

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

**ESPORULAÇÃO *in vivo*, PERÍODO DE SUSCETIBILIDADE  
DOS TECIDOS E REAÇÃO DE TANGERINAS E HÍBRIDOS A  
*Alternaria alternata***

**Renato Ferrari dos Reis**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Lavern Wayne Timmer**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Setembro – 2006

Reis, Renato Ferrari dos  
R375e      Esporulação *in vivo*, período de suscetibilidade dos tecidos e  
reação de tangerinas e híbridos a *Alternaria alternata* / Renato Ferrari  
dos Reis. -- Jaboticabal, 2006  
xii, 81 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006

Orientador: Antonio de Goes

Banca examinadora: Eduardo Sanches Stuchi, Nelson Sidnei  
Massola Júnior, Modesto Barreto, Antonio Baldo Geraldo Martins  
Bibliografia

1. Citrus. 2. Fungicidas. 3. Resistência. I. Título. II. Jaboticabal-  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 634.322:632.938

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

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**RENATO FERRARI DOS REIS** – Nasceu em Franca – SP, no dia 11 de maio de 1968. Solteiro, filho de Almerino dos Reis da Paz e Mafalda Ferrari dos Reis. Coursou o Colégio Técnico Agrícola em Franca, SP, no período de 1984-1987. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Faculdade de Agronomia de Ituverava (FAFRAM), que concluiu em 1994. Em 1999, ingressou no Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista, no curso de Produção Vegetal, onde desenvolveu o Mestrado estudando o controle e epidemiologia da Mancha Preta dos Citros, sob orientação do Prof. Dr. Antonio de Goes. Em 2003, ingressou no Curso de Produção Vegetal dessa mesma instituição para realização do Doutorado estudando a epidemiologia e o controle da mancha marrom de *Alternária*. De março de 2005 a fevereiro 2006, fez parte do doutorado no Citrus Research Education Center – University of Florida FI, EUA, sob a co-orientação do Prof. Dr. Lavern W. Timmer.

### Produção Científica

#### Trabalhos Científicos Publicados em Periódicos

Reis, R. F.; Almeida, T. F.; Stuchi, E. S.; Goes, A. de Reaction of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the Alternaria brown spot. **Scientia Horticulturae**, (Submetido).

MONDAL, S. N.; VICENT, A.; REIS, R. F.; TIMMER L. W. Saprophytic colonization of citrus twigs by *Diaporthe citri* and factors affecting pycnidial production and conidial survival. **Plant Disease**, (prelo).

GOES, A. de; REIS, R. F.; CRESPI, J. E.; ALMEIDA, E. L. P. Effect of melanose and scab severity on oil production and fruit weight in lemon (*Citrus limon*). **European Journal of Plant Pathology**, (Submetido), 2006.

REIS, R. F.; JOHNSTON, T.; TIMMER, L. W. Evaluation of fungicides for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangor, 2005. **Fungicide and Nematicide**, Tests 61, V.150: <http://apsnet.org/online/FNtests/vol61/>. The American Phytopathological Society.

REIS, R. F.; GOES, A. de; 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, n. 8, p. 1051-1054, 2006.

BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F.; GOES, A. de Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. **Fitopatologia Brasileira**, 2006, (prelo).

REIS, R. F.; TIMMER, L. W.; GOES, A. de Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of ascospores of *Guignardia citricarpa* and on black spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 29-33, 2006.

MENDES, D.; REIS, R. F.; MONTES de OCA, A. G.; PEREIRA, G. T.; GOES, A. de Aspectos nutricionais e físicos no crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* (= *Guignardia citricarpa*), agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, v. 31, n. 4, p. 349-357, 2005.

GOES, A. de; MARTINS, R. D.; REIS, R. F. Efeito de fungicidas cúpricos, aplicados isoladamente ou em combinação com mancozeb, na expressão de sintomas de fitotoxicidade e controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em goiabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 237-240, 2004.

TIMOSSI, A. J.; GOES, A. de; MORETTO, K. C. K., BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F. Influência da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento do teleomorfo de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 489-494, 2003.

REIS, R. F.; GOES, A. de; PEREIRA, G. T. Efeito da aplicação de oxiclureto de cobre em diferentes épocas no controle da mancha preta dos citros causada por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 1, p. 12-18, 2003.

REIS, R. F.; CAMARGO, M.; SANTOS, J. M. dos; GOES, A. de Associação de *Darluca filum* em pústulas causadas por *Tranzschelia discolor*, agente causal da ferrugem do pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 193-195, 2001.

Aos meus pais, Almerino e Mafalda,  
pelo amor e incentivo em todas as etapas da minha vida

Aos meus irmãos e à minha família, que sempre me ajudaram e apoiaram  
nesta caminhada,

## **OFEREÇO**

À Tais, pelo carinho, amizade, ajuda e atenção

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Antonio de Goes, acima de tudo um amigo, pela orientação, pelos prestimosos ensinamentos e incentivos nessa jornada.

Ao Professor Dr. Lavern W. Timmer, pela amizade, pela colaboração grandiosa, orientação e ensinamentos.

Ao pesquisador Dr. Sachindra N. Mondal pela amizade e colaboração nesse trabalho.

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade da realização do Curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento e Pesquisa do Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Citrus Research and Education Center – University of Florida, Lake Alfred, Fl, EUA, pela disponibilização de laboratórios, que permitiram a realização dos meus trabalhos.

À Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro pela realização de experimentos no Banco de Germoplasma.

Aos Professores Dr. Modesto Barreto, Dra. Rita de Cássia Panizzi e Dra. Margarete Camargo, do Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV-UNESP, pelo convívio e aprendizado.

Ao Professor Dr. Jaime Maia dos Santos pela amizade e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade, Lúcia Rita, Wanderlei, Luís Carlos e Maria Isabel.

A todos os colegas do Laboratório de Fitopatologia, que me ajudaram de alguma maneira para a realização desse trabalho.

Aos amigos, Pedro, Eduardo, Márcia, Gabriella, Vagner, Étore, Murilo, Antonio de Carlos, Paulo, Eduardo Diniz, Milena, Guilherme, Miessandro e Renata, pelo convívio nas horas boas e por todo o apoio.

Ao amigo Ricardo pela amizade sincera durante todos esses anos.

Aos meus amigos de Lake Alfred, Fl, Wije, Naresh, Karthick, Eduardo, Sunny e Antonio, pelo convívio.

Aos colegas de Laboratório do Citrus Research and Education Center, Turksen e Chuck Geanangel.

A Natália e Renato, pela força e oportunidade de convívio.

A minha “família” (Dave, Sally, Lori e Kristi) e todos os meus amigos de Port Angeles, EUA, pela força e convivência.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY .....	xi
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	01
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	03
2.1. Histórico da doença.....	03
2.2. Etiologia e Epidemiologia .....	04
2.3. Controle.....	08
2.4. REFERÊNCIAS .....	10
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA IDADE DA LESÃO, UMIDADE E APLICAÇÃO DE FUNGICIDAS NA ESPORULAÇÃO DA <i>Alternaria alternata</i> , O AGENTE CAUSAL DA MANCHA MARROM DE ALTERNÁRIA DE TANGERINA .....	18
RESUMO.....	18
2.1. INTRODUÇÃO .....	19
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
2.2.1. Produção de inóculo e avaliação .....	21
2.2.2. Efeito do tipo de órgão e cultivar na esporulação .....	23
2.2.3. Efeito da idade da folha na esporulação .....	23
2.2.4. Efeito da umidade relativa na esporulação .....	24
2.2.5. Efeito da aplicação de fungicidas na esporulação .....	24
2.2.6. Análise Estatística .....	26
2.3. RESULTADOS .....	26
2.3.1. Efeito do tipo de órgão, cultivar e idade da lesão na esporulação .....	26
2.3.2. Efeito da umidade relativa na esporulação .....	30
2.3.3. Efeito da aplicação de fungicidas na esporulação .....	32
2.4. DISCUSSÃO .....	35
2.5. CONCLUSÕES .....	38

2.6. REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 3 -SUSCETIBILIDADE DE FOLHAS E FRUTOS DE TANGERINAS, TANGELOS, TANGORES E MANDARINAS À <i>Alternaria alternata</i> .....	43
RESUMO.....	43
3.1. INTRODUÇÃO .....	44
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	46
3.2.1. Preparo do inóculo .....	46
3.2.2. Efeito da idade da folha no número e no tamanho de lesões .....	47
3.2.3. Efeito do tamanho do fruto na severidade da doença.....	48
3.2.4. Análise estatística .....	49
3.3. RESULTADOS .....	49
3.3.1. Efeito da idade da folha no número de lesões .....	49
3.3.2. Efeito da idade da folha no tamanho de lesões .....	51
3.3.3. Efeito do tamanho do fruto na severidade da doença.....	53
3.4. DISCUSSÃO .....	55
3.5. CONCLUSÕES .....	60
3.6. REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO 4 – REAÇÃO DE ESPÉCIES CÍTRICAS À <i>Alternaria alternata</i> , AGENTE CASUAL DA MANCHA MARROM DE ALTERNÁRIA .....	64
RESUMO.....	64
4.1. INTRODUÇÃO .....	65
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	67
4.2.1. Relação das espécies cítricas, híbridos e produção de inóculo.....	67
4.2.2. Avaliação das espécies cítricas e híbridos à infecção artificial e à inoculação artificial em campo .....	68
4.2.3. Inoculação em folhas destacadas .....	68
4.3. RESULTADOS .....	69
4.4. DISCUSSÃO .....	75
4.5. CONCLUSÕES .....	78
4.6. REFERÊNCIAS.....	78

## ESPORULAÇÃO *in vivo*, PERÍODO DE SUSCETIBILIDADE DOS TECIDOS E REAÇÃO DE TANGERINAS E HÍBRIDOS A *Alternaria alternata*

**RESUMO** – Este trabalho teve como objetivos determinar o efeito da idade da lesão de mancha marrom de Alternária (MMA) na produção conidial em folhas, ramos e frutos, a produção conidial sob diferentes condições de umidade relativa, a influência da aplicação de fungicidas na supressão da produção de conídios, o efeito da idade de maturação de folhas na suscetibilidade ao patógeno e a influência do tamanho de frutos na suscetibilidade à *Alternaria alternata*. A reação de espécies cítricas à MMA também foi avaliada. A esporulação em folhas teve início cerca de 10 dias depois do aparecimento de lesões de mancha marrom de Alternária, sendo que a maior produção de conídios ocorreu a partir de 20 dias, estendendo-se até 40 dias de idade. A produção de conídios foi superior em folhas do que em ramos ou frutos. A esporulação por unidade de área de lesão em folhas foi maior nos tangelos ‘Minneola’ e ‘Orlando’, em relação ao tangor ‘Murcott’. A produção conidial em lesões de folhas foi mais abundante a partir de 85, 92,5, 96 e 100% de umidade relativa. A aplicação de fungicidas do grupo das estrobilurinas e dos cúpricos suprimiu a esporulação em lesões nas folhas por cerca de 14 a 21 dias após a aplicação. Folhas de tangelo ‘Minneola’ apresentaram maior quantidade e maiores tamanhos de lesões até 20 dias de idade. O híbrido ‘Nova’ foi o mais resistente entre os materiais genéticos estudados, sendo que folhas a partir de 16 dias de idade apresentaram poucas lesões e de menor tamanho, seguida pelo tangor ‘Murcott’. A tangerina ‘Dancy’ foi mais suscetível em relação a todos os híbridos, com exceção ao tangelo ‘Minneola’. Em relação ao tamanho dos frutos e severidade da doença, verificou-se correlação negativa significativa entre o tamanho dos frutos e a severidade da doença. Os tangelos ‘Minneola’ e ‘Orlando’ foram mais suscetíveis ao patógeno até 6-7 cm de diâmetro, enquanto que frutos da tangerina ‘Dancy’ foram até 6 cm. Para o tangor ‘Murcott’ a severidade da doença foi maior em frutos com 4 cm de diâmetro. Em relação à reação das espécies e cultivares testadas, verificou-se que as variedades de Satsumas e os híbridos de mandarina Clementina

foram resistentes ao patógeno, tanto para folhas, quando submetidas à inoculação em campo, como em laboratório. As mandarinas 'Burguess SRA 412', 'Wallent SRA 438', 'Carvalhais', 'Ampefy SRA 459', 'Ananas SRA' e 'Macaque SRA 426' (*Citrus reticulata*) não apresentaram sintomas da doença sob infecção natural ou artificial, em campo. Algumas cultivares das espécies *C. deliciosa*, *C. tangerina*, *C. erythrosa* e *C. temple* apresentaram sintomas da doença. Para essas espécies, até então, não se tinha relato de suscetibilidade à mancha marrom de Alternária. Os híbridos 'Fremont', provenientes do cruzamento *C. clementina* x *C. reticulata*, a mandarina 'Encore' (*C. nobilis* x *C. deliciosa*) e 'Fallglo' (*C. reticulata* x *C. paradisi*) não mostraram sintomas da doença. Esses materiais são promissores para o cultivo de tangerinas em área de ocorrência da doença e, também poderão contribuir no melhoramento genético para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes à mancha marrom de Alternária.

**Palavras-Chave:** *Citrus reticulata*, severidade, resistência, fungicidas

## **SPORULATION *in vivo*, PERIOD OF SUSCEPTIBILITY OF TISSUES AND REACTION OF TANGERINES AND THEIR HYBRIDS TO *Alternaria alternata***

**SUMMARY** – The objectives of this study were to evaluate: i) the effect of age of *Alternaria* brown spot (ABS) lesions on conidial production on leaves, twigs and fruit, ii) conidial production under different relative humidities, iii) influence of fungicide application on conidial production and iv) effect of leaf age on susceptibility to the disease and the influence of fruit size on the severity of brown spot. The reaction of the different citrus species to ABS was also studied. Sporulation on leaves began about 10 days after symptoms developed, was abundant from 20 to 40 days, and declined thereafter. Conidial production was far greater on leaf than fruit or twig lesions. Spore production per unit area of leaf lesion was greater on the more susceptible hybrids, ‘Minneola’ and ‘Orlando’ tangelos than on the less susceptible ‘Murcott’ tangor. Conidial production on leaf lesions was more abundant at 85, 92.5, 96 and 100% relative humidity (RH) and almost nil at lower RH. Application of pyraclostrobin, trifloxystrobin, azoxystrobin and copper fungicides suppressed the sporulation on leaf lesions for about 14 to 21 days after application. ‘Minneola’ tangelo leaves had the greatest number and the largest lesions by 20 days or later. The ‘Nova’ and Murcott hybrids were the most resistant of the cultivars and leaves showed few lesions when they were 16-days-old or older at inoculation. Leaves of ‘Dancy’ tangerine were more susceptible than on leaves of ‘Orlando’ tangelo and the ‘Sunburst’ mandarin. For disease severity, there was a significant negative correlation between fruit size and severity. The fruit of ‘Minneola’ and ‘Orlando’ tangelos were susceptible until they reached about 6-7 cm in diameter, while ‘Dancy’ tangerine was susceptible until it reached about 6 cm in diameter. Fruit of ‘Murcott’ tangor was susceptible up to 4 cm in diameter. In relation to species and cultivar reaction, leaves of Satsuma mandarins and Clementine hybrids were resistant to the pathogen. With the mandarins Burgess SRA 412, Wallent SRA 438, Carvalhais, Ampefy SRA 459, Ananas SRA and Macaque SRA 426, no symptoms of disease were expressed under natural infection, or artificial field inoculation. However, some cultivars of *C. deliciosa*, *C. tangerina*, *C. erythroa* and *C. temple*, showed ABS symptoms.

These species have not been reported as susceptible to *Alternaria* brown spot previously. In Fremont, a cross of *C. clementina* x *C. reticulata*, the Encore mandarin, a cross of *C. nobilis* x *C. deliciosa*, and Fallglo, a cross of *C. reticulata* x *C. paradisi*, no symptoms were observed. These materials probably are promising for cultivation and also can contribute on genetic breeding to develop the new resistant cultivars to *Alternaria* brown spot of tangerine.

**Keywords:** *Citrus reticulata*, severity, resistance, fungicide

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. Introdução

O Brasil destaca-se no contexto mundial como maior produtor e exportador de suco concentrado. A produção brasileira somente de laranja, em 2004, foi da ordem de 448 milhões de caixas de 40,8 kg e as exportações de suco concentrado congelado e não congelado foram da ordem de 1,58 milhões de toneladas e trouxeram ao país cerca de US\$ 1 bilhão (AGRIANUAL, 2006).

A citricultura brasileira possui aproximadamente 820 mil hectares, sendo que cerca de 600 mil hectares encontram-se no estado de São Paulo, e a previsão de safra 2005/2006 é da ordem de 311 milhões de caixas (AGRIANUAL, 2006).

Embora a produção brasileira de tangerinas tenha aumentado significativamente, cerca de 70% nos últimos 6 anos, passando de 627 mil toneladas em 1997, para 1,3 milhões em 2003, numa área colhida com cerca de 65 mil hectares, ela ainda é muito pequena quando comparada à produção da China e Espanha. No estado de São Paulo, a área plantada de tangerina e seus híbridos aproxima-se a 27 mil hectares, correspondente a uma produção de 660 mil toneladas, seguido dos estados do Paraná com 274 mil e do Rio Grande do Sul com cerca de 172 mil toneladas. No entanto, a exportação dessas frutas ainda é baixa, aproximadamente de 18 mil toneladas em 2003 (AGRIANUAL, 2006).

Não obstante a existência de várias doenças já relatadas e bem conhecidas na citricultura brasileira, as tangerinas, bem como seus híbridos, têm sido alvos de uma doença chamada mancha marrom de *Alternária*, causada pelo fungo *Alternaria alternata*. Verificou-se tal doença, a partir de 2001, em pomares de tangerina 'Dancy' no estado do Rio de Janeiro (GOES et al., 2001) e nos anos subseqüentes em São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (SPÓSITO et al., 2003), sempre causando elevados prejuízos.

A perda de produtividade por causa da doença é muito elevada em algumas regiões, podendo variar de 30-90% da produção (SOLEL, 1991, CASTRO-CAICEDO et al., 1994).

Dessa forma, dada à gravidade da mancha marrom de Alternária e os elevados prejuízos causados em diferentes regiões do Brasil, particularmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul e, considerando a suscetibilidade das principais tangerinas e tangores plantadas nestas regiões, o presente trabalho visa relacionar alguns fatores que poderão contribuir para melhor entendimento da epidemiologia da doença, bem como permitir estratégias de manejo mais adequado da mancha marrom de Alternária.

Os objetivos do presente estudo foram: (i) determinar a produção conidial em diferentes tecidos, cultivares e condições de umidade; (ii) determinar a influência da idade e tamanho de folhas e frutos na suscetibilidade à infecção de *A. alternata*; (iii) determinar o efeito da aplicação de fungicidas na produção conidial; (iv) avaliar as espécies e variedades ou híbridos resistentes à *A. alternata*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Histórico da doença

Na literatura há relato de quatro espécies de *Alternaria* causadoras de doenças em citros, sendo: *Alternaria* que causa a mancha marrom em tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) e em seus híbridos, *Alternaria* que causa a mancha em folha de limão 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) e limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), *Alternaria* que causa a podridão negra em vários cultivares de citros e a *Alternaria* que causa a mancha foliar em 'limão Mexicano' (*C. aurantifolia* Swingle) (PALM & CIVEROLO, 1994; AKIMITSU et al., 2003; TIMMER et al., 2003).

O primeiro relato da mancha marrom de Alternária 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 mancha marrom de Alternária (MMA) é causada pelo fungo *Alternaria alternata*, cuja ocorrência dá-se em várias regiões do mundo (TIMMER et al., 2003).

Em 1974, encontrou-se a mancha marrom de Alternária na Flórida, atacando ramos e frutos de tangerina 'Dancy' (*Citrus reticulata* Blanco) (WHITESIDE, 1976). Em 1989, a doença foi relatada em Israel por SOLEL (1991) e atualmente esta doença encontra-se assinalada na África do Sul (SCHUTTE et al., 1992), Cuba (HERRERA 1992), Colômbia (CASTRO-CAICEDO et al., 1996), 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).

O primeiro relato da mancha marrom de Alternária no Brasil ocorreu em plantas de tangerina 'Dancy' (*C. reticulata*) (GOES et al., 2001). Nos anos subseqüentes, sua presença foi assinalada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (SPÓSITO et al., 2003). Em todos esses estados, a doença vem se constituindo em fator limitante à produção de tangerinas e, principalmente do tangor 'Murcott', um

híbrido provavelmente do cruzamento *C. sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata*, devido à sua alta suscetibilidade e condições ambientais favoráveis à ocorrência da doença.

## 2.2. Etiologia e Epidemiologia

Pertencente ao grupo dos Fungos Mitospóricos, *Alternaria* é um gênero dictiospórico da família Dematiaceae. A separação das espécies de *Alternaria* se dá principalmente através dos seus grandes conídios. Os conídios são catenulados (formados em cadeias) ou solitários, tipicamente ovóides ou obclavados, que freqüentemente são rostrados, de coloração marrom claro a escuro e muticelulados, com septos transversais e freqüentemente oblíquos ou longitudinais (ELLIS & HOLLIDAY, 1970).

As espécies também podem ser segregadas dentro de vários grupos, de acordo com a catenulação (número de esporos na cadeia). No entanto, a catenulação é bastante variável e algumas espécies podem divergir dentro do padrão da espécie, como por exemplo, *A. alternata* de citros, a qual também produz esporos solitários ou em cadeia, revelando grande polimorfismo da espécie (SOLEL, 1991). Conídios podem apresentar-se sem cauda, quando elipsóides, ou com cauda cilíndrica. O tamanho dos conídios pode variar de 10-65 x 8-16 µm, de 1 a 6 septos transversais, e de 0 a 3 septos longitudinais (SOLEL, 1991).

Os agentes responsáveis pela mancha marrom e mancha foliar, em limão 'Rugoso', foram identificados como *A. citri*, baseado na similaridade de morfologia com *Alternaria* da podridão negra dos citros (RUEHLE, 1937; KIELY, 1964; PEGG, 1966). Entretanto, *Alternaria* da mancha marrom e *Alternaria* da mancha foliar do limão 'Rugoso' são conhecidas por serem biologicamente e morfologicamente distintas da *Alternaria* que causa podridão negra dos citros, especialmente quanto à viabilidade de produção de toxina específica ao hospedeiro (HST) (KIELY, 1964; WHITESIDE, 1976).

De acordo com a morfologia e tamanho dos conídios observados em isolados de Israel, designou-se o agente causal da mancha marrom de *Alternaria* como *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keisel. pv. *citri* (SOLEL, 1991).

Estudos morfotaxonômicos foram realizados com o objetivo de esclarecer a identidade de isolados de *Alternaria* da mancha marrom das tangerinas, tangelos e da mancha foliar do limão 'Rugoso' oriundos de vários países. Foram verificadas 10 novas espécies de *Alternaria* e, nenhum dos 135 "strains" analisados puderam ser identificados morfologicamente como *A. alternata* ou *A. citri* (SIMMONS, 1999).

Recentemente, através de estudos filogenéticos moleculares, isolados de *Alternaria* associados a citros dentro de uma única espécie filogenética, foram relatados como *Alternaria alternata* (PEEVER et al., 2004). Em vista disso, julgou-se oportuno adotar esta denominação no presente trabalho.

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 aos seus hospedeiros (HST) (KOHMOTO et al., 1979). Um patotipo é chamado de ACT – toxina ou ACTG – toxina do patotipo tangerina, relatado em Queensland, na Austrália, por PEGG (1966) e na Flórida, nos Estados Unidos, por WHITESIDE (1976). O outro patotipo é chamado de ACR – toxina ou ACRL – toxina do patotipo limão 'Rugoso', específico somente para os limoeiros 'Rugoso' (*Citrus jambhiri*) e 'Cravo' (*Citrus limonia*), também reportado na Flórida por WHITESIDE (1976). Essas toxinas específicas aos hospedeiros foram também mais tarde comprovadas por KOHMOTO et al. (1979) e por GARDNER et al. (1986). A ACT toxina do patotipo tangerina, além de afetar as tangerinas também afeta seus híbridos como os tangelos 'Minneola' e 'Orlando', o tangor 'Murcott' e híbridos de mandarinas como 'Lee', 'Page', 'Robinson', 'Sunburst' e 'Nova' (NISHIMURA & KOHMOTO, 1983; KOHMOTO et al., 1991; SOLEL, 1991; PEEVER et al., 2000).

A produção de ambas as toxinas ocorre na germinação dos esporos, tanto em tecidos suscetíveis como em meio líquido (KOHMOTO et al., 1979; KOHMOTO et al., 1984).

A ACR toxina do patotipo limão 'Rugoso', causa obstrução da passagem de água e necrose nas nervuras a um mínimo de concentração de  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$  (KOHMOTO et al., 1979; AKIMITSU et al., 1994). Estudos realizados por AKIMITSU et al. (1988) mostraram que o sítio de ação para a maior forma da ACR – toxina, a ACRL – toxina I, foi encontrada na mitocôndria de plantas suscetíveis de limão 'Rugoso'. No caso de ACT – toxina, o primeiro sítio de ação ocorre na membrana plasmática e induz necrose nas nervuras e um rápido aumento na perda de eletrólitos em folhas suscetíveis ao patotipo tangerina (KOHMOTO et al., 1993).

Os sintomas da doença aparecem em manchas de coloração marrom para preta, de tamanho variado, em folhas, ramos e frutos. Os sintomas podem aparecer até em 24 h após a infecção. Entretanto, 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, e em folhas maduras a mancha marrom aparece como distintas lesões amarronzadas, circundadas por um halo amarelo. Em ramos, as lesões 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., 1886; REIS et al., 2006b). As lesões em frutos podem ocorrer também de forma circular, variando de pequenas para grandes lesões. As lesões podem aparecer na forma de saliências eruptivas corticosas, formando uma pequena bolsa na superfície dos frutos (TIMMER et al., 2000). Frutos infectados até 20 mm de diâmetro, são mais propícios à queda, embora, frutos com mais 20 mm também podem cair, reduzindo consideravelmente a produção. Além disso, frutos que tiveram ataque severo do patógeno e que ainda permaneceram nas árvores até o momento da colheita têm menor valor comercial no mercado de frutas frescas.

Estudos de suscetibilidade e resistência de espécies e cultivares de tangerina à mancha marrom de *Alternária* têm sido realizados por vários pesquisadores (GARDNER et al., 1986; KOHMOTO et al., 1991; PEEVER et al., 2000). Algumas pesquisas

relacionam a resistência de folhas, ramos e frutos ao patógeno, com o avanço da maturidade (PEGG, 1966; GARDNER et al., 1986; SOLEL, 1991; REIS et al., 2006b). Folhas maduras 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).

De acordo com WHITESIDE (1976), há uma relação entre idade e tamanho de frutos na suscetibilidade, como verificado em frutos de tangerina 'Dancy', os quais são mais suscetíveis até 40 mm de diâmetro. No entanto, esta suscetibilidade pode-se estender até 6-7 cm de diâmetro em frutos de mandarina da cultivar 'Fortune', como verificou VICENT et al. (2004). Frutos de tangerina 'Dancy', inoculados sob condições de casa de vegetação, mostraram suscetibilidade até 6 cm de diâmetro, e 4-5 cm em frutos de tangor 'Murcott' (REIS et al., 2006b).

Embora a epidemiologia da mancha marrom de *Alternária* seja relativamente simples, tem sido pouco estudada a produção de conídios de *A. alternata* em citros em lesões de tecidos suscetíveis (WHITESIDE, 1976; WHITESIDE, 1979). Os conídios são produzidos primeiramente na superfície das lesões nas folhas ainda aderidas nas árvores.

A ocorrência da produção de conídios, primeiramente, dá-se em lesões em folhas maduras (SOLEL et al., 1997) e as condições de água livre ou umidade acima de 90% favorecem a esporulação do patógeno (TIMMER et al., 1998). No entanto, esses mesmos pesquisadores não encontraram uma correlação positiva entre o número de conídios capturados e o total de chuva, ou com a severidade da doença, mas uma baixa correlação com a duração de molhamento foliar.

Verifica-se a produção conidial também em tecidos foliares jovens, ocorrendo a partir de 10 dias após o aparecimento das lesões, estendendo-se até aos 50 dias e em quantidade superior em relação a ramos e frutos (REIS et al., 2006a).

A melhor faixa de temperatura para que ocorra a infecção de *A. alternata* é de 24 a 27°C, diminuindo gradativamente a 20 e 17°C, sendo pouca a infecção a 32°C. Pouca infecção ocorreu com 4 e 8 h de umidade foliar, porém níveis mais altos ocorreram

com 15 a 36 h (CANIHOS et al., 1999; TIMMER et al., 2000). RENAUD et al. (2005) relataram aumento na germinação de conídios de *A. alternata* com 24 h de molhamento foliar. Em Israel, SOLEL & KIMCHI (1998) verificaram que a ótima temperatura para a expansão da lesão ficou situada de 20 a 25°C. A severidade da doença tem sido correlacionada entre o número de horas de molhamento foliar, temperatura média e total de chuva e uma correlação negativa com a produção de conídios (TIMMER et al., 2000).

Quanto à penetração do fungo na superfície da folha, alguns pesquisadores relatam que o fungo pode penetrar diretamente na epiderme ou através dos estômatos, porém sempre associado com a formação de apressório (SOLEL & KIMCHI, 1998). RENAUD (2005) relata que a penetração do patógeno no hospedeiro ocorre, em sua grande maioria, através da superfície da folha, após a formação de apressórios. Outros estudos indicam que a penetração ocorre através dos estômatos sem a formação de apressório (BHATIA et al., 2002). A não ocorrência da formação do apressório também foi verificada por PEGG (1966) e sempre a penetração do fungo foi através das áreas necróticas.

### **2.3. Controle**

Atualmente, em praticamente todas as regiões produtoras de tangerinas e seus híbridos, pesquisadores buscam formas mais adequadas e racionais no controle da mancha marrom de Alternária. No entanto, devido à grande suscetibilidade das cultivares existentes, períodos relativamente curtos para a produção de conídios, fatores ambientais favoráveis à disseminação e infecção do patógeno, o controle da doença, seja ele através do uso de fungicidas, uso de espécies ou cultivares resistentes ou medidas culturais para amenizar a severidade da doença, não tem sido uma tarefa fácil.

O uso de algumas práticas culturais pode contribuir para a redução da severidade da MMA, dentre elas destacam-se: (i) evitar irrigação aérea para diminuir a

duração do molhamento foliar e assim, reduzir a produção conidial; (ii) usar maiores espaçamentos para que haja maior circulação de ar e conseqüentemente diminuição da umidade relativa; (iii) fazer sempre que possível poda das plantas, numa forma de eliminar fonte de inóculo e para que ocorra maior ventilação interna e (iv) evitar a adubação em excesso, principalmente quanto a fertilizantes nitrogenados, de modo a não favorecer constantes brotações.

Aplicação de fungicidas é essencial para o controle da mancha marrom de *Alternária* e para a produção de frutos sadios. Devido ao longo período de suscetibilidade dos frutos à infecção, são necessárias várias aplicações, o que implica na elevação do custo de produção da cultura.

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., 2006c). 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 este deve ser alternado ou misturado com outros fungicidas (SIEROTSKI et al., 2000).

MILES et al. (2005) verificaram efetividade no controle da MMA com o uso de estrobilurinas em mistura com hidróxido de cobre ou mancozeb. Estes pesquisadores constataram também eficiência no controle da doença com o uso de captan, iprodione e chlorothalonil/pyrimthanil.

Em áreas onde a doença é mais severa e as condições ambientais são mais favoráveis à disseminação e infecção do patógeno, várias aplicações de fungicidas geralmente são necessárias. Normalmente as aplicações com fungicidas começam a partir de ¼ de brotações expandidas na primavera, e uma segunda ainda pode ser

necessária antes da maturação dessas brotações. Após  $\frac{3}{4}$  da queda de pétalas, aplicações são necessárias sempre com intervalo de 10-21 dias, até que os frutos tornem-se resistentes (SCHUTTE et al., 1992; SWART et al., 1996; TIMMER et al., 2000).

Em regiões semi-áridas como, por exemplo, Israel e África do Sul, são necessárias de 6 a 8 pulverizações (SCHUTTE et al., 1992; SOLEL et al., 1997). Na Colômbia, onde ocorrem altos índices de chuva, associados às altas temperaturas, as pulverizações para o controle da doença são realizadas semanalmente, durante todo o ano (CASTRO-CAICEDO & MONTOYA-RESTREPO, 1996).

O modelo chamado de Alter-Rater tem auxiliado na decisão do melhor momento da aplicação de fungicida cúprico. Este modelo baseia-se na quantidade de chuva, duração da umidade foliar e temperatura média diária, além de levar em consideração o histórico da doença na área, fonte de inóculo e suscetibilidade da cultivar (TIMMER et al., 2000).

No Brasil, o uso de procimidone proporcionou baixa severidade da MMA em tangerina Ponkan (REIS et al., 2006b), fato este também verificado com o uso de pyraclostrobin aplicado em mistura e alternado com hidróxido de cobre (REIS et al., 2006c). Entretanto, estudos para adoção de medidas eficientes, como o uso de fungicida para controle da doença, são realizados exaustivamente, de modo a compatibilizar época e intervalo de aplicação, produtos e doses a serem utilizados.

## 2.4. Referências

AGRIANUAL 2006: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2006. p. 257-285.

AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 435-446, 2003.

AKIMITSU, K.; KOHMOTO, K.; OTANI, H.; NISHIMURA, S. Host-specific effects of toxin from the rough lemon patotype of *Alternaria alternata* on mitochondria. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, n. 3, p. 925-931, 1988.

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.

BHATIA, A.; PEEVER, T. L.; AKIMITSU, K.; CARPENTER-BOGGS, L.; TIMMER, L. W. Ecology of *Alternaria alternata* on citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 6, p. S7, 2002.

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**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 429-433, 1999.

CASTRO-CAICEDO, B. L.; MONTOYA-RESTREPO, E. C. Control químico de la mancha foliar del tangelo *Minneola Alternaria tenuissima*. **Avances Técnicos Cenicafé**, Chinchiná, n. 234, p.1-4, 1996.

CASTRO-CAICEDO, B. L.; LEGUIZAMON-C., J. E. LOPEZ-R. J. A. La mancha foliar de los cítricos en la zona cafetera. **Avances Técnicos Cenicafé**, Chinchiná, n. 198, p. 26, 1996.

ELLIS, M. B.; HOLLIDAY, P. ***Alternaria citri***. Commonwealth Mycological Institute, 242, Kew: Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 1970.

GARDNER, J. M.; KONO, Y.; CHANDLER, J. L. Bioassay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, p. 293-304, 1986.

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

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

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

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

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.; KONDOH, Y.; KOHGUCHI, T.; OTANI, H.; NISHIMURA, S.; SCHEFFER, R. P. Ultrastructural changes in host cells caused by host-selective toxin of *Alternaria alternata* from rough lemon. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 12, p. 2485-2492, 1984.

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.

MILES, A. K.; WILLINGHAM, S. L.; COOKE, A. W. Field evaluation of a plant activator, captan, chlorothalonil, copper hydroxide, iprodione, mancozeb and strobilurins for the control of citrus brown spot of mandarin. **Australasian Plant Pathology**, Castle Hill, v. 34, n. 1, p. 63-71, 2005.

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.

PALM, M. E.; CIVEROLO, E. L. Isolation, pathogenicity, and partial host range of *Alternaria limicola*, causal agent of *mancha foliar de los cítricos* in Mexico. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 9, p. 879-883, 1994.

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.

PEEVER, T. L.; SU, G.; CARPENTER-BOGGS, L.; TIMMER, L. W. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, Lawrence, v. 96, n. 1, p. 119-134, 2004.

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.

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

REIS, R. F.; GOES, A. de; MONDAL, S. M.; 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**, St. Paul, v. 90, n. 8, p. 1051-1054, 2006a.

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

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

RENAUD, M. S. A. **Escala diagramática para avaliação da Mancha Marrom de *Alternaria* de citros e efeito de variáveis ambientais na infecção de *Alternaria alternata* f. sp. *citri***. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

RENAUD, M. S.; LOURENÇO, S. A.; FEICHTENBERGER, E.; AMORIM, L. Efeito da temperatura e do período de molhamento foliar na germinação de conídios de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, supl., p.102, 2005.

RUEHLE, G. D. A strain of *Alternaria citri* Ellis and Pierce causing a leaf spot of rough lemon in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 27, n. 8, p. 863-865, 1937.

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

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 potential to control postharvest decay when applied as a preharvest spray. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale: **Proceendings...** Acireale: International Society of Citriculture, 1992. v. 3, p. 1070-1074.

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.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* themes and variations (226-235): Classification of citrus pathogens. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 70, n. 1, p. 263-323, 1999.

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. Histopathology of infection of Minneola tangelo by *Alternaria alternata* pv. *citri* and effect of and environmental factors on lesion development. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, p. 557-561, 1998.

SOLEL, Z.; TIMMER, L. W. Iprodione resistance of *Alternaria alternata* pv. *citri* from Minneola tangelo in Israel and Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 3, p. 291-293, 1996.

SOLEL, Z.; OREN, Y.; KIMCHI, M. Control of *Alternaria* brown spot of Minneola tangelo with fungicides. **Crop Protection**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 659-664, 1997.

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.

SWART, S. H.; WINGFIELD, M. J.; SWART, W. J.; SCHUTTE, G. C. Brown spot of Minneola tangelo and efficacy of fungicidal spray programmes for disease control in South Africa. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., 1996, Sun City: **Proceedings...** Sun City: International Society of Citriculture, 1996. v. 1, p. 379-384.

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 15-julho. 2006.

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.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T. R.; IBÁÑEZ, A. M.; ZITKO, S. E. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause brown spot of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 11, p. 1218-1223, 1998.

TIMMER, L. W.; DARHOWER, H. M.; ZITKO, S. E.; PEEVER, T. L.; IBÁÑEZ, 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.

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.

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.

## **CAPÍTULO 2 – Efeito da Idade da Lesão, Umidade e Aplicação de Fungicidas na Esporulação de *Alternaria alternata*, o Agente Causal da Mancha Marrom de Alternária de Tangerina**

**RESUMO** – A mancha marrom de Alternária, causada por *Alternaria alternata*, causa queda de produção e, frutos atacados perdem seu valor comercial, na maioria das áreas do mundo onde se cultivam cultivares de tangerinas e seus híbridos suscetíveis. Experimentos foram conduzidos para verificar o início da produção de conídios em folhas, ramos e frutos em híbridos de tangelos ‘Minneola’ e ‘Orlando’ e do tangor ‘Murcott’. Outros experimentos foram conduzidos para determinar a influência da idade da lesão e da umidade relativa na produção de conídios. Também verificou-se a produção conidial em folhas destacadas e colocadas sob plantas cítricas no pomar, bem como a eficiência de fungicidas na supressão da produção de conídios. A esporulação em folhas teve início cerca de 10 dias depois do aparecimento do sintoma e foi mais abundante a partir de 20 dias, estendendo-se até os 40 dias e posteriormente houve um decréscimo da esporulação. A produção de conídios foi superior em folhas do que em ramos ou frutos. A esporulação por unidade de área de lesão em folhas foi maior nos tangelos ‘Minneola’ e ‘Orlando’, em relação ao tangor ‘Murcott’. A 74,0% de UR, a produção conidial em lesões em folhas foi menor, mas a 85, 92,5, 96,0 e 100,0% foi mais abundante. Produção de conídios em folhas sob a copa de plantas no pomar foi elevada até os 4 dias e, a partir daí, diminuiu drasticamente. A aplicação de inibidores da respiração ( $Q_{oI}$ ) ou de fungicidas cúpricos suprimiu a esporulação em lesões nas folhas por cerca de 14 a 21 dias após a aplicação, o que não foi observado para o fungicida ferbam.

**Palavras-chave:** *Citrus reticulata*, controle químico

## 2.1. Introdução

A mancha marrom de Alternária (MMA) causa lesões necróticas escuras em folhas, ramos e frutos de tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) e em seus híbridos (TIMMER et al., 2000; TIMMER et al., 2003). As lesões aparecem 2-3 dias após a infecção e se expandem rapidamente, devido à produção de uma toxina específica ao hospedeiro (HST) (KOHMOTO et al., 1991). Infecções severas resultam em intensa queda de folhas, frutos, seca e morte de ramos. As lesões em frutos variam desde pequenas manchas necróticas de 2-3 mm até 10 mm de diâmetro. Em frutos que permanecem nas árvores, as lesões variam de pequenas a grandes, deprimidas de coloração negra, com isto reduzindo seu valor no mercado de frutas frescas. Recentemente a distribuição do patógeno no mundo tem se expandido rapidamente. A mancha marrom de Alternária é um sério problema, tanto em áreas semi-áridas, como em áreas úmidas de produção de citros (TIMMER et al., 2003).

O agente causal da mancha marrom de Alternária foi originalmente designado como *Alternaria citri* Ellis & Pierce (PEGG, 1966). Mais recentemente, SOLEL (1991) considerou que poderia ser um patotipo de *A. alternata*, e então foi designado como *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keissl. pv. *citri*. Outros pesquisadores consideram que essas espécies possuem diferenças morfológica e bioquímica entre isolados do patotipo tangerina (SIMMONS, 1999; ANDERSON et al., 2005). SIMMONS (1999) verificou 10 diferentes espécies de *Alternaria* entre isolados patogênicos à tangerina. Estudos filogenéticos moleculares indicaram que todos os pequenos esporos de isolados de *Alternaria* associados a citros são similares à *Alternaria alternata* (PEEVER et al., 2004; PEEVER et al., 2005). Neste trabalho considerou-se e usou-se a designação da espécie como *A. alternata*.

O ciclo da mancha marrom de Alternária é relativamente simples (TIMMER et al., 2000; TIMMER et al., 2003). Conídios produzidos em tecidos sintomáticos são dispersos através do vento e depositados na superfície das plantas, onde ocorre a germinação e infecção dos tecidos suscetíveis. Usualmente essas infecções ocorrem a partir de março a novembro para o hemisfério Norte e de setembro a abril no hemisfério

Sul. A liberação de conídios é iniciada através de gotas de orvalho em alta umidade relativa ou através de chuvas (TIMMER et al., 1998). CANIHOS et al. (1999) encontraram ótima temperatura para infecção de 23 a 27°C e que, 4 a 8 h de molhamento foliar foi suficiente para limitar a infecção, porém a partir de 12 h resultou em uma alta incidência da doença. Estudos em campo mostraram que as condições favoráveis à infecção foram: i) chuva maior que 2,5 mm, ii) molhamento foliar com duração superior a 10 h e iii) temperatura média diária entre 20 e 28°C (TIMMER et al., 2000). Esta informação tem sido usada para desenvolver o modelo chamado Alter-Rater, que indica quando os tecidos suscetíveis estão mais propícios à infecção e, conseqüentemente, o período ideal para se iniciar a aplicação de fungicida (TIMMER et al., 2000; TIMMER et al., 2001; BHATIA & TIMMER, 2003; PERES & TIMMER, 2006).

A esporulação de *Alternaria* spp. em várias culturas tem sido estudada intensivamente mas, informações na produção conidial em tecidos de hospedeiro são ainda limitadas (STRANDBERGER, 1992; ROTEM, 1994). Uma vez que o fungo *Alternaria* spp. é necrotrófico, a esporulação é maior em tecidos recentemente mortos pelo patógeno. Em estudos preliminares verificou-se que a esporulação de *A. alternata* do patotipo tangerina foi maior quando folhas infectadas foram umedecidas ou mantidas em alta umidade. Entretanto, não verificou-se a produção de conídios em folhas infectadas e mantidas a 50-70% de umidade relativa (TIMMER et al., 1998). WHITESIDE (1998) verificou que a esporulação foi mais abundante em brotações com sintomas da doença do que em frutos, e que ramos ou frutos doentes que permanecem na planta no inverno podem servir como fonte primária de inóculo, para as primeiras brotações da primavera.

Na maioria dos pomares de cultivares suscetíveis na Flórida, os níveis de inóculo são altos e o número de conídios não foram fatores limitantes na infecção. Em estudos prévios de campo, verificou-se que não houve relação entre o número de conídios coletados com o total de infecção (TIMMER et al., 2000) e, nenhuma relação foi observada com infecção ou a necessidade de aplicação de fungicidas. A chuva aumentou a infecção, mas provavelmente também diminuiu conídios suspensos na atmosfera e conseqüentemente, o número de conídios coletados (TIMMER et al., 2000).

Entretanto, um melhor entendimento do aspecto epidemiológico da produção de conídios pode permitir modificações culturais e manejo de estratégia de controle da doença, certamente redundando em diminuições dos níveis de inóculo e melhorando os resultados de controle.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tipo do órgão de planta, a idade de lesão, a cultivar, a umidade relativa e a aplicação de fungicidas na produção de conídios de *A. alternata*.

## **2.2. Material e Métodos**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia e na Área Experimental do CREC “Citrus Research and Education Center” - University of Florida, Lake Alfred, FL, EUA.

### **2.2.1. Produção de inóculo, inoculação e avaliação**

Todas as inoculações foram conduzidas usando o isolado EV-31s do patotipo tangerina de *A. alternata* proveniente de folha de tangelo ‘Minneola’ (*Citrus paradisi* x *C. reticulata*), utilizado por PEEVER et al. (1999). Conídios foram produzidos em meio de cultura, seguindo a metodologia adotada por Canihos (CANIHOS et al., 1999). Para o processo de isolamento de *A. alternata*, pequenos fragmentos de tecido foliar com sintomas da doença foram imersos em álcool a 50%, por 30 segundos e em seguida, numa solução de hipoclorito de sódio a 5% e água na proporção de 1:3 (v/v), durante dois minutos. Esses fragmentos foram enxaguados em água destilada e esterilizada e depositados em meio de batata-dextrose-ágar, incubados em fotoperíodo de 12/12 h, sob luz fluorescente a 27°C, por 3 a 5 dias. Após esse período, a superfície das placas que continha a massa micelial foi raspada com um bisturi para remover o micélio, e as colônias foram cortadas em pedaços com aproximadamente 4 mm de diâmetro. Cerca

de 100 pedaços foram transferidos para cada placa com meio para a esporulação, constituído de 30 g de  $\text{CaCO}_3$ , 20 g de sacarose e 20 g de ágar por litro de água destilada. Adicionou-se dois mililitros de água destilada esterilizada em cada placa e essas, seladas com Parafilm e incubadas em fotoperíodo de 12/12 h, sob luz fluorescente a 27°C por dia, por 3 a 4 dias para a produção de conídios. Os conídios foram coletados adicionando 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa e as colônias foram raspadas suavemente com um pincel, e a suspensão foi filtrada usando duas camadas de gaze esterilizada para remover fragmentos de micélio. A suspensão de conídios foi centrifugada uma vez por 20 minutos em 6000 g. Suspensão conidial foi ajustada a  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>, usando um hemocitômetro. Experimentos preliminares, usando concentrações de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, mostraram que a concentração de  $10^4$  proporcionou uma melhor contagem de número de lesões em cada folha.

Brotações novas foram inoculadas na concentração citada anteriormente, sendo as plantas inoculadas, cobertas com um saco de polietileno transparente para formação de câmara úmida por 14-16 h a 22-28°C.

Para o mensuramento da esporulação em folhas, discos de 4 mm de diâmetro foram cortados dos tecidos com lesões de mancha marrom de *Alternária*, com o auxílio de um vazador. Para cada uma das 4 repetições, 10 discos de folha, contendo uma simples lesão foram colocados sobre papel de filtro umedecido em placas de Petri e incubados em fotoperíodo de 12/12 h, sob luz fluorescente a 23-25°C por 48 h. Amostras de 10 discos foram colocados em Eppendorf sendo em seguida adicionado 0,5 mL de água esterilizada e agitadas, usando um agitador de tubos do tipo Vortex. A concentração conidial foi determinada contando os conídios em 0,2 mL de água, depositada em lâmina de microscópio. A área da lesão foi calculada a partir do seu raio mensurado com um paquímetro e o número de conídios foi expresso em conídios por mm<sup>2</sup> de área lesionada.

### **2.2.2. Efeito do tipo de órgão e cultivar na esporulação**

Árvores maduras dos tangelos 'Minneola' e 'Orlando' (*C. paradisi* x *C. reticulata*) e tangor 'Murcott' (provavelmente originado do cruzamento *C. reticulata* x *C. sinensis*) foram selecionadas em pomares na área Experimental do CREC. Folhas, ramos e frutos foram marcados no início do aparecimento do sintoma da doença e amostras destes órgãos foram coletadas a cada 10 dias de intervalo, iniciando aos 10 dias após o aparecimento do sintoma. Determinou-se a metodologia para promover a esporulação como descrito no item 2.2.1, exceto que utilizou-se somente cinco lesões por amostra em ramos e frutos.

### **2.2.3. Efeito da idade da folha na esporulação**

Folhas em plantas do tangelo 'Minneola', mantidas em casa de vegetação foram inoculadas com o isolado e concentração conidial citados anteriormente e, folhas em árvores maduras em campo foram inicialmente amostradas, cujo sintoma tinha cerca de 10 dias após o aparecimento da lesão. A produção conidial foi determinada como descrito anteriormente, e as lesões foram amostradas a cada 10 dias de intervalo por 2 meses.

Em outro experimento, folhas maduras sintomáticas foram coletadas em árvores de tangelo 'Minneola' para determinar o total e a duração de esporulação em folhas caídas sob a copa das árvores nos pomares. Quatro repetições com 20 folhas foram colocadas em sacos de tela com malha de 1 mesh, os quais foram depositados sob a copa das árvores de tangelo 'Minneola' em campo. As lesões nessas folhas estavam com cerca de 25 a 30 dias de idade. Três a quatro folhas foram retiradas de cada saco de tela e cinco a sete discos foram amostrados a cada 4 dias de intervalo por 12 dias e a esporulação foi determinada como descrito no item 2.2.1.

#### **2.2.4. Efeito da umidade relativa na esporulação**

Para determinar o efeito da umidade relativa na esporulação, um conjunto de dessecadores foi usado com soluções de sais e sacarose para obter diferentes umidades relativas a 25°C. Utilizou-se as seguintes soluções saturadas e respectivas umidades (%): Nitrato de sódio  $\text{NaNO}_3$  (74,0), Sacarose (85,0), Nitrato de potássio  $\text{KNO}_3$  (92,5), Potássio fosfato monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (96,0) e água destilada (100,0) (WINSTON & BATES, 1960). A umidade dentro dos dessecadores foi verificada através do termohigrômetro “Ratio Signal Remote Thermometer” (Fisher Scientific, Pittsburg, PA). Os dessecadores foram mantidos a 25°C. Quatro conjuntos de 10 discos de folha do tangelo ‘Minneola’ com 4 mm de diâmetro, contendo lesões de mancha marrom de *Alternária*, com 20 a 30 dias de idade, oriundas de infecção natural, foram colocados nos dessecadores por 48 h, e o número de conídios determinado como descrito anteriormente.

#### **2.2.5. Efeito da aplicação de fungicidas na esporulação**

Para verificar o efeito da aplicação de fungicidas na esporulação quatro experimentos foram conduzidos:

No primeiro experimento, os fungicidas foram aplicados em ramos maduros de tangelo ‘Minneola’ com sintoma da doença em campo, empregando-se um pulverizador manual com capacidade para 10 L. Foram usados os seguintes fungicidas nas doses (g ou mL i.a.  $\text{L}^{-1}$ ): 1) pyraclostrobin, aplicado como Comet<sup>®</sup> (0,25); 2) trifloxystrobin, aplicado como Flint 500<sup>®</sup> (0,125); 3) azoxystrobin, aplicado como Amistar<sup>®</sup> (0,19), 4) ferbam, como Ferbam Granuflo<sup>®</sup> (9,1) e 5) hidróxido de cobre, aplicado como Kocide 2000<sup>®</sup> (1,4% de cobre metálico). Um dia após a aplicação, folhas com sintoma foram coletadas arbitrariamente e discos de 4 mm de diâmetro foram usados para determinar o número de conídios. Quatro repetições com 10 discos foram depositados em placa de

Petri com papel de filtro umedecido e o número de conídios foi determinado como descrito anteriormente. A testemunha constituiu-se de discos de folhas sem aplicação.

No segundo experimento verificou-se o efeito de uma única aplicação de fungicida na esporulação. Duas árvores de tangelo 'Minneola' em campo foram pulverizadas, utilizando um pulverizador motorizado num volume total de 8 L de calda por planta. Foram usados os seguintes fungicidas e doses (g ou mL i.a. L<sup>-1</sup>): 1) pyraclostrobin, aplicado como Comet<sup>®</sup> (0,25) e 2) hidróxido de cobre, aplicado como Kocide 2000<sup>®</sup> (1,4% de cobre metálico). Duas plantas sem aplicação de fungicidas foram deixadas como testemunha. Folhas contendo lesões da doença foram colhidas arbitrariamente a 1, 7, 14 e 21 dias após a aplicação dos fungicidas. Quatro repetições de 10 discos cada foram colocadas em papel de filtro umedecido em placas de Petri para a esporulação e o número de conídios foi determinado como descrito anteriormente.

No terceiro experimento determinou-se o efeito de múltiplas aplicações de fungicidas na esporulação em lesões sob condições de campo e em casa de vegetação. Em campo, as aplicações foram feitas em folhas de tangelo 'Minneola' com lesões de 25 a 30 dias de idade, com os fungicidas pyraclostrobin, azoxystrobin e hidróxido de cobre nas dosagens citadas anteriormente. A esporulação foi determinada como já descrita, aos 7, 15 e 28 dias após os tratamentos das folhas, bem como em folhas representadas pela testemunha. Aplicações adicionais com os mesmos fungicidas e doses foram realizadas aos 7 e 15 dias imediatamente após a coleta das amostras.

No quarto experimento, lesões com 25 a 30 dias de idade em folhas de plantas do tangelo 'Minneola' mantidas em casa de vegetação foram pulverizadas com os mesmos fungicidas e doses utilizadas em campo. Folhas com lesões tratadas e folhas referentes à testemunha foram coletadas, e a esporulação determinada como descrita nos experimentos anteriores. Como no experimento em campo, as aplicações foram repetidas depois das amostragens aos 7 e 15 dias.

### **2.2.6. Análise estatística**

O efeito dos fatores para analisar a esporulação foi comparado através de análise de variância. A quantidade final de conídios por  $\text{mm}^2$  de lesão foi transformada em  $\log_{10}$  antes da análise, para normalizar as variâncias.

Cada experimento foi realizado duas vezes e sendo feito análise de variância para cada experimento e a decisão de se fazer uma análise de duas combinações foi tomada com base no resultado do teste F de homogeneidade das variâncias (STEEL & TORRIE, 1960). As médias foram separadas usando o teste de Waller-Duncan k-ratio t test ( $P \leq 0,05$ ). Foram plotados gráficos e curvas de ajustes dos dados obtidos nos experimentos nos quais se testou o efeito da idade da lesão na produção conidial, a relação entre o tempo de deposição das folhas no solo e a umidade relativa, com a produção conidial. Todas as análises foram feitas usando SAS Version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC).

## **2.3. Resultados**

### **2.3.1. Efeito do tipo de órgão, cultivar e idade da lesão na esporulação**

Verificou-se que a esporulação foi maior em lesões em folhas do que em ramos e frutos (Figura 1). A maior quantidade de conídios produzidos ocorreu a partir de 20 dias, estendendo-se até 40 dias após o aparecimento das lesões, para as três cultivares estudadas. Entretanto, a produção de conídios diminuiu aos 50 dias após a formação da lesão (Figura 1 A).

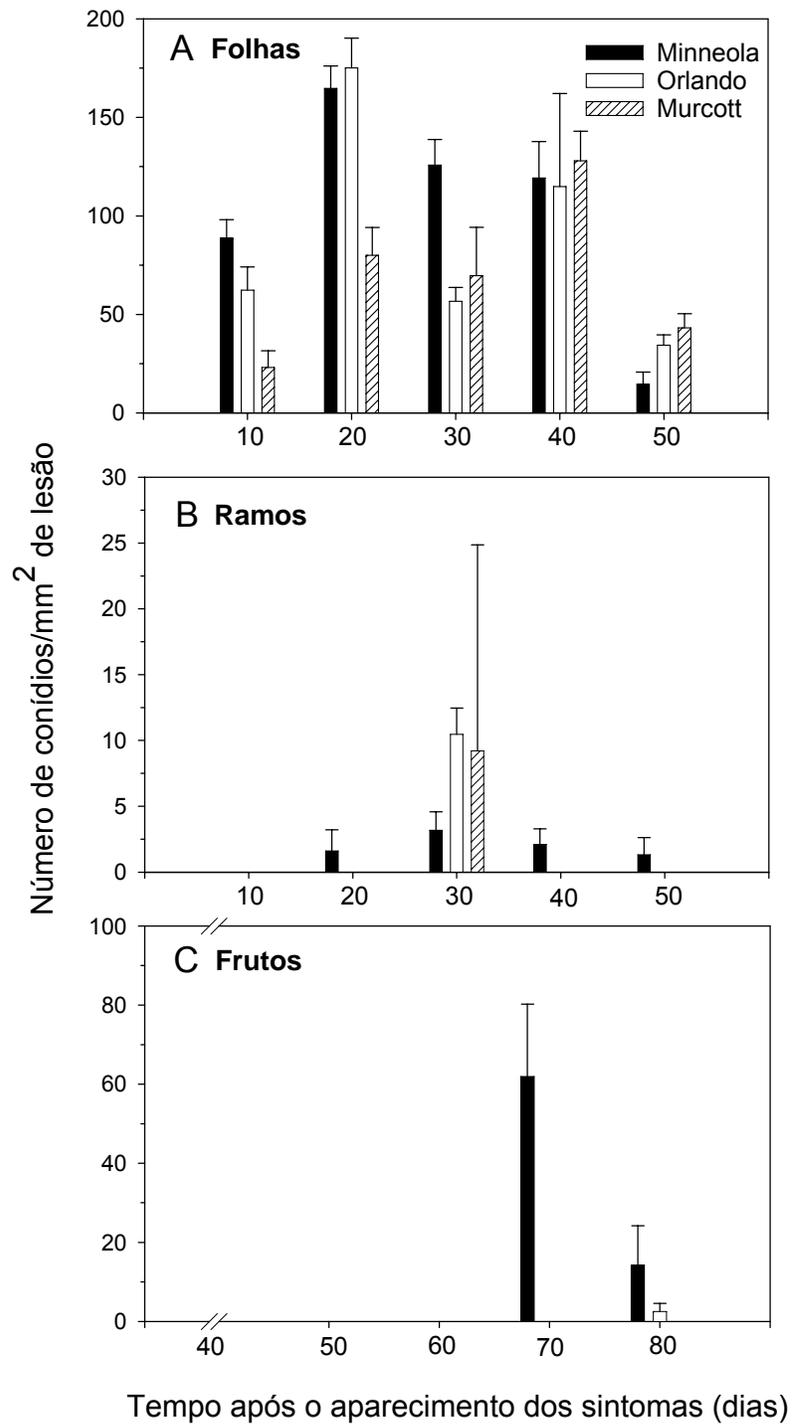


Figura 1. Produção conidial de *Alternaria alternata* em lesões de mancha marrom de Alternária em diferentes tecidos de árvores dos tangelos 'Minneola' e 'Orlando' e do tangor 'Murcott', em função do tempo após o aparecimento do sintoma. **A)** folhas, **B)** ramos e **C)** frutos.

A maior produção conidial em ramos ocorreu cerca de 30 dias após o desenvolvimento do sintoma, para as três cultivares (Figura 1 B). A produção de conídios em frutos foi verificada somente depois de 70 dias após o aparecimento do sintoma em tangelo 'Minneola' (Figura 1 C). No entanto, houve um decréscimo dessa produção aos 80 dias de idade e poucos conídios foram produzidos em frutos de tangelo 'Orlando', e nenhuma produção conidial foi observada em frutos do tangor 'Murcott' (Figura 1 C).

De acordo com a análise de variância, verificou-se que a cultivar teve um efeito significativo na esporulação em lesões em folhas. A produção conidial em folhas foi maior nos tangelos 'Minneola' e 'Orlando', em relação ao tangor 'Murcott', com exceção aos 40 dias de idade (Figura 1 A). Observou-se pouca produção de conídios em lesões de ramos e frutos, inviabilizando a análise estatística. Entretanto, exceto para 30 dias após o desenvolvimento da lesão, conídios em lesões dos ramos foram observados somente no tangelo 'Minneola'.

Em outro experimento, o efeito da idade da lesão em tangelo 'Minneola' foi conduzido em campo e em casa de vegetação. Em campo, a esporulação não teve início antes de duas semanas após a formação da lesão (Figura 2).

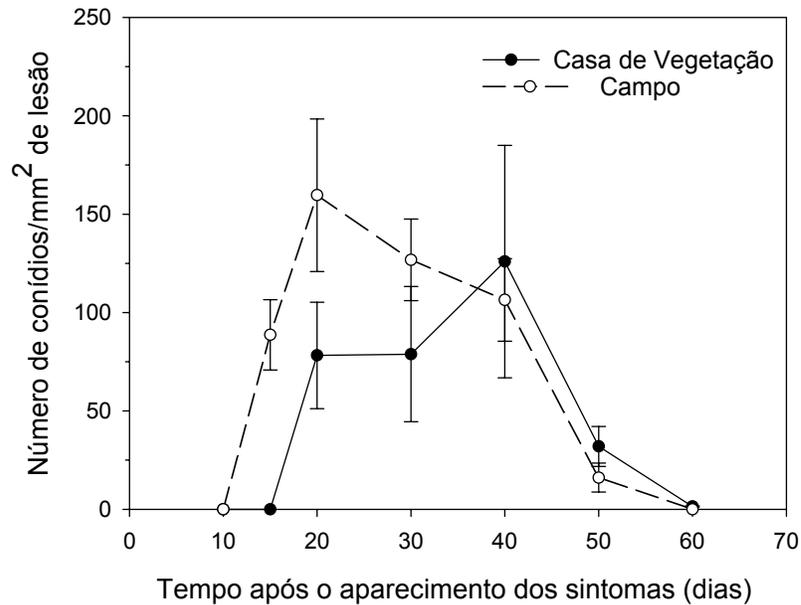


Figura 2. Efeito da idade da lesão na produção conidial de *Alternaria alternata* em lesões de mancha marrom de Alternária em folhas de tangelo 'Minneola', em casa de vegetação e em campo.

O pico de produção conidial deu-se a 20 dias, e manteu-se elevado até 40 dias após a formação da lesão e, depois desse período, houve uma queda acentuada na produção de conídios. Em casa de vegetação, onde folhas permaneceram secas por todo período após a inoculação, a esporulação não se iniciou antes de 20 dias após o aparecimento do sintoma. Assim como em campo, a esporulação ocorreu de forma mais intensa a partir dos 15 a 20 dias, estendendo-se até 40 dias após o aparecimento das lesões e, depois desse período, diminuiu consideravelmente.

Esporulação em folhas sintomáticas colocadas nos pomares sob a copa das árvores cítricas foi iniciada em níveis elevados, a partir do dia zero, prolongando-se até o quarto dia após a colocação dessas folhas no solo (Figura 3). Entretanto, oito dias após a deposição, a esporulação foi praticamente nula até o 12<sup>o</sup> dia. Após esse período, as folhas mostravam-se praticamente decompostas.

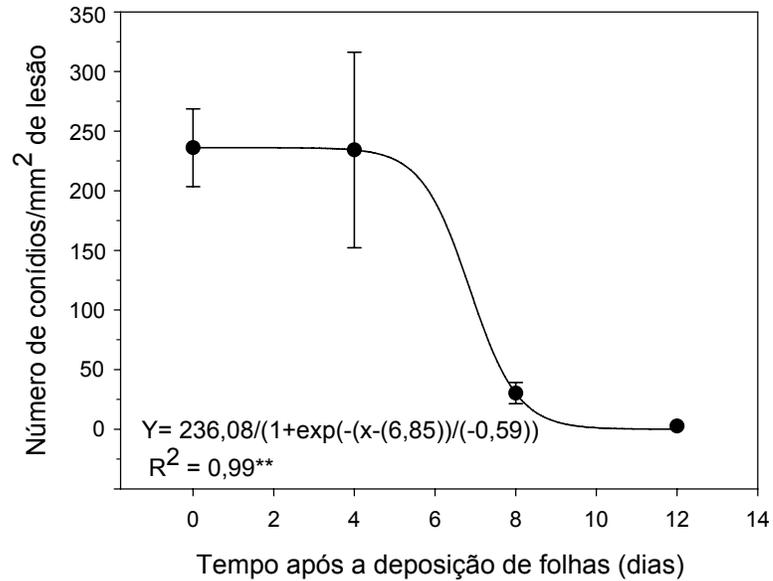


Figura 3. Produção conídica de *Alternaria alternata* em folhas destacadas de tangelo 'Minneola' com sintomas da mancha marrom de Alternária após a deposição das folhas no solo, sob a copa das árvores cítricas. \*\* = significativo ( $P \leq 0,01$ ).

### 2.3.2. Efeito da umidade relativa na esporulação

Verificou-se que o número de conídios produzidos foi baixo a 74% de UR, sendo que a maior produção deu-se a partir de 85% de UR. O pico de produção foi verificado a 96% de UR (Figura 4 A). A porcentagem de lesões produzindo conídios também foi mais baixa a 74% de UR, aumentando a 92,5% e diminuindo ligeiramente a 100% de UR (Figura 4 B).

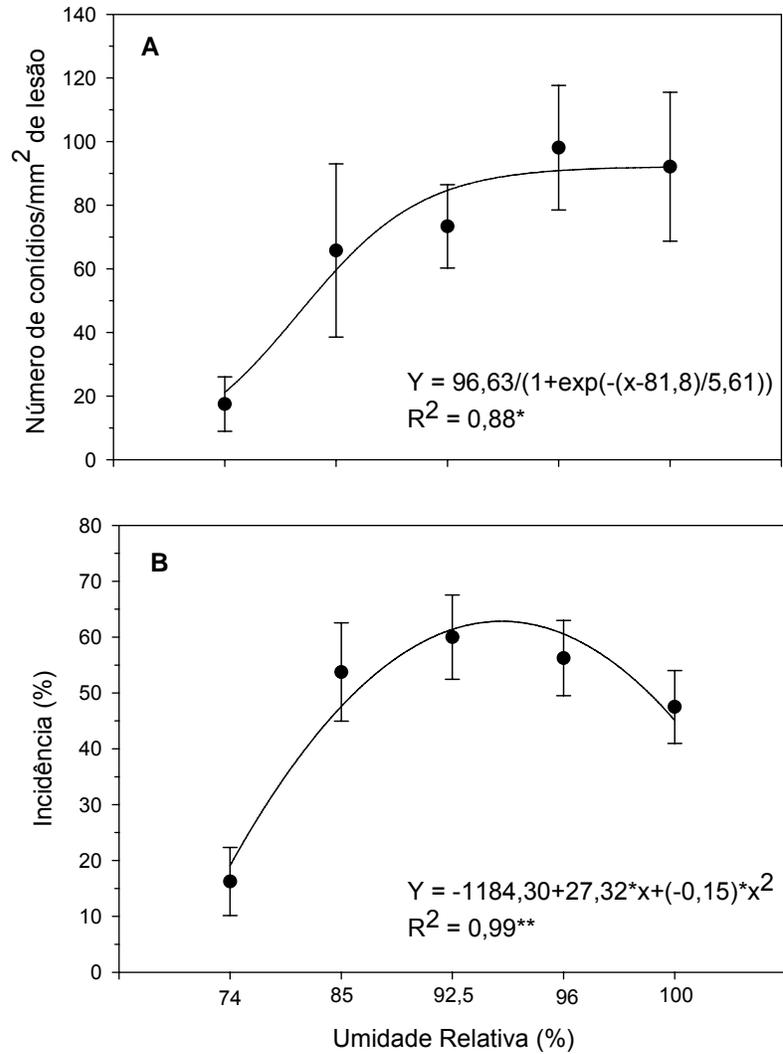


Figura 4. Efeito da umidade relativa em: **A**) esporulação de *Alternaria alternata* em lesões de mancha marrom de Alternária; **B**) porcentagem de lesões com conídios de *Alternaria alternata* presentes em folhas de tangelo 'Minneola' \*\* = significativo ( $P \leq 0,01$ ) e \* significativo ( $P \leq 0,05$ ).

### 2.3.3. Efeito da aplicação de fungicidas na esporulação

No primeiro experimento, os fungicidas pyraclostrobin, trifloxystrobin e azoxystrobin, inibidores da respiração ( $Q_{o1}$ ), bem como o hidróxido de cobre, reduziram substancialmente a esporulação um dia após a aplicação (Tabela 1). Não observou-se diferença significativa entre esses tratamentos. Por outro lado, o fungicida ferbam não reduziu a produção conidial significativamente.

Tabela 1. Efeito de fungicidas na esporulação de *Alternaria alternata* em lesões de mancha marrom de Alternária em tangelo 'Minneola', um dia após a aplicação.

Fungicidas	Dose (g i.a. L <sup>-1</sup> )	Número de conídios/mm <sup>2</sup> de lesão
Pyraclostrobin	0,25	4,1 b <sup>z</sup>
Trifloxystrobin	0,125	3,6 b
Azoxystrobin	0,19	5,8 b
Ferbam	9,1	22,2 a
Hidróxido de cobre	1,4	5,4 b
Testemunha	--	40,5 a

<sup>z</sup>Médias separadas pelo teste de Waller-Duncan k ratio t test, ( $P \leq 0,05$ ). Médias de dois experimentos.

No experimento subsequente, verificou-se o efeito de uma aplicação do fungicida pyraclostrobin e hidróxido de cobre na esporulação em lesões de mancha marrom de Alternária. Verificou-se redução na esporulação para ambos os fungicidas a 1, 7, 14 e 21 dias após aplicação (Figura 5). Verificou-se também que não houve diferença significativa na produção de conídios entre os tratamentos com pyraclostrobin e hidróxido de cobre, em folhas amostradas em diferentes tempos, com exceção aos 14 dias após a aplicação.

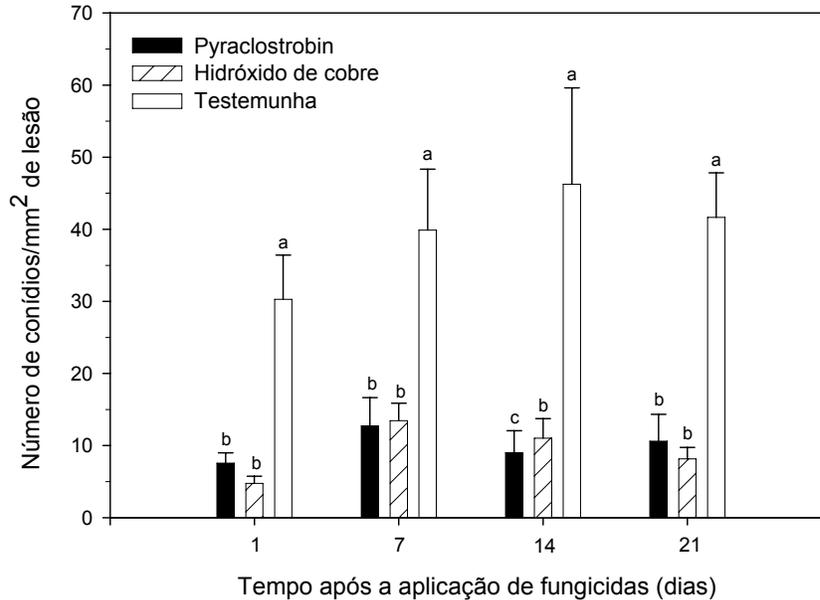


Figura 5. Produção de conídios de *Alternaria alternata* em lesões de mancha marrom de Alternária a 1, 7, 14 e 21 dias após uma aplicação de fungicidas em folhas de tangelo 'Minneola', em campo.

Em outros experimentos conduzidos em casa de vegetação e campo, avaliou-se o efeito do pyraclostrobin, azoxystrobin e do hidróxido de cobre na esporulação, mediante múltiplas aplicações. No experimento em casa de vegetação verificou-se que o hidróxido de cobre não teve efeito significativo na redução na esporulação aos 7 e 15 dias após a aplicação, mas reduziu ligeiramente aos 28 dias (Figura 6 A). Os fungicidas pyraclostrobin e azoxystrobin reduziram a esporulação aos 7 e 14 dias após a aplicação, mas somente o pyraclostrobin reduziu a esporulação após 28 dias. Aos 28 dias a produção conidial foi muito baixa. Em campo, todos os três fungicidas reduziram a produção conidial aos 7 e 14 dias após a primeira aplicação, mas não a 28 dias (Figura 6 B). Na testemunha, a produção conidial foi baixa em lesões correspondentes aos 14 e 28 dias.

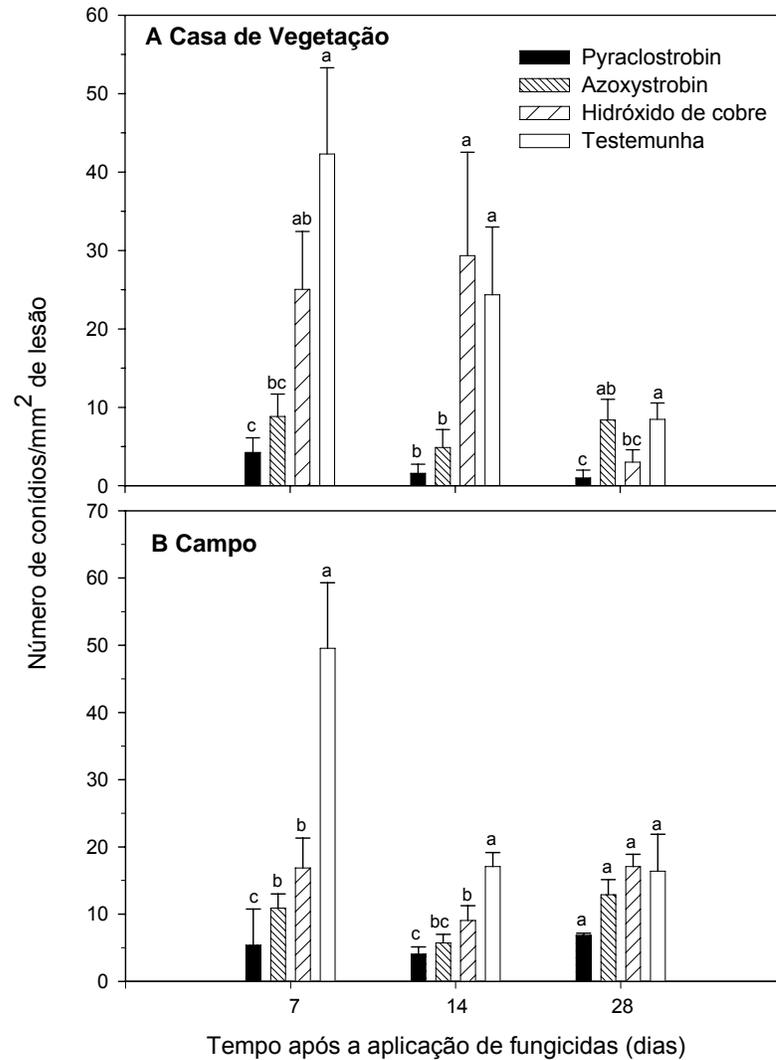


Figura 6. Efeito da aplicação de fungicidas na produção conidial de *Alternaria alternata* em lesões de mancha marrom de Alternária em folhas de tangerelo 'Minneola' a 7, 14 e 28 dias após a primeira aplicação em: **A)** casa de vegetação; **B)** campo.

## 2.4. Discussão

Na literatura existem poucas informações quanto ao efeito das condições ambientais na esporulação de *A. alternata* ou ainda, a duração de produção conidial em lesões de tecidos de citros (WHITESIDE, 1988). Assim como outras espécies de *Alternaria* (STRANDBERG, 1992; ROTEM, 1994), *A. alternata* em citros é um fungo necrotrófico que produz lesões necróticas em folhas, ramos e frutos pela produção de toxina específica ao hospedeiro (HST) (KOHMOTO et al., 1991; TIMMER et al., 2003). Observou-se no presente estudo que a esporulação de *A. alternata* iniciou-se cerca de 10 dias após a formação do sintoma em folhas, estendendo-se até aos 40 dias. Aproximadamente aos 50 dias após o aparecimento do sintoma, a queda da produção de conídios foi bastante acentuada.

Segundo WHITESIDE (1988), a esporulação de *Alternaria alternata* foi mais abundante em folhas do que em frutos. Essas observações indicaram que a maioria das folhas infectadas caía antes do inverno, levando-se a deduzir então, que o patógeno poderia sobreviver em ramos no inverno. No decorrer do presente trabalho observou-se muitas infecções em folhas, ramos e frutos em árvores durante o inverno. Embora tenha sido demonstrado nesse estudo pouca esporulação em lesões em ramos com 60-70 dias de idade, essas lesões podem ser capazes de produzir poucos conídios que, de tal maneira, serviriam como fonte primária de inóculo no início da primavera. Lesões em frutos tendem a requerer mais tempo para produzir conídios, sendo consideravelmente em menor número. A maioria das tangerinas e seus híbridos são colhidos no final do outono ou no início do inverno, removendo frutos que poderiam servir como fonte de inóculo. Entretanto, para os híbridos de maturação tardia como o tangor 'Murcott', com florescimento em época diferente de outras cultivares, também podem servir como uma fonte primária de inóculo.

Estudos comparativos não têm sido conduzidos para mensurar a esporulação em órgãos vegetais, em diferentes cultivares. Lesões em tangelos 'Minneola' e 'Orlando' mostraram-se de maior tamanho do que aquelas em híbrido menos suscetível, como o tangor 'Murcott' (TIMMER et al., 2000a). Dessa forma, pode-se esperar que mais

conídios estariam sendo produzidos em pomares de cultivares altamente suscetíveis do que em cultivares menos suscetíveis. Além do mais, demonstrou-se que a produção conidial em cultivares mais suscetíveis é também superior por unidade de lesão foliar.

Em estudos prévios, verificou-se que a produção conidial foi mais elevada quando folhas com sintomas foram mantidas ligeiramente umedecidas, ou contidas em ambiente com altos teores de umidade (TIMMER et al., 1998). *Alternaria* spp. são conhecidas por sobreviver em condições de locais semi-áridos (ROTEM, 1994) e a mancha marrom de Alternária é um sério problema em áreas de citros nessas regiões (SOLEL, 1991; TIMMER et al., 2003). No presente estudo verificou-se que a esporulação ocorreu em maior quantidade a partir de ambiente com UR superior a 85%. Em estudos preliminares conduzidos por TIMMER et al. (2000) verificaram que a presença de água livre na superfície das folhas não é um fator importante para produção conidial. Tal fato foi também confirmado no presente estudo.

Um possível problema no monitoramento da esporulação é a presença de *Alternaria alternata* saprófita, que está presente amplamente em pomares de citros (TIMMER et al., 2003). No entanto, neste estudo, conidióforos foram observados emergindo diretamente da área da lesão, sendo, pois, menos provável que os mesmos constituíssem-se em saprófitas. Em estudos anteriores, usando placas contendo meio de cultura seletivo como descrito por PRYOR et al. (1994), porém, substituindo o triadimefon e thiabendazole por benomyl a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , conídios carregados pelo ar, em um pomar com mancha marrom, TIMMER et al. (1998) verificaram que menos de 1% de isolados capturados eram saprófitas. Desse modo, a maioria de conídios medidos neste estudo possivelmente foram semelhantes aos produzidos por isolados patogênicos, embora não se possa eliminar a possibilidade de alguns conídios serem saprófitas.

Fungicidas que estão usualmente recomendados para o controle de MMA, na Flórida, são à base de cobre, os fungicidas Q<sub>0</sub>I, bem como o Ferbam e óleo NIM sob certas circunstâncias (TIMMER et al., 2005). No Brasil, o fungicida pyraclostrobin aplicado em combinação e alternado com fungicidas à base de cobre tem se mostrado eficiente no controle da doença (REIS et al., 2006c). Fungicidas cúpricos e os

fungicidas Q<sub>0</sub>I são altamente efetivos na prevenção da infecção e redução da incidência da doença (TIMMER & ZITKO, 1999; TIMMER, 2000b; PERES & TIMMER, 2006). Entretanto, sua efetividade na redução na produção de inóculo da mancha marrom de *Alternária* era ainda desconhecida. A habilidade dos fungicidas Q<sub>0</sub>I para reduzir a esporulação de outros fungos em citros (BUSHONG et al., 2000) e em muitas outras culturas tem sido bem relatada na literatura (YPEMA & GOLD, 1991; BARTLETT et al., 2002). Baseado na presente pesquisa, parece que os fungicidas Q<sub>0</sub>I e, exceto em um experimento, o fungicida à base de cobre, inibiram substancialmente a esporulação de *A. alternata* e, dessa forma, reduziram a pressão da doença.

Múltiplas pulverizações para a mesma lesão parece não ter um grande efeito na redução da esporulação do que uma única aplicação, embora elas não tenham sido comparadas diretamente nesse experimento. Entretanto, subseqüentes aplicações reduzem a esporulação em novas lesões formadas. Na prática, pomares podem requerer aplicações semanais, ao invés de mensais, a partir das primeiras brotações na primavera até a metade do verão, dependendo da cultivar e do histórico da doença na área (TIMMER et al., 2000; BHATIA & TIMMER, 2003; PERES & TIMMER, 2006). No desenvolvimento do modelo de previsão Alter-Rater (TIMMER et al., 2000; TIMMER et al., 2001) foram impossibilitados de relatar a contagem de conídios carregados pelo vento e que certamente contribuiriam para a incidência da doença. Desse modo, áreas fortemente infestadas, contendo provavelmente elevados níveis de inóculo, associados a fatores climáticos favoráveis, certamente são os determinantes primários para maior incidência e severidade da doença.

Medidas culturais como espaçamentos mais largos para melhorar a circulação de ar e o uso de cultivares suscetíveis em locais com boa circulação de ar não somente podem ajudar na redução da infecção, como também na redução da produção de inóculo, por diminuir a duração dos períodos de molhamento das folhas (TIMMER et al., 2005). Cobre e fungicidas Q<sub>0</sub>I reduzem o inóculo por reduzir a formação de lesão e a produção de inóculo diretamente em lesões existentes. Colheitas de frutos antes do desenvolvimento da brotação da primavera podem ajudar a reduzir inóculo primário. Pomares plantados em maiores espaçamentos para melhorar a circulação de ar,

associado às aplicações de fungicidas na folhagem, podem servir para reduzir a pressão da doença nos frutos.

## 2.5. Conclusões

Folhas produzem mais conídios de *A. alternata* em relação a ramos e frutos, pelo menos até 50 dias de idade, em tangelos 'Minneola' e 'Orlando' e em tangor 'Murcott'.

Folhas caídas prematuramente em função de lesões produzidas pelo patógeno são fontes de inóculo até 8 dias após sua queda.

Umidade relativa acima de 85% propicia aumento da produção de conídios em folhas de tangelo 'Minneola'.

Os fungicidas pyraclostrobin, azoxystrobin, trifloxystrobin e hidróxido de cobre reduzem a produção conidial em lesões de mancha marrom de *Alternaria*.

## 2.6. Referências

ANDERSON, B.; HANSEN, M. E.; SMEDSGAARD, J. Automated and unbiased image analysis as tools in phenotype classification of small-spored *Alternaria* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 9, p. 1021-1029, 2005.

BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Managing Science**, London, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002.

BHATIA, A.; TIMMER, L. W. Evaluation of the Alter-Rater model for timing of fungicide applications for control of *Alternaria* brown spot of citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 9, p. 1089-1093, 2003.

BUSHONG, P. M.; TIMMER, L. W. Evaluation of postinfection control of citrus scab and melanose with benomyl, fenbuconazole, and azoxystrobin. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 11, p. 1246-1249, 2000.

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**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 429-433, 1999.

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.

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.

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**, St. Paul, v. 89, n. 10, p. 851-860, 1999.

PEEVER, T. L.; SU, G.; CARPENTER-BOGGS, L.; TIMMER, L. W. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, Lawrence, v. 96, n. 1, p. 119-134, 2004.

PEEVER, T. L.; CARPENTER-BOGGS, L.; TIMMER, L. W.; CARRIA, L. M.; BHATIA, A. Citrus black rot is caused by phylogenetically distinct lineages of *Alternaria*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 5, p. 512-518, 2005.

PERES, N. A.; TIMMER, L. W. Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangerine in Brazil. **Crop Protection**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 454-460, 2006.

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

PRYOR, B. M.; DAVIS, R. M.; GILBERTSON, R. L. Detection and eradication of *Alternaria radicina* on carrot seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 5, p. 452-456, 1994.

ROTEM, J. The effect of weather on Epidemics. In: \_\_\_\_\_. **The genus *Alternaria* – biology, epidemiology and pathogenicity**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 1994. cap. 9, p. 155-165.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* themes and variations (226-235): Classification of citrus pathogens. **Mycotaxon**, Ithaca, v.70, n. 1, p. 263-323, 1999.

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

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. Comparisons involving two sample means. In: \_\_\_\_\_. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill, 1960. cap. 5, p. 67-87.

STRANDBERG, J. O. *Alternaria* species that attack vegetable crops: biology and options for disease management. In: CHELKOWSKI, J.; VISCONTI, A. ***Alternaria* – biology: plant diseases and metabolites**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 175-208.

TIMMER, L. W. Evaluation of fungicides for control of *Alternaria* brown spot of citrus, 1998. **Fungicide and Nematicide Tests**: report 55. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2000. Disponível em: <<http://apsnet.org/online/FNtests/vol55/>>. Acesso em 15-julho. 2006.

TIMMER, L. W.; ZITKO, S. E. Evaluation of fungicides for control of *Alternaria* brown spot, 1997. **Fungicide and Nematicide Tests**: report 54. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1999. Disponível em: <<http://apsnet.org/online/FNtests/vol/>>. Acesso em 15-julho. 2006.

TIMMER, L. W.; ROGERS, M. E.; BUKER, R. S. **Florida citrus pest management guide**. Gainesville: University of Florida, (Publ. No. SP – 43), 2005.

TIMMER, L. W.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T. R.; IBÁÑEZ, A. M.; ZITKO, S. E. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 11, p. 1218-1223, 1998.

TIMMER, L. W.; SOLEL, Z.; OROZCO-SANTOS, M. *Alternaria* brown spot of mandarins. In: TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. **Compendium of Citrus Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000a, p. 18-19.

TIMMER, L. W.; DARHOWER, H. M., ZITKO, S. E.; PEEVER, T. L.; IBÁÑEZ, 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, 2000b.

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.

WHITESIDE, J. O. Alternaria brown spot of mandarins. In: WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. **Compendium of Citrus Diseases**. St Paul: American Phytopathological Society Press, 1988, p. 8.

WINSTON, P. W.; BATES, D. H. Saturated solutions for control of humidity in biological research. **Ecology**, Washington, v. 41, n. 1, p. 232-237, 1960.

YPEMA, H. L.; GOLD, R. E. Kresoxim-methyl, modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 1, p. 4-19, 1991.

### **CAPÍTULO 3 – Suscetibilidade de Folhas e Frutos de Tangerinas, Tangelos, Tangores e Mandarinas à *Alternaria alternata***

**RESUMO** – *Alternaria alternata* produz toxina específica ao hospedeiro (HST), a ACT – toxina, produzida pelo patotipo tangerina que afeta folhas, ramos e frutos de tangerinas e seus híbridos. Este estudo teve como objetivo determinar o efeito da idade de folhas no número e no tamanho de lesões, bem como determinar a relação entre o tamanho de frutos e a severidade da doença. Utilizou-se os tangelos ‘Minneola’ e ‘Orlando’, as mandarinas ‘Sunburst’ e ‘Nova’, o tangor ‘Murcott’ e a tangerina ‘Dancy’, cujas, folhas foram inoculadas em diferentes estádios de desenvolvimento. Para verificar a suscetibilidade em frutos, utilizou-se frutos de ‘Minneola’ e ‘Orlando’, de ‘Murcott’ e de ‘Dancy’. Folhas de ‘Minneola’ mostraram-se mais suscetíveis, apresentando lesões após 20 dias de idade, sempre em maior número e tamanho, seguida da tangerina ‘Dancy’. O híbrido ‘Nova’ mostrou-se mais resistente à infecção, sendo que, a partir de 16 dias idade, apresentou poucas lesões de tamanho reduzido, seguido do híbrido tangor ‘Murcott’. Os híbridos ‘Orlando’ e ‘Sunburst’ mostraram suscetibilidade intermediária, nas quais poucas lesões de tamanho reduzido foram verificadas em folhas aos 20 dias de idade. Verificou-se correlação negativa entre tamanho dos frutos e severidade da doença para ‘Minneola’ e ‘Orlando’ e para ‘Murcott’, inoculados em condições de campo. Os frutos de ‘Minneola’ e ‘Orlando’ mostraram-se suscetíveis até 6-7 cm de diâmetro, tornando-se mais resistentes após este tamanho, enquanto que para os frutos do ‘Murcott’ essa suscetibilidade ocorrera até 4-5 cm de diâmetro. Em frutos de tangerina ‘Dancy’ inoculados sob condições de campo não observou-se correlação entre essas variáveis, porém esses frutos foram suscetíveis até 6 cm de diâmetro. Mediante inoculações em casa de vegetação constatou-se alta correlação negativa para essas variáveis, em frutos de tangerina ‘Dancy’ e do tangor ‘Murcott’.

**Palavras-chaves:** *Citrus reticulata*, resistência, severidade

### 3.1. Introdução

A mancha marrom de *Alternária* causa lesões em folhas, ramos e frutos de tangerinas e seus híbridos. O primeiro relato da doença ocorreu na Austrália, sobre mandarinas Emperor (KIELY, 1964; PEGG, 1966). Desde então, a doença tem ocorrido de forma endêmica em praticamente todos os continentes onde a cultura dos citros é plantada, causando sérios prejuízos aos citricultores de tangerinas e seus híbridos (TIMMER et al., 2000; SOLEL, 1991).

Dois patotipos de *A. alternata* têm sido descritos como agentes de mancha marrom de *Alternária*, baseados na sua especificidade ao hospedeiro (HST). Tais patotipos são: ACT – toxina, do patotipo tangerina, atacando somente as tangerinas e seus híbridos e ACR – toxina, patotipo limão, afetando os limões ‘Rugoso’ (*Citrus jambhiri* Lush.) e ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) (KOHMOTO et al., 1979; PEEVER, 2002).

Conídios de *A. alternata* são produzidos principalmente em folhas, de onde são dispersos através de vento, chuva/vento ou irrigação aérea sobre lesões infectadas. A produção conidial em folhas de tangelos ‘Minneola’ e ‘Orlando’ (*C. paradisi* Macfad. x *Citrus reticulata* Blanco) iniciam-se em lesões com cerca de 10 dias de idade e se estendem até 40 dias (REIS et al., 2006a).

Os sintomas podem aparecer em 24 h após a infecção. Entretanto, lesões usualmente continuam a expandir e grandes áreas da folha podem ser mortas pela ação da toxina (KOHMOTO et al., 1993). Os sintomas da doença em folhas jovens geralmente aparecem de forma irregular e de aparência necrótica, na forma de lesões de coloração marrom para preta e de tamanho variado. Pontas de ramos severamente atacados apresentam-se completamente desfolhados e, em frutos, os sintomas aparecem como manchas circulares de coloração marrom claro a escura, e ligeiramente deprimidas. Frutos atacados ainda jovens geralmente caem prematuramente, ou quando atacados em estágio mais avançados, perdem seu valor comercial, resultando em importante perda econômica (VICENT, 2000).

Por meio de inoculações artificiais em folhas e frutos, tem-se estudado a suscetibilidade e resistência de *Citrus* spp. à *A. alternata* (PEGG, 1966; HUTTON &

MAYERS, 1988; SOLEL & KIMCHI, 1997). Nesses estudos verificou-se entre outros híbridos, a suscetibilidade da mandarina 'King' (*C. nobilis* Lour.), dos tangelos 'Minneola' e 'Orlando', dos híbridos de mandarina 'Nova' e 'Page' e a suscetibilidade de grapefruit (*C. paradisi*), bem como, a resistência da cultivar Avana (*C. deliciosa* Ten.).

O objetivo do presente estudo foi: (i) determinar a resistência de folhas em diferentes estádios de maturação, em seis cultivares cítricos e (ii) determinar a resistência do fruto à mancha marrom de *Alternária*, em função de seu estágio fenológico, para quatro cultivares cítricos.

## 3.2. Material e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido na área Experimental do CREC “Citrus Research and Education Center” – University of Florida, Lake Alfred, FL, EUA, e no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp-Jaboticabal.

### 3.2.1. Preparo do inóculo

As inoculações de *A. alternaria*, tanto em folhas como em frutos, realizadas no “Citrus Research and Education Center” foram feitas usando o isolado EV-31s, do patotipo tangerina, proveniente de folha de tangelo ‘Minneola’ (*C. paradisi* x *C. reticulata*), enquanto que nas inoculações realizadas no Laboratório de Fitopatologia Unesp-Jaboticabal foi utilizado o isolado MCT-28, proveniente de folhas do tangor ‘Murcott’ (*C. reticulata* x *C. sinensis* (L.) Osbeck).

Conídios foram produzidos em meio de cultura, seguindo a metodologia adotada por CANIHOS et al. (1999). No processo de isolamento do fungo, pequenos fragmentos de tecido foliar com sintomas da doença foram imersos em álcool a 50%, por 30 segundos e em seguida, numa solução de hipoclorito de sódio a 5% e água na proporção de 1:3 (v/v), durante dois minutos. Esses fragmentos foram enxaguados em água destilada e esterilizada e depositados em meio de batata-dextrose-ágar, incubados em fotoperíodo de 12/12 h, sob luz fluorescente a 27°C, por 3 a 5 dias. Após esse período, a superfície das placas contendo a massa micelial foi raspada com um bisturi para remover o micélio, e as colônias foram cortadas em pedaços de cerca de 4 mm<sup>2</sup>. Em seguida, cerca de 100 pedaços foram transferidos para placas contendo meio para a esporulação, preparado com 30 g de CaCO<sub>3</sub>, 20 g de sacarose e 20 g de ágar por litro de água destilada. Adicionou-se dois mililitros de água destilada esterilizada em cada placa e essas foram incubadas em fotoperíodo de 12/12 h, sob luz fluorescente a 27°C por 3 a 4 dias para a produção de conídios.

Os conídios foram coletados adicionando-se 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa, e as colônias raspadas suavemente com um pincel. A suspensão foi filtrada usando duas camadas de gaze esterilizada para remover fragmentos de micélio, seguido de centrifugação, por 20 minutos em 6000 *g*.

Experimentos preliminares, usando concentrações de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, mostraram que a concentração de  $10^4$  proporcionou uma melhor contagem de número de lesões em cada folha, sendo esta a concentração utilizada. Tal concentração foi ajustada com o auxílio de um hemocitômetro.

### 3.2.2. Efeito da idade da folha no número e no tamanho de lesões

Para determinar o efeito da idade da folha no número e tamanho de lesões de mancha marrom de *Alternária*, folhas de plantas de tangelos 'Minneola' e 'Orlando' (*Citrus paradisi* x *C. reticulata*), das mandarinas 'Sunburst' [*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. reticulata*)] x híbrido 'Orlando' e 'Nova' [*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. reticulata*)], de tangor 'Murcott' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e de tangerina 'Dancy' (*C. reticulata*), mantidas em casa de vegetação, foram inoculadas em diferentes estádios de maturação. Os estádios de maturação usados foram agrupados através da idade representada em dias após a brotação, cujos grupos foram: 1-5; 6-10, 11-15; 16-20 e mais de 20 dias de idade.

Brotações foram monitoradas e inoculadas usando o isolado EV-31s de folha de tangelo 'Minneola', na concentração citada anteriormente, utilizando quatro repetições contendo 10 folhas cada, distribuídas em 2-3 plantas para cada estágio de maturação, em cada efeito estudado. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com saco de polietileno transparente para formação de câmara úmida e colocadas em sala de nebulização por 14-16 h a 22-26°C. O número e o tamanho de lesões foram contados em folhas, 3-4 dias após as inoculações.

### 3.2.3. Efeito do tamanho do fruto na severidade da doença

Frutos de plantas de tangelos 'Minneola' e 'Orlando', tangor 'Murcott' e de tangerina 'Dancy', localizados na área experimental do CREC, foram inoculados usando o isolado EV-31s na concentração de  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup> e ensacados por 16-18 h com saco de polietileno borrifado com água para formação de câmara úmida.

Os frutos foram inoculados a partir de 1-2 cm de diâmetro para todas as cultivares estudadas, os quais se encontravam com cerca de 30 dias de idade a partir da queda de  $\frac{3}{4}$  de pétalas. O diâmetro dos frutos foi medido com um paquímetro. As inoculações foram realizadas sempre no período da tarde, quando a umidade relativa se encontrava mais alta.

A severidade da doença foi avaliada 3-4 dias após as inoculações, usando uma escala de nota de 0-3, sendo: 0) sem sintomas; 1) 1 a 3 lesões; 2) 4 a 6 lesões e 3) 7 ou mais lesões. Realizou-se avaliação adicional em frutos de tangerina 'Dancy', cujo objetivo foi verificar o aparecimento de sintomas tardios.

Em experimentos adicionais realizados no Laboratório de Fitopatologia da FCAV-Unesp, frutos de tangerina 'Dancy' e de tangor 'Murcott' foram inoculados em diferentes diâmetros, sob condições de ambiente controlado. Frutos inoculados foram ensacados com saco de polietileno transparente para promover câmara úmida e mantidos por 16-18 h em sala de nebulização, com aproximadamente 98% de umidade relativa a 24-26°C.

A severidade da doença foi avaliada de acordo com a escala de nota citada anteriormente, 2-3 dias após a inoculação. A quantidade de frutos inoculados para ambos os experimentos variou de 10 a 25 frutos para cada cultivar e para cada tamanho.

### **3.2.4. Análise estatística**

O efeito da idade das folhas no número e tamanho médio das lesões foi comparado através da análise de variância.

Os experimentos em folhas e frutos realizados na FCAV-Unesp, foram feitos duas vezes. Com base no resultado do teste F de homogeneidade das variâncias (STEEL & TORRIE, 1960), julgou-se tecnicamente justificável fazer uma análise conjunta dos dois experimentos.

As médias foram separadas usando o teste de Waller-Duncan k-ratio t test ( $P \leq 0,05$ ), sendo feitas curvas de ajustes para os experimentos de relação entre o diâmetro de frutos com a severidade da doença. Todas as análises foram feitas usando SAS Version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC).

## **3.3. Resultados**

### **3.3.1. Efeito da idade da folha no número de lesões**

O número médio de lesões por folha, em cada grupo de estágio de maturação das cultivares estudadas, encontra-se representado na Figura 1.

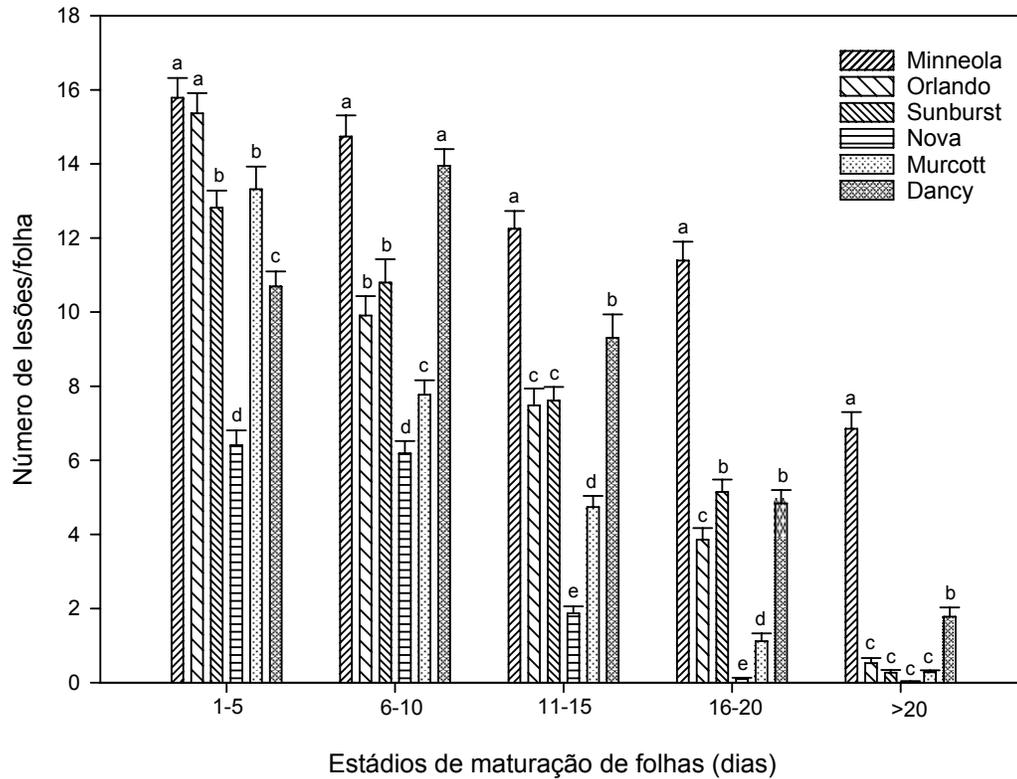


Figura 1. Número de lesões de mancha marrom de *Alternária* causada por *Alternaria alternata* inoculada em folhas de diferentes cultivares e em diferentes estádios de maturação.

A quantidade de lesões em folhas ocorreu de forma variável para cada estágio de maturação, nas cultivares analisadas. Lesões de mancha marrom de *Alternária* diminuíram em relação ao avanço da maturação. Folhas do tangelo ‘Minneola’ mostraram maior número médio de lesões em todos os estádios de maturação (Figura 1). Todas as cultivares, com exceção do híbrido ‘Nova’ e do tangor ‘Murcott’, apresentaram menos de duas lesões em folhas com 16-20 dias de idade. Folhas de ‘Nova’ mostraram-se com menor número de lesões em todos os estádios de maturação, sendo que folhas inoculadas a partir de 16 dias de idade não apresentaram sintomas da doença (Figura 1).

Com exceção de folhas do tangelo ‘Minneola’ e da tangerina ‘Dancy’, as demais cultivares apresentaram menos de uma lesão quando inoculadas a partir de 20 dias de idade. De modo geral, o maior número de lesões ocorreu quando essas foram

inoculadas até 10 dias de idade, havendo, a partir de então, reduções no número de lesões.

Folhas de tangelo 'Orlando' e da mandarina 'Sunburst' apresentaram maior número de lesões quando inoculadas até o 5<sup>o</sup> dia de idade. Entretanto, apresentaram número intermediário de lesões, quando inoculadas entre o 6<sup>o</sup> e até o 15<sup>o</sup> dia de idade. Por outro lado, folhas de tangerina 'Dancy' inoculadas entre o 6<sup>o</sup> e até o 10<sup>o</sup> dia de idade apresentaram maior quantidade de doença. A partir do 11<sup>o</sup> dia de idade, observou-se menor número de lesões.

### **3.3.2. Efeito da idade da folha no tamanho de lesões**

Lesões de mancha marrom de *Alternária*, originadas de inoculações artificiais em folhas com diferentes estádios de maturação, apresentaram tamanho médio variado, de acordo com as cultivares estudadas (Figura 2).

O tamanho médio das lesões foi menor na medida em que folhas foram inoculadas em estádio de maturação mais avançado. As maiores lesões ocorreram em folhas de tangelo 'Minneola', independente da idade. Por outro lado, as menores lesões ocorreram em folhas do híbrido 'Nova', independente do estádio de maturação em que foram inoculadas (Figura 2). Nessa cultivar, a partir do 16<sup>o</sup> dia de idade, não observou-se sintomas da doença nas folhas inoculadas.

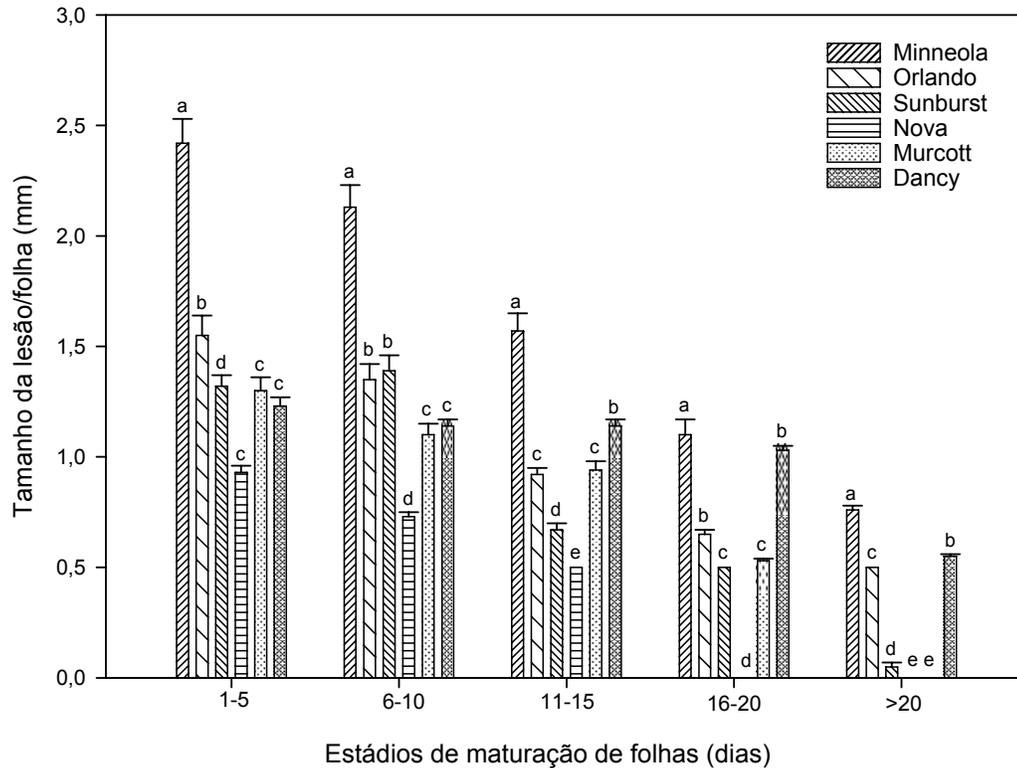


Figura 2. Tamanho de lesões de mancha marrom de *Alternaria* causada por *Alternaria alternata* em folhas de diferentes cultivares e estádios de maturação.

Verificou-se que as lesões formadas em folhas de tangelo ‘Orlando’ e de mandarina ‘Sunburst’ apresentaram tamanho intermediário quando inoculadas até o 15<sup>o</sup> dia de idade, enquanto que em inoculações realizadas a partir do 16<sup>o</sup> dia de idade, as lesões tornaram-se menores, principalmente na cultivar Sunburst, a partir do 20<sup>o</sup> dia de idade. Folhas de tangerina ‘Dancy’ tiveram lesões de tamanho mais uniforme, independente do estágio de maturação, com exceção do último estágio. Em relação às folhas de tangor ‘Murcott’, essas apresentaram pequenas lesões entre o 16<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias de idade, e nenhum sintoma foi observado quando inoculadas a partir de 20 dias de idade.

### 3.3.3. Efeito do tamanho do fruto na severidade da doença

Verificou-se correlação negativa significativa entre o tamanho de frutos e a severidade de mancha marrom de *Alternária*, sob condições de campo. O tamanho de frutos influenciou diretamente na severidade da doença para frutos de tangelos 'Minneola' ( $P \leq 0,01$ ;  $R^2 = 0,92$ ) e para os de 'Orlando' ( $P \leq 0,01$ ;  $R^2 = 0,94$ ) (Figura 3 A e B, respectivamente). Igualmente, verificou-se uma correlação negativa para frutos do tangor 'Murcott' ( $P \leq 0,05$ ;  $R^2 = 0,64$ ) (Figura 3 C). No entanto, não observou-se correlação negativa significativa para frutos de tangerina 'Dancy' ( $P \geq 0,05$ ;  $R^2 = 0,62$ ) (Figura 3 D).

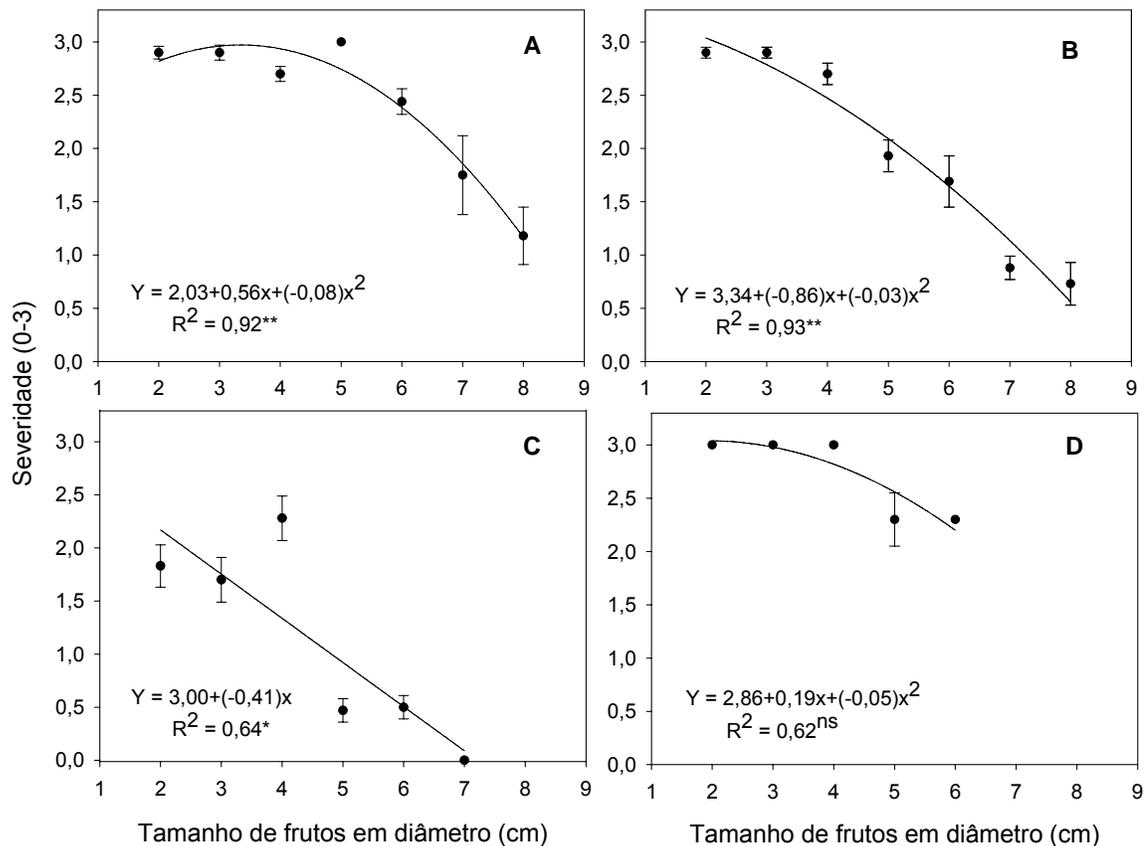


Figura 3. Severidade de mancha marrom de *Alternária* causada por *Alternaria alternata* inoculado em frutos de diferentes tamanhos (cm), sob condições de campo, nas cultivares: **A)** tangelos 'Minneola' e **B)** 'Orlando'; **C)** tangor 'Murcott' e **D)** tangerina 'Dancy'. \*\* Significativo ( $P \leq 0,01$ ); \* ( $P \leq 0,05$ ); <sup>ns</sup> = não significativo.

Frutos de 'Minneola' mostraram alta severidade da doença, quando esses foram inoculados ao apresentarem até 6 cm de diâmetro (Figura 3 A), o que correspondeu a cerca de 130 a 150 dias após a queda de pétalas. Entretanto, observou-se uma queda significativa da severidade da doença, em frutos que foram inoculados com 7 cm de diâmetro e pouca doença em frutos cuja inoculação foi realizada quando esses se encontravam com 8 cm de diâmetro. De forma semelhante, frutos do tangelo 'Orlando' mostraram alta severidade da doença quando apresentavam cerca de 4 cm de diâmetro, enquanto que em frutos medindo de 5 a 6 cm de diâmetro, ou seja, quando frutos estavam com cerca de 150 dias de idade após a queda de pétalas, o nível de severidade foi ligeiramente menor. Pouca doença foi observada em frutos inoculados com 7 ou 8 cm de diâmetro (Figura 3 B).

Frutos de tangor 'Murcott' apresentaram maiores valores de severidade da doença aos 4 cm de diâmetro, embora tenha-se verificado menor severidade, quando frutos estavam na faixa de 2 a 3 cm de diâmetro. Para este híbrido, baixa severidade da doença foi observada em frutos com tamanho superior ou igual a 5 cm de diâmetro (Figura 3 C).

De acordo com a Figura 3 D, frutos de tangerina 'Dancy' mostraram alta severidade da doença até 6 cm de diâmetro, embora frutos, a partir de 5 cm, apresentaram menor quantidade de doença em relação aos frutos, cujas inoculações foram realizadas em até 4 cm de diâmetro.

Verificou-se em estudos realizados em casa de vegetação, correlação negativa significativa entre o tamanho de frutos e severidade da doença, para a tangerina 'Dancy' ( $P \leq 0,01$ ;  $R^2 = 0,98$ ) e para o tangor 'Murcott' ( $P \leq 0,01$ ;  $R^2 = 0,95$ ) (Figura 4 A e B, respectivamente).

Frutos de tangerina 'Dancy' apresentaram elevados níveis de severidade em todo o desenvolvimento (Figura 4 A). Em relação aos do tangor 'Murcott', esses apresentaram maior suscetibilidade à *A. alternata*, até quando inoculados aos 4 cm de diâmetro (Figura 4 B).

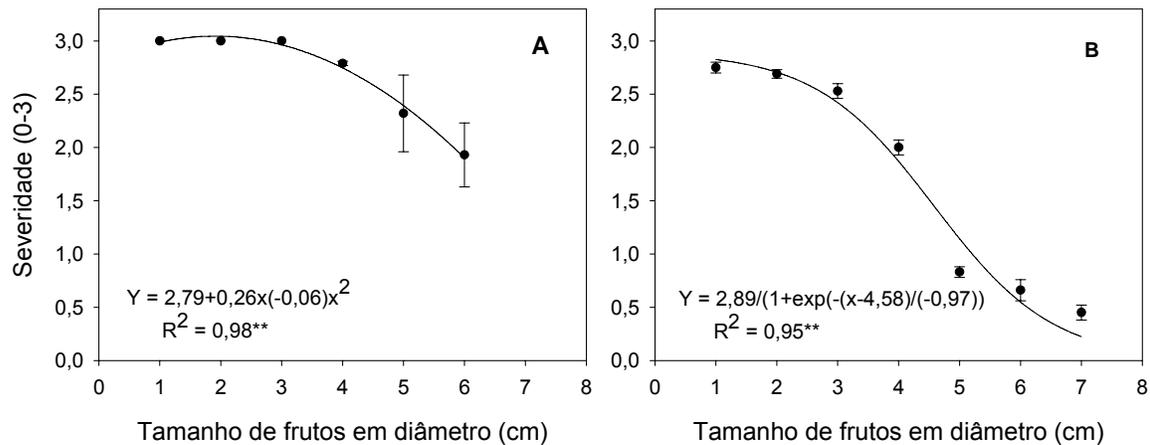


Figura 4. Severidade de mancha marrom de *Alternária* causada por *Alternaria alternata* inoculado em frutos de diferentes tamanhos (cm), sob casa de vegetação, nas cultivares: **A)** tangerina 'Dancy' e **B)** tangor 'Murcott'. \*\* Significativo ( $P \leq 0,01$ ); \* ( $P \leq 0,05$ ); <sup>NS</sup> = não significativo.

### 3.4. Discussão

*Alternaria alternata* afeta folhas, ramos e frutos de tangerinas e seus híbridos, causando lesões necróticas devido à ação da ACT – toxina do patótipo tangerina (KOHMOTO et al., 1979). Folhas das cultivares estudadas mostraram ser suscetíveis, com variação no número de lesões para cada cultivar, em cada estágio de maturação. Folhas do tangelo 'Minneola' e da tangerina 'Dancy' mostraram-se de forma geral, como as mais suscetíveis, enquanto que folhas de 'Nova', mostraram-se menos suscetíveis à mancha marrom de *Alternária*, apresentando sempre menos lesões em todos os estádios de maturação. A resistência à infecção pelo patógeno na cultivar 'Nova' foi verificada a partir de folhas com 16 dias de idade, cujas folhas nesse estágio de maturação já não apresentavam sintomas da doença.

Por outro lado, 'Minneola' foi a cultivar que apresentou maior número de lesões, destacando-se como a mais suscetível entre as cultivares testadas. Folhas do tangelo 'Orlando' e da mandarina 'Sunburst' apresentaram-se com alto grau de suscetibilidade, especialmente até cerca do 5º dia de idade. A partir desse período, essas cultivares

apresentam menores quantidades de lesões. Alto grau de suscetibilidade em folhas de 'Minneola' foi também verificado por PEEVER et al. (2000), seguida pelos híbridos 'Orlando' e 'Sunburst', o que de certa forma, foi também verificado neste trabalho. Muitos cruzamentos envolvendo os pomelos (*C. paradisi*) e tangerinas (*C. reticulata*) e cruzamentos entre esses híbridos originam híbridos suscetíveis à mancha marrom de *Alternaria*, tendo sempre como progenitor a tangerina 'Dancy' (HUTTON & MAYERS, 1988; KOHMOTO et al., 1991). Assim, os quatro híbridos 'Minneola', 'Orlando', 'Sunburst' e 'Murcott', originados entre os cruzamentos envolvendo *C. paradisi* ou seus híbridos e *C. reticulata*, estudados nesse presente trabalho, mostraram-se suscetíveis à doença.

Reações de suscetibilidade à *Alternaria* spp. em folhas de plantas de diferentes idades ou em plantas têm sido relatadas em vários patossistemas *Alternaria*-hospedeiro, tais como em *A. alternata* em batata (DROBY et al., 1984), *A. alternata* em açafrão (MORTENSEN et al., 1983) e *A. helianthi* em girassol (ALLEN et al., 1983).

Diante dos resultados obtidos nesse estudo pode-se observar que folhas de 'Nova' apresentaram poucos sintomas da doença quando inoculadas a partir do 11<sup>o</sup> dia de idade, e essa resistência pode estar ligada à sua rápida maturação. Tal fato, também foi observado para folhas do tangor 'Murcott', as quais a partir do 16<sup>o</sup> dia apresentavam poucas lesões. SOLEL & KIMCHI (1998) observaram correlação negativa entre a suscetibilidade de folhas com o avanço da maturidade.

Em relação ao tamanho das lesões, em folhas de 'Minneola', obteve-se lesões de tamanho superior às demais cultivares, comportando-se como suscetível, também para essa variável. A cultivar 'Nova' mostrou ser a mais resistente, sempre com o menor tamanho de lesão em todos os estádios de maturação. Estudos realizados por PEEVER et al. (2000), mediante inoculações em diferentes cultivares de tangerina, com vários isolados, demonstraram que a cultivar Nova sempre mostrou ser mais resistente do que 'Minneola', 'Orlando' e 'Sunburst'. Entretanto, os demais híbridos comportaram-se de forma intermediária, obtendo-se lesões, mesmo que ainda pequenas, até os 20 dias de idade.

Devido ao grau de suscetibilidade da tangerina 'Dancy', folhas dessa cultivar apresentaram lesões da doença em todos os estádios de maturação, mesmo que menor tamanho, em relação à 'Minneola'. Este fato ilustra bem o alto grau de especificidade do patógeno em relação ao hospedeiro (GARDNER, 1986; KOHMOTO et al., 1991; PEEVER et al., 2000). O tamanho e o número de lesões podem aumentar a fonte de inóculo e também contribuir diretamente para o incremento de conídios durante seu período de produção (REIS et al., 2006a).

Frutos inoculados sob condições de campo apresentaram suscetibilidade por todo período de desenvolvimento. No entanto, alta suscetibilidade à *A. alternata* foi verificada pelo menos até aos 4 cm de diâmetro. Frutos de tangelos 'Minneola' e 'Orlando' mostraram ser suscetíveis até 7 e 6 cm de diâmetro respectivamente. Por outro lado, frutos de tangor 'Murcott' mostraram baixa severidade da doença a partir de 4 cm de diâmetro, indicando menor suscetibilidade à doença. Por outro lado, frutos de 'Dancy' apresentaram alta severidade da doença até aos 6 cm de diâmetro, comportando-se assim, como altamente suscetíveis.

Estudos realizados por WHITESIDE (1976) indicaram correlação negativa entre o tamanho de frutos de tangerina 'Dancy' com severidade da mancha marrom de *Alternaria*, cujos frutos apresentavam-se suscetíveis até cerca de 3-4 cm de diâmetro. No presente estudo, não verificou-se correlação entre essas duas variáveis, pelo fato que, possivelmente, frutos de 'Dancy' foram suscetíveis em todo o período de crescimento, ou que apresentaram lesões tardiamente. Avaliações adicionais nessa cultivar proporcionaram observações no aumento da severidade da doença, uma vez que frutos inoculados com 4-5 cm de diâmetro, cerca de 150 dias após queda de pétalas, não apresentaram alta expressividade de sintomas na avaliação 3-4 dias após a inoculação, que coincidentemente não ocorrera alta umidade ou ocorrência de chuvas. Assim, os frutos foram expostos por um período mais prolongado de mais baixa umidade. Entretanto, ocorreram períodos de chuvas no intervalo entre a primeira e a segunda avaliação, cujas condições ambientais certamente proporcionaram o aumento de número de lesões.

Desta forma, presume-se que os períodos de molhamento na superfície dos frutos, em decorrência de chuvas, ou maior tempo de umidade ocorrida nesse período, favoreceram o desenvolvimento das lesões.

Umidade na superfície da planta favorece a germinação, infecção e esporulação de muitos tipos de patógenos (AGRIOS, 1997). No entanto, espécie de *Alternaria* possuem habilidade em interromper a esporulação e infecção e sobreviver em períodos secos, recomeçando a infecção em períodos em que haja umidade (ROTEM, 1994).

Alguns estudos mostram suscetibilidade em frutos de tangerinas e seus híbridos à *A. alternata*. No entanto, poucos estudos mostram a suscetibilidade em campo. VICENT et al. (2004) verificaram alta suscetibilidade em frutos destacados de tangerina 'Fortune', cujas infecções foram observadas em frutos até 6-7 cm de diâmetro. SOLEL & KIMCHI (1998) relatam que frutos de tangelo 'Minneola' foram suscetíveis em todo o seu desenvolvimento, em Israel. Esses resultados são convergentes aos do presente estudo, pois frutos de 'Minneola' e 'Orlando' com 7-8 cm de diâmetro apresentaram sintomas da doença, embora essas lesões apresentassem tamanho reduzido, em comparação às lesões ocorridas em frutos com 3-4 cm de diâmetro. Entretanto, essas infecções parecem não afetar a queda de frutos ou causar grandes lesões na casca, não prejudicando seu valor comercial.

O maior período de suscetibilidade de frutos de tangelos 'Minneola' e 'Orlando' possivelmente pode estar relacionado ao tempo de maturação mais tardio, principalmente para 'Minneola' (HODGSON, 1967). Pequenas lesões formadas em frutos com 7-8 cm de diâmetro também podem estar relacionadas com a fase IV do estágio fenológico do fruto, que representa a maturação, quando a casca do fruto inicia a perda da coloração verde intensa (DAVIES & ALBRIGO, 1994). PEGG (1966) relata que a resistência de frutos à *A. alternata* está relacionada com a maturação, quando as glândulas de óleos tornam-se mais proeminentes.

Estudos em casa de vegetação mostraram alta suscetibilidade à doença em frutos de 'Dancy' e 'Murcott', embora frutos de 'Dancy', quando inoculados sob condições controladas, mostraram uma menor suscetibilidade com 6 cm de diâmetro,

em relação aos frutos inoculados em condições de campo. Isto possivelmente pode estar relacionado com a maturação, uma vez que, frutos mantidos em casa de vegetação atingem maturidade mais rápida do que frutos mantidos em condições de campo.

Frutos de tangor 'Murcott' comportaram-se de forma semelhante nos dois estudos, ou seja, em condições de campo e casa de vegetação, embora frutos com 5-6 cm de diâmetro inoculados em casa de vegetação tenham apresentado maior nível de severidade da doença, em relação à observada em campo, certamente favorecida com a alta umidade relativa.

De acordo com os dados da severidade em frutos, avaliados em ambas as situações, o período de suscetibilidade ocorreu até pelo menos aos 5 cm de diâmetro, levando a presumir que o controle da mancha marrom de *Alternária* deva ser feito até que os frutos atinjam tal tamanho. Assim, reduções da severidade da doença em frutos de 'Minneola' foi obtida com 4 a 5 aplicações com iprodione, em Israel (SOLEL & TIMMER, 1997). Nas condições de Israel, esses mesmos pesquisadores relatam que aplicações adicionais com fungicidas no verão ou no inverno não proporcionaram redução na severidade da doença. Por outro lado, em outros países, como na Austrália, num total de 7 aplicações combinando, os fungicidas, estrobilurinas, triazóis e protetores em tangor 'Murcott', ocorreu redução da severidade da doença em cerca de 70% (MILES et al., 2005). Nas condições brasileiras, são necessárias de 10-12 aplicações com fungicidas cúpricos (PERES & TIMMER, 2006) ou de 5 a 6 aplicações com fungicidas sistêmicos, alternados com fungicidas protetores (REIS et al., 2006b).

Estudos de suscetibilidade e resistência em órgãos vegetais como em frutos e folhas, em diferentes cultivares, tais como esses que foram realizados, são elementos essenciais, sendo de importância do ponto vista econômico e de cultivo para as tangerinas, uma vez que tais informações podem indicar materiais que possam ser utilizados em regiões de alta ou baixa pressão da doença. Além disso, tais informações podem contribuir para um manejo mais adequado da doença, de maneira mais eficiente, com o uso de medidas culturais, para a redução da fonte de inóculo e uso de fungicidas.

### 3.5. Conclusões

O tangelo 'Minneola' e a tangerina 'Dancy' mostraram-se mais suscetíveis à *A. alternata*, seguidos pelo tangelo 'Orlando' e pela mandarina 'Sunburst'.

A cultivar Nova foi a mais resistente à mancha marrom de *Alternária*, seguida pelo tanger 'Murcott'.

As folhas apresentaram maior suscetibilidade até 15 dias de idade, independente da cultivar.

Frutos dos híbridos 'Minneola' e 'Orlando' foram suscetíveis até 7 cm de diâmetro, para tangerina 'Dancy' até aos 6 cm e para o tanger 'Murcott' até 5 cm de diâmetro.

### 3.6. Referências

AGRIOS, G. N. Environmental effects on the development of infectious plant disease. In:\_\_\_\_\_.**Plant pathology**. Santiago: Academic Press, 1997. cap. 7, p. 143-152.

ALLEN, S. J.; BROWN, J. F.; KOCHMAN, J. K.; Effect of leaf age, host growth stage, leaf injury, and pollen on the infection of sunflower *Alternaria helianthi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 6, p. 896-898, 1983.

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**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 429-433, 1999.

DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. Environmental constraints on growth, development and physiology of citrus. In:\_\_\_\_\_.**Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. cap. 3, p. 52-82.

DROBY, S.; DINOOR, A.; PRUSKY, D.; BARKAI-GOLAN, R. Pathogenicity of *Alternaria alternata* on potato in Israel. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 5, p. 537-542, 1984.

GARDNER, J. M.; KONO, Y.; CHANDLER, J. L. Biossay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, p. 293-304, 1986.

HODGSON, R. W. Horticultural varieties of vitrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, J. H.; BATCHELOR, L. D. **The citrus industry: history, world distribution, botany and varieties**. Riverside, 1967. v. 1, cap. 4, p. 431-591.

HUTTON, D. G.; MAYRES, P. E. Brown spot of Murcott tangor caused by *Alternaria alternata* in Qeensland. Australisian. **Australasian Plant Pathology**, Castlle Hill, v. 17, n. 3, p. 69-73, 1988.

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.

MORTENSEN, K.; BERGMAN, J. W.; BURNS, E. E. Importance of *Alternaria carthami* and *A. alternata* in causing leaf diseases of safflower. **Plant Disease**, St Paul, v. 67, n. 11, p. 1187-1190, 1983.

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.

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.

PEEVER, T. L.; OLSEN, L.; IBÁÑEZ, A.; AKIMITSU, K.; TIMMER, L. W. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 7, p. 794-802, 2002.

PERES, N. A.; TIMMER, L. W. Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangor in Brazil. **Crop Protection**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 454-460, 2006.

REIS, R. F.; GOES, A. de; MONDAL, S. M.; 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**, St. Paul, v. 90, n. 8, p. 1051-1054, 2006a.

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

ROTEM, J. Infection. In:\_\_\_\_\_. **The genus *Alternaria* – biology, epidemiology and pathogenicity**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 1994. cap. 5, p. 77-94.

SOLEL, Z.; OREN, Y.; KIMCHI, M. Control of *Alternaria* brown spot of *Minneola* tangelo with fungicides. **Crop Protection**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 659-664, 1997.

SOLEL, Z.; KIMCHI, M. Histopathology of infection of *Minneola tangelo* by *Alternaria alternata* pv. *citri* and effect of and environmental factors on lesion development. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.146, p. 557-561, 1998.

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.

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.

## **CAPÍTULO 4 – Reação de Espécies Cítricas à *Alternaria alternata*, Agente Causal da Mancha Marrom de Alternária**

**RESUMO** – *Alternaria alternata*, o agente causal da mancha marrom de Alternária (MMA), causa necrose em folhas, ramos e frutos, reduzindo a produção e qualidade dos frutos. As tangerinas e seus híbridos são altamente suscetíveis à doença. No banco de germoplasma da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, SP, Brasil, em 2004 e 2005, avaliou-se espécies, cultivares e híbridos de *Citrus*, com o objetivo de verificar a reação de materiais à *A. alternata*, por meio de infecção natural e de inoculações. Folhas destacadas também foram usadas para comprovar a suscetibilidade ou resistência à doença. Dez cultivares de Satsumas (*Citrus unshiu*) e 16 cultivares de *Clementina* (*Citrus clementina*) não apresentaram sintomas da doença em folhas, por infecção natural ou quando inoculadas em campo. De forma semelhante, as cultivares de mandarinas Burguess SRA 412, Wallent SRA 438, Carvalhais, Ampefy SRA 459, Ananas SRA e Macaque SRA 426 (*C. reticulata*) também não apresentaram sintomas da doença, sob infecção natural ou artificial em campo. Algumas cultivares de *C. deliciosa*, *C. tangerina*, *C. erythrosa* e *C. temple* apresentaram sintomas da doença. Para essas espécies, até então, não se tinha relato de suscetibilidade à mancha marrom de Alternária. Os híbridos ‘Fairchild’, ‘Nova’, ‘Page’, ‘Fortune’ e ‘Sunburst’ mostraram-se suscetíveis à doença. Entretanto, os híbridos ‘Fremont’ provenientes do cruzamento *C. clementina* x *C. reticulata*, ‘Encore’ (*C. nobilis* x *C. deliciosa*) e ‘Fallglo’ (*C. reticulata* x *C. paradisi*) não mostraram sintomas da doença. Esses materiais são promissores para o cultivo de tangerinas e também poderão contribuir no melhoramento genético para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes à mancha marrom de Alternária.

**Palavras-chave:** *Citrus reticulata*, *Citrus tangerina*, *Citrus deliciosa*, híbridos

#### 4.1. Introdução

A mancha marrom de Alternária, causada por *Alternaria alternata*, é uma importante doença que ocorre em tangerinas e seus híbridos, afetando folhas, ramos e frutos imaturos (PEGG, 1966; CANIHOS et al., 1999). Além da queda na produção, frutos com sintomas da doença perdem seu valor comercial para o mercado de frutas frescas. O primeiro relato da doença foi em mandarina ‘Emperor’ na Austrália, em 1903 (KIELY, 1964), e o patógeno foi designado como *Alternaria citri* Ellis & N. Pierce (PEGG, 1966). Em 1991, o fungo foi renomeado como *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keisel. pv. *citri* (SOLEL, 1991). Estudos moleculares filogenéticos sugerem que isolados de *Alternaria* de citros fossem relatados como *Alternaria alternata* (PEEVER et al., 2004).

São conhecidos dois patotipos de *Alternaria alternata*, baseado na produção de toxinas específicas aos hospedeiros (HST). Um chamado de ACT – toxina patotipo tangerina, o qual é específico para as tangerinas (*C. reticulata*) e seus híbridos. Um outro chamado de ACR – toxina patotipo limão, afeta os limões ‘Rugoso’ (*Citrus jambhiri* Lush) e o ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) (KOHMOTO et al., 1979; NISHIMURA & KOHMOTO, 1983).

A resistência de folhas, ramos e frutos à *A. alternata* está relacionada com o avanço da maturidade (PEGG, 1966; GARDNER et al., 1986; SOLEL & KIMCHI, 1998; REIS et al., 2006a). De acordo com WHITESIDE (1976), os frutos são suscetíveis até 3-4 cm de diâmetro. No entanto, esta suscetibilidade pode se estender até 6-7 cm, dependendo da espécie (VICENT et al., 2004; REIS et al., 2006a).

O controle da mancha marrom de Alternária é feito principalmente por fungicidas, o qual tem se tornado difícil e oneroso, devido ao grande número de aplicações que são necessárias para garantir frutos de boa qualidade. De acordo com PERES & TIMMER (2006), pode-se chegar a 12 o número de aplicações com fungicida à base de cobre em tangor ‘Murcott’ no Brasil. Uso de fungicidas sistêmicos do grupo dos triazóis e estrobilurinas é eficiente para o controle da doença, cujas aplicações fazem-se necessárias para a obtenção de frutos sadios e evitar a queda prematura (TIMMER et al., 1998; MILES et al., 2005; REIS et al., 2006b).

A suscetibilidade e a resistência de espécies de *Citrus* à *A. alternata* tem sido estudada por vários pesquisadores (GARDNER et al., 1986; SOLEL & KIMCHI, 1997; PEEVER et al., 2000; VICENTE et al., 2004). Praticamente todas as cultivares de tangerinas (*C. reticulata*) e híbridos, como os tangelos 'Minneola' e 'Orlando', provenientes do cruzamento *C. paradisi* Macfad. x *C. reticulata*, o tangor 'Murcott', provavelmente originado do cruzamento *C. reticulata* x *C. sinensis* (L.) Osbeck e os híbridos 'Nova', 'Farchild', 'Fortune' e 'Sunburst' são suscetíveis à doença (SCHUTTE, 1993). Entretanto, as Satsumas (*C. unshiu* (Mark.) Marc.) e as Clementinas (*C. clementina* Hort. ex Tan.) têm se mostrado resistentes à *A. alternata* (KOHMOTO et al., 1991). Outras espécies como *C. sinensis* (L.) Osbeck, *C. limon* (L.) Burm. e *C. margarita* (Lour.) Swing. são resistentes ao patógeno (PEGG, 1966; GARDNER et al., 1986; KOHMOTO et al., 1991).

A mancha marrom de Alternária está presente em vários países onde se cultiva citros (TIMMER et al., 1998). No Brasil, a doença foi relatada em 2001 por GOES et al. (2001) ao atacar pomares de tangerina 'Dancy' e a partir de 2002, foi verificada em vários estados brasileiros (SPÓSITO et al., 2003).

Com o surgimento da mancha marrom de Alternária no Brasil e dada às condições climáticas favoráveis à disseminação e infecção do patógeno, surge a necessidade de se conhecer o comportamento de genótipos disponíveis, visando o controle da doença por meio de resistência varietal. O conhecimento de espécies de tangerinas ou híbridos resistentes ou tolerantes à doença é fundamental para que se possa ter alternativas para viabilizar a produção comercial de tangerinas. Além disso, o conhecimento de espécies ou híbridos resistentes à *A. alternata* tem importância relevante para pesquisas em melhoramento genético, visando fontes de resistência ao patógeno.

O objetivo deste trabalho foi verificar a suscetibilidade e resistência de espécies cítricas de tangerinas, híbridos e cultivares à mancha marrom de Alternária.

## 4.2. Material e métodos

### 4.2.1. Relação das espécies cítricas, híbridos e produção de inóculo

Os experimentos foram conduzidos na coleção de plantas do Banco de Germoplasma da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, SP. A relação das espécies cítricas e cultivares usadas está apresentada na Tabela 1. As espécies, cultivares e híbridos utilizados nesse estudo estão divididas horticulturalmente de acordo com a nomenclatura de HODGSON (1969); COTIN (2002) e ORTIZ MARCIDE (1986). Os genótipos analisados foram introduzidos no Brasil, oriundos dos bancos de germoplasmas do Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), na Espanha, e do Agrumes SRA, na França.

Para as inoculações realizadas em campo, bem como em folhas destacadas, a produção de inóculo foi feita com um isolado de *Alternaria alternata*, obtido a partir de folhas do híbrido de mandarina 'Fortune IVIA-80', em um pomar localizado na Estação Experimental de Bebedouro, SP, cuja patogenicidade do isolado foi previamente testada em folhas destacadas para esse mesmo híbrido. O preparo do inóculo foi feito seguindo a metodologia adotada por CANIHOS et al. (1999), com modificação. O isolamento de *A. alternata* consistiu da seguinte maneira: Pequenos fragmentos de tecido foliar com sintomas da doença foram imersos em álcool a 50%, por 30 segundos, e em seguida, numa solução de hipoclorito de sódio e água na proporção de 1:3 (v/v), durante dois minutos. Esses fragmentos foram enxaguados em água destilada e esterilizada e depositados em meio de batata-dextrose-ágar e incubados, em fotoperíodo de 12/12 h, sob luz fluorescente a 25°C. Após 7 dias, adicionou-se 5 mL de água destilada esterilizada à superfície das colônias, as quais foram raspadas com um bisturi para remover o micélio e, posteriormente incubadas a 20°C por 2-3 dias para a produção de conídios. Os conídios foram coletados adicionando 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa e raspada suavemente com um pincel, cuja suspensão foi filtrada, usando duas camadas de gaze esterilizada. A suspensão de

conídios foi centrifugada por 20 minutos em 6000 g. Para as inoculações em campo, bem como em folhas destacadas, a concentração conidial foi ajustada para  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>, aferida por meio de um hemocitômetro.

#### **4.2.2. Avaliação das espécies cítricas e híbridos à infecção natural e à inoculação artificial em campo**

Os experimentos foram conduzidos por dois anos, em 2004 e 2005, no período de dezembro a fevereiro. Para avaliar a suscetibilidade e a resistência dos materiais sob infecção natural, foram utilizadas plantas que apresentavam intensa folhagem nova, as quais se encontravam em estágio de maturidade compatível com ou não à suscetibilidade à doença. Foram amostradas aleatoriamente 50 folhas por planta, em 4 plantas de cada espécie cítrica e híbridos citados na Tabela 1. O critério de avaliação consistiu na contagem de lesões da mancha marrom de *Alternária*, usando uma escala de notas que consistiu de nota: 0) sem sintoma, 1) 1 a 2 lesões; 2) 3 a 6 lesões e 3) 7 ou mais lesões.

A partir de janeiro de 2005, brotações novas que continham folhas de 2-3 cm de comprimento, das plantas estudadas, foram inoculadas com o isolado de mandarina 'Fortune IVIA-80'. Para as inoculações usou-se um atomizador manual, e as folhas inoculadas foram cobertas com saco de polietileno transparente, fazendo uma câmara úmida por um período de 16-18 horas. As inoculações foram sempre realizadas no período da tarde. As avaliações foram realizadas 4-5 dias após a inoculação.

#### **4.2.3. Inoculação em folhas destacadas**

Folhas destacadas das espécies e híbridos citados na Tabela 1 foram inoculadas no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp - Câmpus de Jaboticabal (FCAV-UNESP). Folhas de 2-4 e de 5-7 cm foram

colocadas em placas de Petri sobre papel de filtro umedecido e inoculadas usando atomizador manual, empregando-se o mesmo isolado citado anteriormente. Folhas sem inoculação, correspondentes à testemunha, foram utilizadas para cada espécie e híbrido. Foram usadas 4 repetições com 5 folhas, para cada tamanho das folhas. As placas de Petri foram mantidas em fotoperíodo de 12/12 h, em luz fluorescente em temperatura ambiente de 24-26°C. A avaliação foi realizada 48 h após a inoculação, usando a escala de notas citada anteriormente.

### 4.3. Resultados

Os dados correspondentes à suscetibilidade e resistência à *A. alternata* das espécies, híbridos e cultivares de tangerinas estão apresentados na Tabela 1.

Todos os 8 cultivares de Satsuma (*Citrus unshiu*) e os 16 cultivares de Clementina (*C. clementina*) não apresentaram sintomas da mancha marrom de Alternária, nos dois anos de avaliação sob infecção natural. Em folhas destacadas de 2-4 cm, a maioria das cultivares de Satsumas e Clementinas apresentaram sintomas da doença, sendo que para as folhas com 4-7 cm, apenas a Clementina Marisol IVIA 93 apresentou sintomas da doença, porém com baixa severidade. Sintomas em folhas destacadas de Satsumas também foram observados por SOLEL & KIMCHI (1997), mas não por KOHMOTO et al. (1991).

Num total de 19 cultivares de mandarinas da espécie *C. reticulata*, oito delas não apresentaram sintomas da doença sob infecções naturais ou inoculadas em campo (Tabela 1). Por outro lado, com exceção da cultivar Fewtrell SRA 418, todos os demais cultivares apresentaram sintomas da mancha marrom de Alternária quando folhas destacadas foram inoculadas, independentemente do tamanho.

Tabela 1. Relação das espécies, cultivares e híbridos de tangerinas e sua reação quanto a suscetibilidade e resistência à *Alternara alternata*, quando expostos à infecção natural ou através de inoculação.

Citros <sup>a</sup>	Reação do genótipo*			
	Infecção natural	Infecção com inoculação	Infecção em folhas destacadas 2-4 (cm)	Infecção em folhas destacadas 5-7 (cm)
<b>Satsumas</b>				
<i>(Citrus unshiu (Mark.) Marc.)</i>				
Clauselina IVIA 19	-	-	+++	-
Okitsu IVIA 195	-	-	+++	-
Unshu SRA 529	-	-	+++	-
Saigon SRA 227	-	-	+++	-
Panaché SRA 579	-	-	+++	-
Salzara SRA 341	-	-	+++	-
Miyagawa SRA 444	-	-	+++	-
Kowano SRA 167	-	-	+++	-
59 FCAV (Híbrido)	-	-	+++	-
Okitsu A2	-	-	+++	-
<b>Clementinas</b>				
<i>(Citrus clementina Hort. ex Tan.)</i>				
Marisol IVIA 93	-	-	+++	+
Clementina de Nules IVIA 22	-	-	+	-
Clementina Commune SRA 92 (B)	-	-	++	-
Clementina Reina SRA 534 (B)	-	-	+++	-
Clementina Oroval Y 45 (B)	-	-	+	-
Clementina Commune SRA 88 (B)	-	-	-	-
Clementina De Nules VCR	-	-	+	-
Clementina Caffin SRA 385 (B)	-	-	-	-
Clementina Bruno SRA 531 (B)	-	-	-	-
Clementina Oroval SRA 335	-	-	+++	-
Clementina 2 kr Monreal	-	-	-	-
Clementina Ragheb SRA 386 (B)	-	-	-	-
Clementina Nules SRA 389 (B)	-	-	+++	-
Clementina Tomatera SRA 535 (B)	-	-	+++	-

continuação

Citros <sup>a</sup>	Reação do genótipo*			
	Infecção natural	Infecção com inoculação	Infecção em folhas destacadas 2-4 (cm)	Infecção em folhas destacadas 5-7 (cm)
<b>Mandarinas</b>				
<i>(Citrus reticulata</i> Blanco)				
Burguess SRA 412	-	-	++	+
Wallent SRA 438	-	-	+++	+
Malvasio SRA 115	-	+	+++	+++
Carvalhais Vidigueira (S)	-	-	++	+
Carvalhais	-	-	++	+
Fewtrell SRA 418 (B)	-	-	-	-
Cami (S)	++	-	+	+
Ampefy SRA 495	-	-	+++	+++
Ananas SRA 410	-	-	++	+
Antillaise SRA 497 (B)	+	+	+	+
Changsha SRA 413 (B)	+	+	++	+
C-54-4-4 SRA 337 (B)	+	+	+++	++
East India SRA 414 (B)	+	+	++	++
Changsha SRA	+	+	+++	++
Macaque SRA 426 (B)	-	-	++	-
Lebom SRA 425 (B)	++	++	+++	+++
Ponkan Yoshida 585	++	++	+++	+++
Late Emperor	+	++	+++	+++
Swatow	++	++	+++	+++
<i>(Citrus deliciosa</i> Ten.)				
Avana Apireno IVIA 189	-	-	+	+
Setubalense Proc. 49/97	-	-	+	+
Peau Lisse SRA (B)	-	-	+	+
Natal Tightskin SRA 481 (B)	+++	+++	+++	+++
Ciaculi 60/22 <sup>a</sup> /2 Proc. 435/96 (S)	-	-	+	-

## continuação

Citros <sup>a</sup>	Reação do genótipo*			
	Infecção natural	Infecção com inoculação	Infecção em folhas destacadas 2-4 (cm)	Infecção em folhas destacadas 5-7 (cm)
<i>(Citrus tangerina Hort. ex Tan.)</i>				
Beuty of Glen Retreat SRA 261	-	-	+++	++
Zanzibar SRA 442	-	-	+	-
<i>(Citrus nobilis Lour.)</i>				
Rode king SRA 431	-	-	+++	+++
<i>(Citrus erythrosa Hort. ex Tan.)</i>				
Fuzhu SRA 599	++	++	++	-
<i>(Citrus temple Hort. ex Y. Tan.)</i>				
Miúda Proc. 49/79 (S)	-	-	+	-
Temple Sue Linda SRA 467 (B)	++	-	++	+
<b>Híbridos</b>				
<b>Tangores</b>				
<i>(C. reticulata x C. sinensis (L.) Osbeck)</i>				
Ellendale IVIA 194	-	-	+	-
Tangor H-56 SRA 465 (B)	-	-	+++	++
Tangor Dweet IVIA-C 165 (S)	+	-	++	+
<i>(C. clementina x C. sinensis)</i>				
Clemelin IVIA 355 (B)	+	++	++	++

continuação

Citros <sup>a</sup>	Reação do genótipo*			
	Infecção natural	Infecção com inoculação	Infecção em folhas destacadas 2-4 (cm)	Infecção em folhas destacadas 5-7 (cm)
<b>Tangelos</b>				
<i>(C. reticulata</i> Ten. x <i>C. paradisi</i> Macfad.)				
Allspice SRA 327	-	-	+	-
Lebon SRA 438	-	-	+	-
Mapo (S)	-	-	+	+
Thornton Vero SRA 460 (B)	+++	+	+	+
Nocatee SRA 452 (B)	-	-	-	-
Guyane SRA 448 (B)	-	-	++	+
<b>Mandarinas (híbridos)</b>				
<i>[Citrus clementina</i> x ( <i>C. paradisi</i> x <i>C. reticulata</i> )				
Fairchild	++	++	+++	+++
Nova IVIA	++	++	+++	+++
Nova IVIA 74	+++	+++	+++	+++
Nova IVIA 74-7	+++	++	+++	+++
Nova IVIA 86-2	+++	+++	+++	+++
<i>[(C. paradisi</i> x <i>C. reticulata</i> ) x <i>C. clementina</i> ]				
Page SRA 159	-	++	+++	+++
<i>(C. clementina</i> x <i>C. reticulata</i> )				
Fortune	+++	+++	+++	+++
Fortune SRA 31	+++	+++	+++	+++
Fortune IVIA 80	+++	+++	+++	+++
<i>(C. clementina</i> x <i>C. reticulata</i> )				
Fremont	-	-	++	+

continuação

Citros <sup>a</sup>	Reação do genótipo*			
	Infecção natural	Infecção com inoculação	Infecção em folhas destacadas 2-4 (cm)	Infecção em folhas destacadas 5-7 (cm)
<i>(C. nobilis x C. deliciosa)</i>				
Encore SRA 190	-	-	++	+
<i>[C. reticulata x (C. paradisi x C. reticulata)]</i>				
Fallglo	-	-	+	+
<i>[C. clementina x (C. paradisi x C. reticulata)] x [C. clementina x (C. paradisi x C. reticulata)]</i>				
Sunburst IVIA C – 200	++	++	+++	+++

<sup>a</sup>Cultivares de citros subdivididas horticulturalmente.

\*(-) não apresentou lesões; (+) 1-3 lesões; (++) 4-6 lesões; (+++) 7 ou mais lesões.

As cultivares Avana Apireno IVIA, Setubalense, Peau Lisse SRA e Ciaculi 60/22<sup>a</sup>/2 Proc 435/96 (*C. deliciosa* Ten.), bem como as cultivares Beuty of Glen Retreat SRA 261, Zanzibar SRA 442 (*C. tangerina* Hort. ex Tan.), Rode King SRA 431 (*C. nobilis* Lour.) e Miúda Proc. 49/79 (*C. temple* Hort. ex Y. Tan.) não apresentaram sintomas da doença sob infecção natural de *A. alternata*. Por outro lado, observou-se sintoma da doença nas mandarinas 'Natal Tightskin SRA 481' (B) (*C. deliciosa*), 'Swatow' (*C. tangerina*), 'Fuzhu SRA 599' (*C. erythroa* Hort. ex Tan.) e 'Temple Sue Linda SRA 467 (B)' (*C. temple*) (Tabela 1). Folhas destacadas dessas cultivares apresentaram sintoma de mancha marrom de Alternária quando submetidas à inoculação artificial.

Em relação aos híbridos, o tangor 'Ellendale IVIA 130' e o 'H-56 SRA 465 (B)', resultante provavelmente do cruzamento *C. reticulata* x *C. sinensis*, não apresentaram sintomas da doença em condições naturais de infecção. Por outro lado, esses tangores apresentaram suscetibilidade à *A. alternata* em folhas destacadas.

Entre os híbridos de tangelos, provenientes do cruzamento *C. deliciosa* x *C. paradisi*, as cultivares Allspice SRA 327, Lebon SRA 438, Mapo (S), Nocatee SRA 452 (B) e Guyane SRA 448 (B) não apresentaram suscetibilidade à doença sob condições naturais de infecção, e poucas lesões foram formadas, independente do tamanho das folhas destacadas por inoculação artificial.

Os híbridos de mandarina, 'Fairchild', 'Nova IVIA', 'Fortune SRA 31' e 'Fortune IVIA 80', bem como o híbrido 'Sunburst IVIA – C200', foram altamente suscetíveis à *A. alternata*, em ambas as situações de infecção, natural e em folhas destacadas. No entanto, os híbridos 'Fremont', 'Encore SRA 190' e 'Fallglo' não mostraram suscetibilidade à mancha marrom de Alternária por infecção natural e comportaram-se como pouco suscetíveis quando as inoculações foram realizadas em folhas destacadas (Tabela 1).

#### 4.4. Discussão

*Alternaria alternata* produz toxinas específicas ao hospedeiro (HST) (KOHMOTO et al., 1991; PEEVER et al., 1999). As tangerinas e seus híbridos são altamente suscetíveis à ACT – toxina do patotipo tangerina, causando manchas necróticas em folhas, ramos e frutos imaturos (PEGG, 1966).

A suscetibilidade e a resistência de espécies de citros à ACT – toxiana e ACR – toxina, têm sido estudadas por vários pesquisadores (KOHMOTO et al., 1979; GARDNER et al., 1986; SOLEL & KIMCHI, 1997; PEEVER et al., 2000).

No presente trabalho foi verificado que 10 cultivares de Satsumas (*C. unshiu*), 14 de Clementina (*C. clementina*) e 1 de *C. nobilis* que apresentaram resistência à *A. alternaria*, cujo isolado produz ACT – toxina do patotipo tangerina.

Por outro lado, verificou-se a suscetibilidade à doença em algumas cultivares de *C. deliciosa*, *C. erythrosa* e *C. temple*, espécies para as quais não há relatos de suscetibilidade à *A. alternata*. Essas espécies foram suscetíveis à ACT – toxina do

patotipo tangerina, uma vez que, híbridos de *C. reticulata* apresentaram sintomas quando inoculados com o mesmo isolado que produziu sintomas nessas espécies.

Os híbridos 'Fairchild' e 'Nova', originados do cruzamento [*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. reticulata*)], são altamente suscetíveis à mancha marrom de Alternária, embora o híbrido 'Nova' possa ter um menor grau de suscetibilidade (REIS et al., 2006a). Da mesma maneira, os híbridos 'Fortune' (*C. clementina* x *C. reticulata*) mostraram-se altamente suscetíveis à doença. Híbridos provenientes que possuam parentais envolvendo *C. clementina* ou *C. reticulata* x *C. paradisi* são suscetíveis à ACT – toxina do patotipo tangerina (GARDNER et al., 1986; SOLEL & KIMCHI, 1997; KOHMOTO et al., 1979).

A suscetibilidade em frutos também foi verificada em mais de 80% das cultivares ou híbridos que mostraram sintomas da doença em folhas mediante as infecções naturais ou inoculadas em campo (dados não apresentados).

Os híbridos 'Fremont' (*C. clementina* x *C. reticulata*), 'Encore SRA 190' e 'Fallglo' provenientes do cruzamento (*C. nobilis* x *C. deliciosa*) e [*C. reticulata* x (*C. paradisi* x *C. reticulata*)] respectivamente, não apresentaram sintomas da doença, podendo esses materiais serem, uma alternativa à substituição aos híbridos suscetíveis em áreas com alta incidência da doença. Resistência da cultivar Encore à ACT – toxina do patotipo tangerina também foi verificada por KOHMOTO et al. (1991).

Os tangelos analisados nesse estudo, provenientes do cruzamento *C. deliciosa* x *C. paradisi*, apresentaram-se menos suscetíveis à doença em relação aos híbridos, cujos parentais são os tangelos 'Minneola' e 'Orlando' (*C. paradisi* x *C. reticulata*), os quais são altamente suscetíveis à *A. alternata* (PEEVER et al., 1999). Conforme estudos feitos por vários pesquisadores, cultivares de grapefruit como Marsh, Redblush, Star Ruby e Wheeny mostraram lesões de mancha marrom de Alternária quando folhas destacadas foram inoculadas com isolado que produz a ACT – toxina do patotipo tangerina (PEGG, 1966; KOHMOTO et al., 1991; SOLEL & KIMCHI, 1997). No entanto, parece que esses cultivares não são suscetíveis ao patógeno em condições naturais. Os tangores 'Murcott' e 'Ellendale' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) são altamente suscetíveis à mancha marrom de Alternária (SOLEL & KIMCHI, 1997), mas em nossos estudos,

apenas o tangor 'Dweet IVIA 355' apresentou maior suscetibilidade entre os tangores estudados.

Os tangelos e os tangores resultantes do cruzamento entre as espécies *C. reticulata* ou *C. reticulata* parecem ser mais suscetíveis à mancha marrom de Alternária do que aqueles oriundos do cruzamento envolvendo a espécie *C. deliciosa*.

Entretanto, a formação de lesões em folhas novas destacadas, em cultivares de Satsumas, Clementinas, em cultivares de *C. reticulata* e em híbridos, foi mais evidente do que em tecidos mais velhos. Lesões espalhadas em tecidos mais jovens podem ter ocorrido devido a uma reação de hipersensibilidade, o que não foi observado para a grande maioria das cultivares destas espécies em tecidos mais velhos. Reação de hipersensibilidade também foi verificada por GARDNER et al. (1986) em folhas novas, medindo de 2-4 cm, de laranja doce da variedade Valência e em pomelo da variedade Duncan, quando inoculadas com isolado de tangerina.

Apesar da espécie *C. reticulata* ser considerada suscetível à *A. alternata*, verificou-se que algumas cultivares como Burgess SRA 412, Wallent SRA 438, Cavalhais, Fewtrell SRA 418, Ampefy SRA 495 e Ananas SRA 410 não mostraram sintoma da doença através de infecção natural, nos dois anos do estudo. Beauty of Glen Retreat mostrou-se resistente à doença, a qual, em nossos estudos foi considerada como *C. tangerina*. Estudos realizados por PEGG (1966) mostraram resistência dessa cultivar ao patógeno.

O tangor 'Murcott' é, no Brasil, o híbrido mais plantado, representando quase 70% de todas as tangerinas produzidas. Porém, devido à sua alta suscetibilidade à *A. alternata*, condições ambientais altamente favoráveis, sua substituição por outras espécies de tangerinas e/ou híbridos que tenham resistência ou tolerância à mancha marrom de Alternária deve ser estudada e considerada.

Neste trabalho, algumas espécies e cultivares de tangerina não se mostraram suscetíveis ao patógeno que, por isto, devem ser analisadas cuidadosamente em relação à qualidade e produtividade e, sobretudo, quanto à aceitação pelo consumidor. Além disso, esses materiais que mostraram resistência podem servir como fonte de resistência à *A. alternata* em trabalhos de melhoramento genético.

#### 4.5. Conclusões

Existem cultivares de *C. reticulata* resistente à *Alternaria alternata*, bem como híbridos que podem servir como alternativa de cultivo de tangerinas.

Novas espécies foram relatadas como suscetíveis à *A. alternata*.

#### 4.6. Referências

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**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 429-433, 1999.

COTIN, R. Citrus of the world. A citrus directory. SRA INRA-CIRAD, Version 2.0 – September, 63 p. Disponível em: <<http://www.corse.inra.fr/sra/synonym>>. Acesso em: 15-junho 2006.

GARDNER, J. M.; KONO, Y.; CHANDLER, J. L. Biossay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, p. 293-304, 1986.

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

HODGSON, R. W. Horticultural varieties of citrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, J. H.; BATCHELOR, L. D. **The citrus industry**: history, world distribution, botany and varieties. Riverside, 1967. v. 1, cap. 4, p. 1, 431-591.

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

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

MILES, A. K.; WILLINGHAM, S. L.; COOKE, A. W. Field evaluation of a plant activator, captan, chlorothalonil, copper hydroxide, iprodione, mancozeb and strobilurins for the control of citrus brown spot of mandarin. **Australasian Plant Pathology**, Castle Hill, v. 34, n. 1, p. 63-71, 2005.

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.

ORTIZ MARCIDE, J. M. Nomenclatura botánica de los cítricos. **Fruits**, Montpellier, v. 41, n. 3, 199-209, 1986.

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**, St. Paul, v. 89, n. 10, p. 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.

PEEVER, T. L.; SU, G.; CARPENTER-BOGGS, L.; TIMMER, L. W. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, Lawrence, v. 96, n. 1, p. 119-134, 2004.

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.

PERES, N. A.; TIMMER, L. W. Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangor in Brazil. **Crop Protection**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 454-460, 2006.

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

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

SCHUTTE, G. C. Breeding of citrus cultivars resistant to *Alternaria alternata*: A review. In: THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 4., 1993, Pielermaritzburg: **Proceendings...** Pielermaritzburg: International Society of Citrus Nurserymen, 1993. p. 197-202.

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

SOLEL, Z.; OREN, Y.; KIMCHI, M. Control of *Alternaria* brown spot of Minneola tangelo with fungicides. **Crop Protection**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 659-664, 1997.

SOLEL, Z.; KIMCHI, M. Histopathology of infection of Minneola tangelo by *Alternaria alternata* pv. *citri* and effect of and environmental factors on lesion development. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.146, p. 557-561, 1998.

TIMMER, L. W.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T. R.; IBÁÑEZ, A. M.; ZITKO, S. E. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause brown spot of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 11, p. 1218-1223, 1998.

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.

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.