela 1). Para os demais genótipos os níveis de infecções situaram-se entre as notas 1 a 3, comportando-se, portanto, como moderadamente resistente, não ocorrendo nenhuma cultivar altamente suscetível em relação ao padrão de suscetibilidade.

Tabela 1 – Relação de genótipos amostrados quanto à resistência e/ou suscetibilidade a infecções causadas por *Elsinoe fawcettii*, sob condições de infecção natural. Bebedouro-SP, 2008.

Variedades/híbridos	Infecção natural de frutos
Clementinas	
(<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan.)	
Clementina 2 Kr Monreal	1
Commune SRA-88	0
Caffin SRA-385	0
Bruno SRA-531	0
Mandarinas	
(<i>C. reticulata</i> Blanco)	
Mand. Burgess SRA 412	0
Fewtrell SRA-418	2
Daisy Mandarin	3
(<i>C. deliciosa</i> Ten.)	
Peau Lisse SRA 267	0

Continuação

(<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.)	
Zanzibar SRA 442	0
Beuty Of Glen Retreat SRA 261	0
(<i>C. nobilis</i> Lour.)	
Rode king SRA 431	0
Satsumas	
(<i>C. unshiu</i> Marc.)	
Satsuma CN (clone nucelar)	1
Tangelos	
(<i>C. tangerina</i> x <i>C. paradisi</i> Macf.)	
Nocatee SRA-452	1
Mandarinas (híbridos)	
(<i>C. nobilis</i> x <i>C. deliciosa</i>)	
Encore SRA 190	0
(<i>C. clementina</i> x <i>C. reticulata</i>)	
Fremont	3
Tangor (híbridos)	
(<i>C. temple</i> Hort. ex. Y. Tan. x <i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.)	
Temple x Dancy Mandarin	1
(<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan. x <i>C. sinensis</i> (L.) Osb.)	
tangerina Clementina x laranja Tarocco	1
Satsuma (híbridos)	
(<i>C. unshiu</i> Marc. x (<i>C. reticulata</i> Bla. x <i>C. sinensis</i> Osb.))	
Satsuma x Murcote (EECB 34)	1
Satsuma x Murcote 4 (EECB 3)	1
(<i>C. unshiu</i> Marc. x <i>C. sinensis</i> Ten.)	
Satsuma x Natal (EECB 30)	0
Satsuma x Natal (EECB 41)	1
Satsuma x Natal 3 (EECB 12)	1
limão 'Cravo' (<i>Citrus limonia</i> (L.) Osbeck – padrão de suscetibilidade	

No presente estudo foram observadas variações nos níveis de severidade de doença, mesmo em frutos de uma mesma espécie, como verificado no caso das clementinas (*C. clementina*), mandarinas (*C. reticulata*) e satsumas (híbridos) (*C. unshiu* x *C. sinensis*). Entretanto, para o caso das espécies cujos frutos foram classificados como moderadamente resistentes, em nenhuma situação foi verificada a ausência de frutos sintomáticos, o que demonstra a boa distribuição do inóculo dentre as plantas. Variações quanto aos níveis de severidade foram também observados por outros investigadores em estudos envolvendo o patossistema *Citrus-E. fawcettii* (INQUE et al., 1985). Em experimento semelhante, REDDY et al. (1986), objetivando seleções de limão Rugoso resistentes a *E. fawcettii*, também observaram reações que variaram desde imune a altamente suscetíveis. Dentre as seleções consideradas imunes encontraram-se 'Shomyndong', 'Milan', 'Khattazamir', 'Brazilian Rough lemon' e 'Chase Rough lemon'.

Estudos objetivando seleções de tangerinas e espécies correlatas resistentes a *E. fawcettii* têm sido realizados em diferentes partes do mundo. Nesse contexto, MATSUMOTO et al. (2003a) verificaram que o tangor 'Nishinokaori', proveniente do cruzamento entre o tangor 'Kiyomi' e laranja 'Trovita' mostrou-se resistente ao patógeno. No presente estudo, com exceção da mandarina Burgess SRA 412, todos os demais genótipos pertencentes ou oriundos de cruzamentos com *C. reticulata* apresentaram de média a baixa resistência ao fungo.

Os resultados quanto à resistência verificada na mandarina Burgess SRA 412, obtida em apenas uma das cultivares classificadas como *C. reticulata*, ainda que seja altamente ambicioso, merece estudos mais detalhados em relação aos mecanismos de resistência e suscetibilidade existentes em *C. reticulata*. BITANCOURT (1935), por exemplo, constatou que outras tangerinas de ancestrais comuns, como a tangerina 'Cravo', mostrou-se suscetível a *E. fawcettii* e também a *E. australis*, divergindo, portanto, dos resultados ora obtidos.

O híbrido de mandarina Encore SRA 190 (*C. nobilis* x *C. deliciosa*) mostrou-se resistente a *E. fawcettii*, assim como a cultivar 'Setoka' (*C. sinensis* x *C. reticulata*) proveniente do cruzamento entre Kuchinotsu nº 37 (Kiyomi x Encore nº 2) e tangor

Murcott, a qual é resistente a verrugose (*E. fawcettii*) e à bactéria do cancro cítrico ((*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse), (MATSUMOTO et al., 2003b). Desta forma, pelos antecedentes apresentados verifica-se que a resistência observada na mandarina Encore SRA deve-se a genes existentes, mostrando-se, assim, seu potencial para estudos em programas de melhoramento visando o controle desse patógeno.

A viabilidade do screening de material genético de citros resistentes a patógenos foi inicialmente demonstrado por FAWCETT (1921), mediante inoculação de plântulas e folhas destacadas de laranjeira azeda. Por apresentar resultados semelhantes, os resultados indicaram a possibilidade da utilização de folhas destacadas como critério de seleção nos testes de patogenicidade, acelerando o processo de identificação e seleção de novas variedades resistentes ou pouco suscetíveis à *E. fawcettii*.

Os genótipos Commune, Caffin, Bruno, Burgess, Peau Lisse, Zanzibar, Beuty of Glen Retreat, Rode King e Encore (Figura 1), além das boas características agronômicas demonstradas, mostraram-se resistentes a *E. fawcettii* e, de acordo com SOUZA et al. (2009), também resistentes a *A. alternata*, apresentando assim grande possibilidades para quanto sua exploração econômica.



Figura 1 – Genótipos de tangerina resistente a Mancha Marrom de *Alternaria* e Verrugose. Bebedouro-SP. 2008.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, G.; COUMANS, M.; VILLEMUR, P.; JONARD, R. Intergeneric hybridization between *Poncirus trifoliata* and *Citrus meyeri* or *Tangelo nova*: determination by electrophoresis of zygotic or nucellar embryos from the cross *P. trifoliata* x *Tangelo nova*. **Fruits**, Paris, v.45, n.6, p.591-597, 1979.

AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Accumulation of scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, v. 78, p. 1678-1682, 1988.

AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. Temperature and gamma irradiation effects on scoparone, a citrus phytoalexin conferring resistance to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology**, v. 83, n. 7, p. 753-758, 1993.

AFEK, U.; SZTEJNBERG, A.; CARMELY, S. 6,7-dimethoxycoumarin, a citrus phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora gummosis*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1855-1856, 1986.

AGRIANUAL 2009: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2007, p. 278-300.

AIJUN, C. 2009. The biological characteristics of citrus cultivar Cuipijingan. South China Fruits, Guangxi, China. Disponível em: <<http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=20043202703>>. Acesso em: 10 de agosto de 2009.

AKHTAR, K.P.; MATIN, M.; MIRZA, J.H.; SHAKIR, A.S.; RAFIQUE, M. Some studies on the post harvest diseases of tomato fruits and their chemical control. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 6, p. 125–129, 1994.

ALEF, K. Enrichment, isolation and counting of soil microorganisms. In: ALEF, K; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995, cap. 4, p. 123-191.

AMARO, A.A.; MAIA, M.L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 18, n. 1, p. 1-26, 1997.

ANDRADE-RODRÍGUEZ, M.; VILLEGAS-MONTER, A.; CARRILLO-CASTAÑEDA, G.; GARCÍA-VELÁZQUEZ, A. Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.551-559, 2004.

ARIMOTO, Y.; HOMMA, Y. Studies on citrus melanose and citrus stem-end rot by *Diaporthe citri* (Faw.) Wolf. Part 9. Effect of light and temperature on the self-defense reaction of citrus plants. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.**, v. 54, p. 282-289, 1988.

ARIMOTO, Y.; HOMMA, Y.; MISATO, T. Studies on citrus melanose and citrus stem-end by *Diaporthe citri* (Faw.) Wolf. Part 4. Antifungal substance in melanose spot. **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.**, v. 52, p. 39-46, 1986.

BALLVE, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.M.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.T.; POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. **Bragantia**, Campinas, v.50, n.1, p.57-76, 1991.

BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 235-244, 1998.

BARZ, W.; KÖSTER, J.; WELTRING, K.M.; STRACK, D. Recent advances in the metabolism and degradation of phenolic compounds in plants and animals. In: The biochemistry of plant phenolics. **Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 25, p. 307-347, 1985.

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A.C.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott' avaliada por fAFLP e RAPD. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 779-784, 2006.

BASTIANEL, M.; SCHWARZ, S.F.; COLETTA FILHO, H.D.; LIN, L.L.; MACHADO, M.; KOLLER, O.C. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.123-127, 1998.

BAUDOIN, A.B.A.M.; ECKERT, J.W. Development of resistance against *Geotrichum candidum* in lemon peel injuries. **Phytopathology**, v. 75, p. 174-179, 1985.

BELLA, P.; GUARINO, C.R.; CATARA, A. Severe infections of *Alternaria* spp. on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 83, p. 231, 2001.

BERNAL, R.P. Occurrence of citrus scab strains resistant to benzimidazoles in the northern part of Uruguay and the evaluation of new fungicides to control this disease. In: IX International Congress of Citriculture, **Proceedings...**, Orlando, p.984-986, 2000.

BETTIOL, W; de MORAES, G.J.; STEULLA JR., C.S.; NICOLINO, C.; GALVÃO, J.A.H. Controle de verrugose, melanose e leprose em laranja pera, com fungicidas e acaricida em mistura com adubo foliar, **Sci. Agric.**, Piracicaba, v. 51, n. 3, p. 494-499, 1994.

BITANCOURT, A.A. A história da verrugose. **O Biológico**. São Paulo, v. 1, n. 11, p. 391-397, 1935.

BITANCOURT, A.A.; JENKINS, A.E. Sweet orange fruits scab caused by *Elsinoe australis*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 54, n. 1, p. 1-18, 1937.

BORGES, R.S. & PIO, R.M. Comparative study of the mandarin hybrid fruit characteristics: Nova, Murcott and Ortanique in Capão Bonito SP, Brazil. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, 2003.

BROETTO, F. **Efeito de estresse salino e biológico sobre o metabolismo de calos e suspensão de células de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1995. 124 p. Tese (Doutorado em Ciências/ Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BRODRICK, H.T. Toxicity of limonene and citrus peel extracts to *Guignardia citricarpa* Kiely. **Phytophylactica**, v. 3, p. 69-72, 1971.

BURN, J. Lês scab des Agrumes. **Fruits d'outre mer**, v. 26, n. 11, p. 759-767, 1971.

CAMARGO, L.E.A., BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, A., AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. Ed. São Paulo: Ceres, p.729-760, 1995.

CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley : University of California Press, v.2, p.325-370, 1968.

CAMERON, J.W.; SOOST, R.K. Characters of new populations of *Citrus* polyploids, and relation between tetraploidy parent and hybrid tetraploidid progeny. In: INT. CITROS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. V. 1, p. 199-205.

CANIHOS, Y.; ERKILIC, A.; TIMMER, L.W. First reporter of *Alternaria* Brown spot of *Minneola tangelo* in Turkey. **Plant disease**. St. Paul, v. 81, n. 10, p. 1214, 1997.

CANIHOS, Y.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola tangelo* leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, v. 83, p. 429-433, 1999.

CARLTON, R.R.; WATERMAN, P.G.; GRAY, A.; DEANS, S.G. The antifungal activity of the leaf gland volatile oil of sweet gale (*Myrica gale*) (Myricaceae). **Chemoecology**, v. 3, p. 55-59, 1992.

CASTRO-CAICEDO, B.L.; LEGUIZAMON-C., LOPEZ-R, J.A. La mancha foliar de los cítricos em la zona cafetera. **Avances Técnicos Cenicafé**, Chinchiná, n. 198, p.26, 1994.

CHAGAS, E.A.; CAZETTA, J.O.; LEMOS, E.G.M.; PASQUAL, M.; GOES, A.; RAMOS, J.D.; PIO, R.; BARBOSA, W.; MENDONÇA, V.; AMBROSIO, L.A. Identificação de híbridos de citros resistentes à mancha-marrom-de-alternaria por meio de fAFLP e testes de patogenicidade. **Pesq. agropec. bras.**, v.42, p. 975-983, 2007.

CHOI, H.; SONG, H.S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **J. Agric. Food Chem.** V. 48, p. 4156-4161, 2000.

COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. **Recomendações para o controle das principais pragas e doenças em pomares do estado de São Paulo 1990/1991**. (CATI, Boletim Técnico, 165). Campinas, 55 p., 1994.

COSTA, F. P.; KUPPER, K. C. Interações *in vitro* entre *Bacillus* spp. e *Elsinoe fawcetti*, agente causal da verrugose. In: 19a REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo , v. 73, 2006.

CRISTOFANI, M. **Adaptação de metodologias de cultura de tecidos visando ao melhoramento através de mutações em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra**. 1991. 185f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

CHUTIA, M.; BHUYAN, P.D.; PATHAK, M.G.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 777–780, 2009.

CHUTIA, M.; MAHANTA, J.J.; SAIKIA, R.C.; BARUAH, AK. S.; SARMA, T.C. Influence of leaf blight disease on yield of oil and its constituents of *Java citronella* and *in vitro* control of the pathogen using essential oils. **World Journal of Agriculture Science**, v. 2, n. 3, p. 319–321, 2006.

DE LANGE, J.H.; VINCENT, A.P.; DU PLESSIS, L.M.; VAN WYK, P.J.; ACKERMAN, L.G.J. Scoparone (6,7 dimetoxycoumarin) induced in citrus peel by black spot, *Guignardia citricarpa* Kiely. **Phytophylactica**, v. 8, p. 83-84, 1976.

DEDE, A.P.O; VARMA, A. Citrus scab disease in Nigéria. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 62, n. 1, p. 111-116, 1987.

DOMINGUES, E. T.; SOUZA, V. C.; SAKURAGUI, C. M.; POMPEU JUNIOR, J.; PIO, R. M.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; SOUZA, J. P. Caracterização morfológica de tangerinas do banco ativo de germoplasma de citros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 197-206, 1999.

DONADIO, L.C; STUCHI, E.S.; CYRILLO, F.L.L. Tangerinas ou mandarinas. **Boletim citrícola UNESP/FUNEP/EECB**, 1998, 40p.

DUBEY, N.K.; MISHRA, A.K. Evaluation of some essentials oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1101-1105, 1993.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: APS Press, 562 p., 1996.

FALING, W.; JIANGUO, X.; PUZHI, K. **The biological characteristics of Kiyomi tangor citrus cultivar and its utilization in citrus breeding**. South China Fruits, Zhejiang, China. Disponível em: <<http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=20043202723>>. Acesso em: 10 de julho de 2009.

FAWCETT, H.S. Some relations of temperature to growth and infection in the citrus-scab fungus *Cladosporium citri*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 21, n. 4, p. 243-253, 1921.

FEICHTENBERGER, E.; ESKES, A.B.; PRATES, H.S.; SABATINI, V. Resultados de experimentos recentes sobre o controle de verrugose e melanose dos citros. In: **Laranja – Revista Técnico-científica de Citricultura**, Cordeirópolis, SP, n.7, v.1, p. 173-208, 1986.

FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v. 18, p. 1126–1130, 2007.

FIGUEIREDO, J. O. Variedades copa de sabor comercial. In: _____. **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargil, 1991. p. 228-264.

FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley : University of California Press, 1968. v.2, p.290-324, 1968.

FURR, J.R. New tangerines for the desert. **California Citograph**, v. 49, p. 266-276, 1964.

GOES, A.; MONTES de OCA, A.G.; REIS, R.F. Ocorrência de la mancha de *Alternaria* em mandarina “Dancy” em el estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, supl., p. 386, 2001.

GOES, A., REIS, R.F. Caracterização e controle de doenças das tangerineiras. In: KOLLER, O.C. **Citricultura – cultura de tangerineiras, tecnologia de produção, pós colheita e industrialização**, p. 251-254, 2009.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR., F. G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germoplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, v. 25, p. 147-151, 1990.

GUO, W.W.; CHENG, Y.J.; DENG, X.X. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.829-834, 2002.

HERRERA, L. La mancha parda de los cítricos en Cuba. **Levante Agrícola**, Valência, v. 31, n. 229, p. 49-50, 1992.

HODGSON, R.W. Horticultural varieties of citrus. In: Walter, R., Leon, D.B., Herbert, J.W. (Eds.), **The Citrus Industry History**, World distribution, Botany, Varieties. Riverside, p. 431–591, 1967.

HYUN, J. W., PERES, N. A., YI, S.-Y., TIMMER, L. W., KIM, K. S., KWON, H.-M., LIM, H.-C. HYUN, J. W. et al. Development of PCR assays for the identification of species and pathotypes of *Elsinoë* causing scab on citrus. **Plant Disease**. v. 91, p. 865-870, 2007.

HYUN, J. W., YI, S. H., MACKENZIE, S. J., TIMMER, L. W., KIM, K. S., KANG, S. K., KWON, H. M., LIM, H. C. Pathotypes and genetic relationship of worldwide collections of *Elsinoë* spp. causing scab diseases of citrus. **Phytopathology**, v. 99, p. 721-728, 2009.

HYUN, J.-W., TIMMER, L.W., LEE, S.C., YUN, S.H., KO, S.W., KIM, K.S., Pathological characterization and molecular analysis of *Elsinoe* isolates causing scab diseases of citrus in Jeju Island in Korea. **Plant Disease**. v. 85, p. 1013–1017, 2001.

INQUE, K.; IGUCHI, I.; HARA, S.; TAKEDA, Y. Resistance of citrus nucellar seedlings of citrus crosses to scab (*Elsinoe fawcettii* Bitanc. E Jenkins). **Bulletin of the Shizuoka Prefectural Citrus Experiment Station**, Shimizu-shi, v. 21, p. 27-33, 1985.

JOHANN, S.; OLIVEIRA, V.L.; PIZZOLATTI, M.G.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; BRANCO, A.; SMÂNIA JR, A. Antimicrobial activity of wax hexane extracts from *Citrus* spp. Peels. **Mem. Ist. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 681-685, 2007.

JOTANI, Y. On the scab of the 'Kindzu' or 'Golden bean' orange plant. **Journal of Japanese Botany**., v. 32, n. 3, p. 92-95, 1957.

KHAN, A. J.; KUNESCH, G.; CHUILON, S.; RAVISE, A. Structure and biological activity of xanthyletin, a new phytoalexin of citrus. **Fruits**, v. 40, p. 807-811, 1985.

KIELY, T.B. Brown spot of Emperor mandarin. **Agricultural Gazette of new South Wales**, Sidney, v. 75, n. 2, p. 854-856, 1964.

KIM, J.J.; BEN-YEHOSHUA, S.; SHAPIRO, B.; HENIS, Y.; CARMELI, S. Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. **Plant Physiol.**, v. 97, p. 880-885, 1991.

KOHMOTO, K.; AKIMITSU, K.; OTANI, H. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 7, p. 719-722, 1991.

KOHMOTO, K.; ITOH, Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S.; NAKATSUKA, S. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 495-502, 1993.

KOHMOTO, K.; SCHEFFER, R.P.; WHITESIDE, J.O. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 6, p. 667-671, 1979.

KUATE, J.; FOKO, J.; NDINDENG, S.A.; DONGMO, P.M.J.; FOURE, E.; DAMESSE, F.; MANGA, B.; DUCELIER, D. Effect of essential oils from citrus varieties on *in vitro* growth and sporulation of *Phaeoramularia angolensis* causing citrus leaf and fruit spot disease. **European Journal of Plant Pathology**, v.114, p. 151–161, 2006.

LARANJEIRA, F.F., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., AGUILAR-VILDOSO, C.I., COLETTA FILHO, H.D.C. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; FUNDAG, p. 223-277, 2005.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S.F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, v.1, p. 393-416, 1995.

MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO H. D. ; TARGON, M. L. P. N.; POMPEU JR., J. Genetics relationship of Mediterranean mandarins (*Citros deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, v.92, p. 326-351, 1996.

MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; POMPEU JUNIOR, J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, v.92, p.321-326, 1995.

MARÍN, J.E.; FERNÁNDEZ, H.S.; PERES, N.A; ANDREW, M.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. First report of Alternaria Brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 5, p. 686, 2006.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2ed. San Diego: Academic Press, 889 p., 1995.

MATASYOH, J.C.; KIPLIMO, J.J.; KARUBIU, N.M.; HAILSTORKS, T.P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphorates*. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1183–1187, 2007.

MATIELLO, R.R.; BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.161-168, 1997.

MATSUMOTO, R., YAMAMOTO, M., KUNIGA, T., OKUDAI, N., YAMADA, Y., TAKAHARA, T., OIYAMA, I., ISHIUCHI, D., MURATA, H., ASADA, K., IKEMIYA, H., SHICHIJO, T., YOSHINAGA, K., UCHIHARA, S., IEKI, H. New citrus cultivar Nishinokaori. **Bulletin of the National Institute of Fruit Tree Science**, v. 2, p. 17-23, 2003a.

MATSUMOTO, R., YAMAMOTO, M., KUNIGA, T., YOSHIOKA, T., MITANI, N., OKUDAI, N., YAMADA, Y., ASADA, K., IKEMIYA, H., YOSHINAGA, K., UCHIHARA, S., OIYAMA, I., MURATA, H. New citrus cultivar Setoka. **Bulletin of the National Institute of Fruit Tree Science**, v. 2, p. 25-31, 2003b.

MONDAL, S.N.; VICENT, A.; REIS, R.F.; TIMMER, L.W. Efficacy of pre-and postinoculation application of fungicides to expanding young citrus leaves for control of melanose, scab, and alternaria brown spot. **Plant Disease**, v. 91, p. 1600-1606, 2007.

MONDAL, S.N.; DA SILVA, A.G.; DEWDNEY, M.M. Resistance to strobilurin fungicides in a population of *Alternaria alternata* causing Alternaria brown spot of citrus. **Phytopathology**, v. 99, n. 6, p. 88, 2009.

MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.S. Citricultura brasileira. 2. ed. Campinas: **Fundação Cargill**, p.116-152, 1991.

MOREIRA, S.; RODRIGUES FILHO, A.J. Espécies e variedades. In: MOREIRA, S.; RODRIGUES FILHO, A.J. **Cultura dos Citrus**: Laranjas, Limões, Tangerinas, Limas, etc. São Paulo: Edições Melhoramentos, p. 9-10, 1967.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 369-89, 1992.

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.1155-1166, 2000.

NISHIMURA, S.; KOHMOTO, K. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. In: GROGAN, R.G.; ZENTMYER, G.A.; COWLING, E.B. **Annual Reviews Phytopathology**, Palo Alto, v. 21, p. 87-116, 1983.

NJOROGE, S.M.; MUNGAL, H.N.; KOAZE, H.; PHI, N.T.L.; SAWAMURA, M. Volatile constituents of mandarin *Citrus reticulata* Blanco peel oil from Burundi. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 659–662, 2006.

OLIVEIRA, A.C. **Clorose variegada dos citros**: quantificação molecular do agente causal, avaliação de trocas gasosas de plantas infectadas e mapeamento de loci de resistência quantitativa de citros à Wells (1997) com fAFLPs. 2003. 281p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MACHADO, M.A. Diversidade genética entre híbridos de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.479-484, 2002.

OLIVEIRA, R.P.; NOVELLI, V.M.; MACHADO, M.A. Frequência de híbridos em cruzamento entre tangerina “Cravo” e laranja “Pêra”: análise de marcadores morfológicos e RAPD. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.35, n.9, p.1895-1903, 2000.

ORTIZ MARCIDE, J.M. Nomenclatura botánica de los cítricos. **Fruits**, v. 41, p. 199–209, 1986.

ORTIZ MARCIDE, J.M., Nomenclatura botánica de los cítricos. *Levante Agrícola* 71, 259–260, 1985.

ORTIZ, J.M.; TADEO, J.L.; FORNER, J.B. Distinction between hybrid and nucellar citrus trees by analysis of their biochemical compounds. **International Society of Citriculture Proceedings**, Riverside, v.1, p.4-7, 1981.

PASCHOLATTI, S.F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, Cap. 22, p. 417-453, 1995.

PAXTON, J.D. Phytoalexins – a working redefinition. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 101, p. 106-109, 1981.

PEEVER, T.L., CANIHOS, Y., OLSEN, L., IBÁÑEZ, A., LIU, Y.C., TIMMER, L.W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola tangelo* and rough lemon in Florida. **Phytopathology** 89, 851–860, 1999.

PEEVER, T.L.; OLSEN, L.; IBÁÑEZ, A.; TIMMER, L.W. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 4, p. 407-414, 2000.

PEGG, K.G. Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal agent of brown spot of Emperor mandarin. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, Brisbane, v. 23, n. 1, p. 15-28, 1966.

PEJIC, L.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.1248-1255, 1998.

PELTIER, G.L.; FREDERICH, W.J. Relation on environmental factors to citrus scab caused by *Cladosporium citri* Massee. **Journal of Agricultural Research**. Washington, v. 28, n. 3, p. 241-254, 1924.

PERES, N.A.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreakers of alternaria brown spot of citrus in Brazil and Argentine. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 6, p. 750, 2003.

PIO, R. M., AZEVEDO, F.A.; DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; CASTRO, J.L. Características da variedade Fremont quando comparadas com as das tangerinas 'Ponkan' e 'Clementina Nules'. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 222-226, 2006.

PIO, R.M. **Estudo de variedades do grupo das tangerinas: caracterização e avaliação dos frutos**. Piracicaba. 1997. 89p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba.

PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSE, S.A.B. Variedades copas. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, .2005, 929 p.

POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo. In: INT. CONG. CITROS NURSERYMEN, 6., 2001. Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto: [s.n.], 2001. P. 75-82.

PURKAYASTHA, R.P. Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: DANIEL, M. & PURKAYASTHA, R.P. (eds) **Handbook of phytoalexin metabolism and action**, p. 1-39, 1994.

REDDY, M.R.S; NAIDU, P.H.; REDDY, G.S. Screening Rough lemon and Rangpur lime strains for resistance to citrus scab. **Current Science**, Bangalore, v. 55, n. 3, p. 152-153, 1986.

REIS, R.F.; ALMEIDA, T.F.; STUCHI, E.S.; GOES, A. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the Alternaria brown spot. **Scientia Horticultrae**, v. 113, p. 336-342, 2007.

REIS, R.F.; GOES, A.; MONDAL, S.M.; TIMMER, L.W. Effectiveness of fungicides and susceptibility of fruit and leaves of tangerines, tangor and tangelos to infection by *Alternaria alternata*, the cause of brown spot. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, supl., p. 11-12, 2006b.

REIS, R.F.; GOES, A.; MONDAL, S.N.; SHILTS, T.; BRENTU, F.C.; TIMMER, L.W. Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. **Plant Disease**, v. 90, p. 1051-1054, 2006a.

REIS, R.F.; RINALDO, D.; COTTAS, M.P.; GOES, A. Effectiveness of fungicide pyraclostrobin applied at different intervals, alone or in combination with mancozeb or copper axychloride, in *Alternaria alternata* control, the causal agent of Alternaria brown spot. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, supl., p. 273, 2006c.

RODRIGUES, J.C.V., KITAJIMA, E.W., CHILDERS, C.C., CHAGAS, C.M. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, p. 161–179, 2003.

ROOSE, M.L.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. The chromosomes of *Citrus* and *Poncirus* species and hybrids identification of characteristic chromosomes and physical mapping of rDNA loci using *in situ* hybridization and fluorochrome banding. **J. Heredity**, v.89, p. 83-86, 1998.

ROSSETTI, V. Doenças dos citros. In: RODRIGUEZ, O. & VIEGAS, F.C.P. Ed. Citricultura Brasileira, Campinas, Fundação Cargill, v. 2, p. 515-563, 1980.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621–632, 2005.

SADOWSKY, A.; KIMCHI, M.; OREN, Y.; SOLEL, Z. Ocurrence and management of *Alternaria* brown spot in Israel. **Phytoparasitica**, Rehavot, v. 30, n. 3, p. 19, 2002.

SAKAMOTO, K.; INOVE, A.; NAKATANI, M.; KOZUKA, H.; OHTA, H.; OSAJIMA, Y. Identification of hybrid and nucellar seedlings at the seedling stage by leaf oil compounds. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, Tokyo, v.71, n.12, p.1279-1282, 1997.

SARTORI, I.A.; RECKZIEGEL, V.P.; KOLLER, O.C.; BENDER, R.J.; SCHWARZ, S.E. Épocas de maturação de tangerinas na Depressão Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.3, n.2, p.171-176, 1997.

SAUNT, J. **Citrus varieties of the world: an illustrated guide**. Norwick: Sinclair International, 2000, 160p.

SCHUTTE, G.C.; LESAR, K.H.; PELSER, P.T.; SWART, S.H. The use of tebuconazole for the control of *Alternaria alternata* on “Minneola” tangelos and its potencial to control postharvest decay when applied as a preharvest spray. In: INTERNATIONAL CITROS CONGRESS, 7, 1992, Acireale: **Proceendings...** Acireale: International Society of Citriculture, 1992, v. 3, p. 1070-1074.

SCHWARZ, S.F. Melhoramento genético e variedades. In: KOLLER, O. C. **Citricultura, cultura de tangerineiras: Tecnologia de produção, pós-colheita e industrialização**. Porto Alegre, p.35-48, 2009.

SIEROTSKI, H.; PARISI, S.; STEINFELD, U.; TANZER, I.; POIREY, S.; GISI, U. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijienses* field isolates. **Pest management Science**, New York, v. 56, n. 10, p. 833-841, 2000.

SIMONE, M.D.; RUSSO, M.P.; PULEO, G.; MARSAN, P.A.; LORENZONI, C.; MAROCCO, A.; RECUPERO, G.R. Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. **Fruits**, v.53, p.383-390, 1998.

SIVANESAN, A.; CRITCHETT, C. *Elsinoe fawcettii*, **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, Kew, p. 438-440, 2p, 1974.

SOARES FILHO, W. S.; VILARINHOS, A.D.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; OLIVEIRA, A.A.R. de; SOUZA, A. da S.; CRUZ, J.L.; MORAIS, L.S.; CASTRO NETO, M.T. de; GUERRA FILHO, M. dos S.; CUNHA, M.A.P. da; PASSOS, O.S.; MEISSNER FILHO, P.E.; OLIVEIRA, R.P. **Citrus breeding program at Embrapa-CNPMF: development of hybrids**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1997. 17p. (Embrapa-CNPMF. Documentos, 74).

SOARES FILHO, W.S.; LEDO, C.A.S.; PASSOS, O.S.; SOUZA, A.S.; MATTOS, L.A.; QUINTELA, M.P. Parentais femininos monoembriônicos na obtenção de porta-enxertos híbridos de citros. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, Mar. 2008

SOARES FILHO, W.S.; LEDO, C.A.S.; QUINTELA, M.P.; MATTOS, L.A.; PASSOS, O.S.; SOUZA, A.S. Citrus breeding: frequency and vigor of hybrids. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, 2007.

SOKOVIC, M.; GRIENSVEN, L.J.L.D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button mushroom *Agaricus bisporus*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, p. 211–224, 2006.

SOLEL, Z. Alternaria brown spot on Minneola tangelos in Israel. **Plant Pathology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 145-147, 1991.

SOLEL, Z., KIMCHI, M., Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. **J. Phytopathology** v. 145, p. 391–398, 1997.

SOLEL. Z.; TIMMER, L.W.; KIMCHI.M. Iprodione resistance of *Alternaria alternata* pv. *citri* from Minneola Tangelo in Israel and Florida, **Plant Disease**, vol. 80, n°3, p. 291-293, 1996.

SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUSA, C.P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. **Braz. arch. biol. Technol.** v.48, n.2, p. 245-250, 2005.

SOUZA, M.C.; STUCHI, E.S.; GOES, A. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. **Scientia horticultruae**, 2009. (doi: 10.1016/j.scienta.2009.07.005)

SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L.; RENAUD, M.S. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, supl., p. 152, 2003.

STANGE, JR., R. R.; MIDLAND, S. L.; ECKERT, J. W.; SIMS, J. J. An antifungal compound produced by grapefruit and Valencia orange after wounding of the peel. **J. Nat. Prod.**, v. 56, p. 1627-1629, 1993.

SULISTYOWATI, L.; KEANE, P.J.; ANDERSON, J.W. Accumulation of the phytoalexin, 6,7-dimethoxycoumarin, in roots and stems of citrus seedlings following inoculation with *Phytophthora citrophthora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 37, p. 451-461, 1990.

SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its relatives in the Orange subfamily. In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.) **The citrus industry**. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 1943. V. 1, p. 128-474.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley and Los Angeles: University of California, 1967. V. 1, p. 190-430.

TIMMER, L.W.; DARHOWER, H.M.; ZITKO, S.E.; PEEVER, T.L.; IBÁÑES, A.M.; BUSHONG, P.M. Environmental factors affecting the severity of alternaria brown spot of citrus and their potential use in timing fungicide applications. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 6, p. 638-643, 2000.

TIMMER, L.W.; PEEVER, T.L.; SOLEL, Z.; AKIMITSU, K. Alternaria diseases of citrus-novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 42, n. 2, p. 99-112, 2003.

TIMMER, L.W.; PRIEST, M.; BROADBENT, P.; TAN, M.K.; Morphological and pathological characterization of species of *Elsinoë* causing scab disease of citrus. **Phytopathology**, v. 86, p. 1032–1038, 1996.

TIMMER, L.W.; ZITKO, E. Evaluation of fungicides for control of Alternaria brown spot and citrus scab. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v. 110, p. 71-76, 1997.

TIMMER, L.W. Evaluation of fungicides for control of Alternaria brown spot on Murcotts, 1999. In: _____ **Fungicide and Nematicide Tests**: report 57. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2002. Disponível em: <<http://apsnet.org/online/FNtests/vol57/>>. Acesso em 05-julho. 2007.

VAN LOON, L.C. & VAN KAMMEN, A. Polycrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN” Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, v. 40, p. 199-211, 1970.

VENKATESHWARLU, G.; SELVARAJ, Y. Changes in the peel oil composition of Kagzi lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) during ripening. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 50–52, 2000.

VERNENGHI, A.; RAMIANDRASOA, F.; CHUILON, S.; RAVISE, A. Phytoalexines des citrus: seselins propriétés inhibitrices et modulation de synthèse. **Fruits**, v. 42, p. 103-111, 1987.

VICENT, A.; ARMENGOL, J.; SALES, R.; GARCIA-JIMENEZ, J. First report of alternaria brown spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 9, p. 1044, 2000.

VICENT, A.; BADAL, J.; ASENSI, M. J.; SANZ, N.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Laboratory evaluation of citrus cultivars susceptibility and influence of fruit size on

Fortune mandarin to infection by *Alternaria alternata* pv. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 245-251, 2004.

VICENT, A.C.; REIS, R.F.; MONDAL, S.N.; TIMMER, L.W. Pre and post-infection applications of fungicides to control scab, melanose and *Alternaria* brown spot of citrus. **Phytopathology**, vol. 96, n. 6, suppl., p. S118, 2006.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; RENÁNDEZ-LOPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVARES, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**, v. 19, p. 1130–1138, 2008.

WANG, L.Y. BAU, H.-J., LIAO, H.-L., CHUNG, K.-R. Factors affecting the production of elsinochrome phytotoxin by the citrus scab pathogen, *Elsinoë fawcettii*. **The Open Mycology Journal**, v. 3, p. 1-8, 2009.

WHITESIDE, J.O. A newly recorded *Alternaria*-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 60, n. 4, p. 326-329, 1976.

WHITESIDE, J.O. *Alternaria* brown spot of Dancy tangerines and its control. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v. 93, p. 34-37, 1979.

WINSTON, J.R. **Citrus scab: its cause and control**. Washington, USDA. Bulletin, n. 1118, 38 p., 1923.

YOSHIDA, T., NESUMI, H., YOSHIOKA, T., IEKI, H., ITO, Y., NAKANO, M., UENO, I., YAMADA, Y., MURASE, S., TAKISHITA, F. New kumquat cultivar Puchimaru. **Bulletin of the National Institute of Fruit Tree Science**, v. 2, p. 9-16, 2003.