

INOCULAÇÃO *in vitro* E *in vivo* DE *Alternaria alternata* EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE TANGERINA

DENIS A. POLYDORO¹; ROSE M. PIO²; FERNANDO A. AZEVEDO³; MARINÊS BASTIANEL³; KÁTIA C. KUPPER³; MARCELO A. ROMÃO⁴; LUDMILA S. FERREIRA⁴; K.L. PINHEIRO⁴; DANILO R. YANAME⁵

Nº 0800008

Resumo

A mancha marrom de alternária tem causado sérios prejuízos em plantios comerciais de tangerina Ponkan e do tangor Murcott. Nesse trabalho foram realizadas inoculações *in vitro* e *in vivo* com o fungo *Alternaria alternata* em 78 diferentes variedades do grupo das tangerineiras, selecionadas no BAG Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, em Cordeirópolis/SP. Para isso, a produção de inóculo foi realizada a partir de lesões típicas de folhas necrosadas de variedade altamente suscetível (tangerina Osceola) e, na seqüência, efetuaram-se as inoculações em folhas destacadas e em plântulas. Aproximadamente três dias após, fez-se a contagem do número de lesões por folha e uma estimativa da severidade da doença. Mais da metade das variedades apresentou sintomas da doença porém, com diferentes graus de suscetibilidade. Variedades como a tangerina Dancy e Lee foram as mais suscetíveis; por outro lado, o grupo das satsumas e mexericas, e algumas tangerinas, como Thomas e Fremont, mostraram-se resistentes, indicando novas opções para a citricultura nacional.

Abstract

The alternaria brown spot has caused serious damages in commercial orchards of Ponkan mandarin and Murcott tangor. In this research, *in vitro* and *in vivo* inoculations of the *Alternaria alternata* fungus were held in 78 different varieties of mandarin groups, selected in Citrus Germplasm Bank of the Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, in Cordeirópolis/SP, Brazil. For this, inoculum production was held from typical lesion of leaves of susceptible variety (Osceola mandarin) and, following inoculations in detached leaves and seedlings were held. After approximately three days, the number of lesions in each leaf was counted, and the disease severity was estimated. More than a half of varieties showed symptoms of the disease. Dancy and Lee tangerines were the most susceptible; on the other hand the satsumas and willow leaf group and some tangerines, like Thomas and Fremont, showed resistance, indicating new options to the brazilian citriculture.

¹Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia Agrônômica, CCA/UFSCar, Araras-SP, ✉ denisp@cca.ufscar.br

²Orientadora: Pesquisadora Científica, Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis - SP

³Colaborador(a): Pesquisador(a) Científica, Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis - SP

⁴Colaborador(a): Graduando(a) em Engenharia Agrônômica, CCA/UFSCar, Araras - SP

⁵Colaborador: Graduando em Engenharia Agrônômica, ESALq/USP, Piracicaba - SP

Introdução

Apesar do consumo *per capita* de frutos de tangerina ter crescido, no país, ainda existe um enorme potencial de mercado, pela tendência da população mundial em consumir alimentos saudáveis, além da preocupação da indústria em desenvolver derivados, como sucos, a partir de novas variedades que satisfaçam a expectativa dos consumidores (BOTEON & NEVES, 2005).

As principais variedades e híbridos de tangerinas, atualmente cultivadas no Brasil, por ordem de área plantada, são a tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), o tangor Murcott (*C. sinensis* Osbeck X *C. reticulata* Blanco) e a tangerina Cravo (*C. reticulata* Blanco), sendo os maiores Estados produtores, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais (IBGE, 2007).

Nos pomares de tangerinas e híbridos das principais regiões produtoras do Brasil, a mancha marrom de alternária causada pelo fungo *Alternaria alternata* tem sido considerada a mais séria doença fúngica. Sua alta severidade em regiões de clima úmido, onde o controle é muito difícil, tem ocasionado o abandono de plantios comerciais de variedades altamente suscetíveis (PERES et al., 2003).

Os sintomas observados em pomares no Brasil são semelhantes aos de "alternaria brown spot of mandarins" ou "alternaria brown spot of Minneola tangelo", descritos em pomares da África do Sul, Austrália, Espanha, Israel, Turquia, Estados Unidos e Itália em diferentes variedades (HERRERA-ISLA, 1992; VICENTE et al., 1999; TIMMER et al., 2000; PERES et al., 2003).

No Brasil a presença da doença foi confirmada nos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo afetando seriamente os pomares formados pela variedade de tangerina Ponkan e tangor Murcott, principais variedades cultivadas no País, e em tangerina Dancy (GOES et al., 2001). A presença da doença vem inviabilizando a produção, principalmente do tangor Murcott no Estado de São Paulo, fazendo com que muitos citricultores erradiquem seus pomares, devido ao elevado número de pulverizações necessárias e, conseqüentemente drástico aumento no custo de produção.

Dessa forma, a busca por novas opções de variedades do grupo das tangerinas, com maior tolerância à mancha marrom de alternária é muito importante, e foi o principal objetivo desse trabalho.

Material e métodos

Genótipos avaliados

Um total de 78 variedades de tangerinas e híbridos foram selecionadas, incluindo mexericas, tangores, tangelos e satsumas. As variedades encontram-se no Banco Ativo de Germoplasma de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, em Cordeirópolis/SP. Essas variedades tiveram seus frutos colhidos e efetuou-se a retirada de suas sementes que posteriormente, foram semeadas em tubetes plásticos, contendo substrato específico para citros, e na seqüência transferidas para vasos contendo o mesmo substrato e mantidas sob alta umidade em casa de vegetação.

Inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata*

O inóculo foi obtido de lesões típicas da doença, em folhas de tangelo Osceola, em meio de cultura BDA (27°C em fotoperíodo de 12h); após 48 horas de crescimento, o micélio emergente foi transferido para meio de cultura BDA e incubado nas mesmas descritas acima. Após uma semana, confirmou-se a identidade do isolado através de microscopia óptica das estruturas de reprodução assexuada. Em seguida, foram transferidos 50 discos (5mm), com crescimento micelial, para meio de CaCO₃ para indução de esporulação (27°C, quatro dias em fotoperíodo de 12h). Na seqüência, adicionou-se 10mL de água destilada esterilizada nas superfícies das placas e, com a ajuda de uma espátula estéril, obteve-se uma solução de conídios, que foram filtrados e quantificados em hematocitômetro, sendo a suspensão ajustada para a concentração final de 10⁴ conídios/mL. Este inóculo final foi utilizado para instalação dos dois ensaios (*in vitro* e *in vivo*).

Para as inoculações *in vitro*, coletaram-se folhas jovens das 78 variedades em estudo no BAG-Citros. Utilizaram-se quatro folhas por variedade, que foram acondicionadas em placa de Petri com papel filtro e algodão umedecidos; borrifou-se cerca de 2 mL de inóculo/placa, na face abaxial das folhas e as mesmas foram mantidas em BOD (27 °C; fotoperíodo 12h).

Para a inoculação *in vivo*, houve a poda das plântulas, 45 dias antes da inoculação para induzir brotação; utilizaram-se três repetições por variedade e borrifou-se aproximadamente 4 mL de inóculo/ramo. Após inoculação, as plantas foram ensacadas com plástico transparente, previamente umedecido, por 48 horas.

As avaliações foram realizadas 72 horas após inoculação, e consistiu na determinação do número de lesões/folha e da área foliar infectada com auxílio de escala diagramática.

Resultados e discussão

A tabela 1 traz um resumo dos resultados das avaliações da inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata* com os principais genótipos de diferentes grupos das tangerinas.

Tabela 1. Reação das variedades de tangerinas e híbridos quanto à suscetibilidade e resistência à *A. alternata*, quando expostas à infecção em inoculação *in vivo* e *in vitro* (Cordeirópolis/SP, 2007/2008)

Variedades	Inoculação <i>in vivo</i>		Inoculação <i>in vitro</i>	
	Lesões (n°)	% área foliar lesionada	Lesões (n°)	% de área foliar lesionada
Dancy	64,00 a	31,70 a	27,30 defgh	7,25 abc
Green Rind	42,67 bc	15,00 cdef	166,70 bc	18,50 a
Mineola	34,33 cd	28,00 ab	38,30 defgh	7,25 abc
Murcott	32,00 cde	28,00 ab	10,30 fgh	2,50 bc
Osceola	28,67 de	28,00 ab	61,70 de	7,25 abc
Seminole	26,67 de	18,00 bcd	83,30 cd	12,00 ab
Sul da Africa	26,33 de	32,00 a	320,00 a	18,50 a
Caçula 4	25,33 de	28,00 ab	36,70 defg	2,50 bc
Creola	24,00 def	22,00 abc	61,70 de	7,25 abc
Muscia	19,33 efg	8,00 efgh	11,30 fgh	2,50 bc
Empress	7,00 fghij	5,00 efgh	226,70 ab	12,00 ab
Ponkan	5,00 hi	3,00 fgh	46,70 def	2,50 bc
Span Amer.	2,00 ij	3,00 fgh	65,00 cde	2,50 bc
Ponkan7	3,00 ij	11,70 defg	46,00 def	2,50 bc
Casca verde	0,00 j	0,00 i	1,00 hi	1,25 c
Japão	0,00 j	0,00 i	0,00 i	0,00 d
Wase	0,00 j	0,00 i	0,00 i	0,00 d
Owari	0,00 j	0,00 i	0,00 i	0,00 d
S. semente	0,00 j	0,00 i	0,00 i	0,00 d
Siracusa	0,00 j	0,00 i	0,00 i	0,00 d
T. da Sicília	0,00 j	0,00 i	0,00 i	0,00 d
Ortanique	0,00 j	0,00 i	0,00 i	0,00 d
Thomas	0,00 j	0,00 i	0,00 i	0,00 d
Fremont	0,00 j	0,00 i	0,00 i	0,00 d

*médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Tukey, 5%)

Do total de variedades avaliadas, 42 não apresentaram sintomas da doença após inoculação *in vivo*. Pode-se notar nos resultados da tabela 1, que o grupo das satsumas (Wase, Oware etc) e algumas variedades promissoras de tangerinas, como Fremont e Thomas, obtiveram alta resistência à doença nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Além delas, destacam-se também as mexericas (Tardia da Sicília, Siracusa etc), que foram resistentes em quase sua totalidade. Resultados similares são observados para os resultados *in vitro* (POLYDORO et al., 2007).

A grande maioria das variedades apresentou maior severidade e número de lesões nas inoculações *in vitro*, comparando-se com a inoculação *in vivo*. Esse resultado já poderia ser esperado pois, em ambiente com condições ideais e controladas (*in vitro*), o fungo tem melhores condições para se proliferar. Isso também foi observado por Reis (2007) na avaliação de diversas variedades do grupo das tangerineiras.

Dentre os genótipos sintomáticos neste estudo, destacam-se alguns já descritos na literatura como altamente suscetíveis em outros países, tais como a Dancy e híbridos diretos ou indiretos desta variedade (tangelos Minneola, Seminole, Orlando e Osceola), a tangerina Ponkan e o tangor Murcott (PEEVER et al., 2000).

Algumas variedades apresentaram inicialmente pequeno número de lesões *in vivo*, porém ao final da avaliação (3 dias após), apresentavam área foliar lesionada semelhantes à variedade com grande número de lesões no início. Isso foi observado nas variedades Ponkan 4 e Ponkan 7, por exemplo, o que demonstra que as variedades possuem diferentes comportamentos em relação à doença e que o desenvolvimento dos sintomas causados pela toxina pode ser mais lento em alguns materiais.

Recentemente, Vicent et al. (2003) observaram resistência de híbridos Ellendalle e Ortanique oriundos de cruzamento entre *C. sinensis* x *C. reticulata*, quando foram submetidos à inoculação de três isolados de *Alternaria alternata*. Essas mesmas variedades, também se mostraram resistentes nesse ensaio.

A variação encontrada no grau de resistência e suscetibilidade a *Alternaria alternata* é comum em trabalhos de patogenicidade envolvendo espécies cítricas a este fungo. Vicent et al. (2003), ao avaliarem a suscetibilidade a *Alternaria alternata* em laboratório, também encontraram variação na suscetibilidade entre as variedades testadas e relataram que essa variação pode ser influenciada pelo teste utilizado. Por isso nesse trabalho, utilizaram-se dois testes (*in vitro* e *in vivo*) seguindo método consagrado em trabalhos para testar resistência de espécies cítricas a *Alternaria alternata* descrito por Peever et al. (2000).

Conclusões

Há grande diferença de suscetibilidade à mancha marrom de alternária entre variedades do grupo das tangerineiras.

As satsumas e a maioria das mexericas são resistentes, além de algumas tangerinas.

Referências bibliográficas

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Org.). *Citros*. Campinas: Instituto Agrônomo/FUNDAG, 2005. p. 19-36.

GOES, A.; MONTES DE OCA, A.G. & REIS, R.F. Ocorrência de la mancha de alternaria em mandarina 'Dancy' en el Estado de Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, p.386, 2001

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

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 abril. 2007

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*, v.90, p.407-414, 2000.

PERES, N.A.R.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. *Plant Disease*, v.87, p.750, 2003.

POLYDORO, D.A.; PIO, R.M.; AZEVEDO, F.A.; COSTA, F.P.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K.C.; STUART, R.M. Avaliação de resistência à mancha marrom de alternária em genótipos do grupo das tangerinas. Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 1, 2008, Campinas. *Anais...* Campinas: PIBIC/IAC, 2007.

REIS, R.F. *Esporulação in vivo, período de suscetibilidade dos tecidos e reação de tangerinas e híbridos a Alternaria alternata*. 2005. 81p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

TIMMER, L.W.; SOLEL, Z.; OROZCO SANTOS, M. *Alternaria* brown spot of mandarin. In: TIMMERS, L.W.; GANSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. (Ed.). *Compendium of citrus diseases*. 2nd ed. Minnesota: APS Press, 2000. p.19-20.

VICENT, A.; BADAL, M.J.; ASENSI, N.; SANZ, N.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMENEZ, 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*, v.110, p.245-251, 2003.