

**TESTES DE FITOPATOGENICIDADE EM HÍBRIDOS COM POTENCIALIDADE DE RESISTÊNCIA À MANCHA *Alternaria alternata* f.sp. citri. IDENTIFICADOS ATRAVÉS do MARCADOR faFLP, ORIUNDOS DE CRUZAMENTO CONTROLADOS ENTRE “FOLHA MURCHA” X “PONCÃ”. Rafael Henrique de Freitas Noronha, Jairo Oswaldo Cazetta, Larissa Fernanda Simielli Fonseca.- Agronomia - Agronomia - Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal.**

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas e de suco concentrado congelado. A produção nacional de laranja foi de aproximadamente 454.181.985 milhões de caixas na safra 2002/03, atingiu 414.278.676 na safra de 2003/04 e a estimativa para safra 2004/05 é de 416.121.740 milhões de caixas (Agrianual, 2005). Estes dados revelam falta de estabilidade da produção principalmente em função do surgimento de doenças. Para a maioria das espécies cultivadas, o principal fator responsável pela redução na produtividade é a ocorrência de doenças, causada por inúmeros patógenos. Figueiredo (1999) cita que os principais problemas encontrados para a produção atual e futura de citros no país são as doenças. Contudo, há algumas alternativas para reduzir ou até eliminar essas doenças, sendo a mais importante a obtenção de variedades resistentes, sobretudo por não onerar os custos de produção e não provocar problemas ecológicos e nem contaminar os produtos.

A mancha marrom de *Alternaria*, ou simplesmente mancha de *Alternaria* das tangerineiras, é uma doença cujos sintomas são semelhantes aos já descritos em pomares da África do Sul, Austrália, Espanha, Israel, Turquia e Estados Unidos (*Alternaria brown spot of mandarins* ou *Alternaria Brown spot of Minneola tangelo*) (Informativo, 2003). No Brasil, o primeiro foco da doença foi constatada pela primeira vez no Estado do Rio de Janeiro, principalmente atacando tangerineira “Dancy” (Goes, 2001). Na safra 2002/03, esta doença também já tinha sido constatada nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, causando danos em pomares de tangerineira ‘Poncã’ e, principalmente, em tangoreiros “Murcott” (Spósito et al., 2003).

Os sintomas da doença ocorrem em folhas, ramos e frutos, podendo causar um desfolhamento intenso nas variedades susceptíveis, enquanto as manchas na casca reduzem, significativamente, o valor comercial da fruta fresca. Em folhas jovens, os sintomas se caracterizam, inicialmente como pequenas manchas de coloração marrom ou preta, apresentando halos amarelados ao redor destas. Posteriormente, as lesões expandem-se em áreas necrosadas circulares que podem envolver grande área da folha. Os frutos jovens podem ser infectados logo após a queda de pétalas, sendo que, neste caso, uma pequena lesão pode induzir à abscisão do frutinho. Em frutos maiores ocorrem pequenos pontos até grandes lesões escuras, geralmente na forma de erupções corticosas, que podem soltar do fruto formando pequenos cancrios na sua superfície. (Peres & Timmer, 2003).

A laranjeira “Folha Murcha” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) é uma variedade com frutos de ótima qualidade, cuja maturação se dá nos meses de janeiro a março nas condições do Rio de Janeiro, período que existe uma forte demanda por laranjas (entressafra). Tem, por isso, grande interesse para o mercado de fruta fresca em São Paulo. Sua produtividade é considerada boa. Apresenta folhas enroladas, ou retorcidas. Os frutos medem em média 6,35 cm de altura e 6,46 cm de diâmetro, apresentam forma arredondada, levemente achatada, com ocorrência também de frutos oblongos. A casca é fina, levemente rugosa, de cor laranja, típica das laranjas doces. A polpa é fina, com eixo central compacto. O número médio de sementes varia entre dois e seis por fruto. Apresentam acidez de 1,30%, sólidos solúveis 13° Brix. Trabalhos do Instituto Biológico relataram que várias introduções de ‘Folha Murcha’, todas de maturação tardia, presentes no Banco Ativo de Germoplasma do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” (BAG-CCSM) mostraram bons níveis de resistência ao cancro cítrico, e boas características agrônômicas. Estudos realizados no Paraná encontraram que a “Folha Murcha” é resistente ao cancro cítrico, mostra certa tendência a ser menos suscetível ao amarelinho, é tolerante à Tristeza, comportando-se como a “Natal” ou a “Valência” e diferindo da “Pêra” neste aspecto (Stuchi & Donadio, 2000).

O presente projeto teve como objetivo identificar híbridos com potencialidade para resistência à Mancha de *Alternaria* das Tangerineiras, oriundos de cruzamentos controlados entre “Folha Murcha” x “Poncã”, obtidos com auxílio da técnica de cultura de embriões, através de marcador fAFLP.

A identificação das plântulas e o teste de fitopatogenicidade foram realizados no Departamento de Tecnologia e Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP/Jaboticabal.

Os conídios usados para inoculação nos testes de fitopatogenicidade foram produzidos por transferência micelial de BDA para placas contendo meio BDA (10 mL), mais pobre nutricionalmente. As placas não seladas foram incubadas à 27°C sob luz fluorescente branca-fria, fotoperíodo de 12 horas por 3 a 4 dias. Posteriormente, os conídios foram removidos da superfície da placa com auxílio de espátula de metal e água esterilizada, filtrada através de 4 camadas de Cheesecloth e lavados três vezes por centrifugação a 3.000 x g. A concentração de conídio foi estimada com auxílio de hemacitômetro. Uma gota da suspensão conidial do isolado, foi colocada na lâmina microscópica e incubada por 18 horas em câmara úmida para se avaliar a porcentagem de germinação e confirmar a viabilidade dos conídios.

O teste de fitopatogenicidade foi realizado com os híbridos identificados nas etapas anteriores. Folhas jovens, com aproximadamente 8 dias de idade após o início da brotação, foram destacadas das plantas e higienizadas com água destilada e algodão. Posteriormente, as folhas foram colocadas em placas de Petri forradas com papel de filtro e umedecidas. Colocou-se duas folhas de cada híbrido por placa. Em seguida, com o auxílio de um spray manual, as folhas foram pulverizadas com uma solução concentrada de conídios de  $1 \times 10^4$ . A testemunha foi pulverizada com água destilada e esterilizada. Em seguida, as amostras foram mantidas em câmara úmida e incubadas à 27°C por aproximadamente 200 horas. O Experimento foi repetido por duas vezes. Os surgimentos dos sintomas foram avaliados a cada 72 horas, com início 72 horas após a inoculação.

A avaliação do teste de fitopatogenicidade foi feita pela presença e ausência de sintomas. A severidade foi avaliada em função da menor ou maior suscetibilidade das folhas ao surgimento do sintoma, de acordo com a seguinte notação: - indica que não houve sintoma; + indica o surgimento do sintoma; ++ indica que a folha estava parcialmente tomada pelo fungo e; +++ indica que a folha estava totalmente tomada pelo fungo.

Na Tabela 1, pode-se observar um resumo do quantitativo de híbridos encontrados no total de plantas analisadas. Os dados dessa tabela servem de referência para todos os resultados discutidos nos itens subsequentes.

**Tabela 1.** Resumo da quantidade de plantas analisadas, de híbridos identificados nos cruzamentos “Folha Murcha” x “Poncã” e os respectivos pares de “primers” utilizados em cada cruzamento.

Cruzamentos	Total de Plantas	Total de Híbridos e Pares de “primers”		Híbridos idênticos nos dois pares de “primers”
		ACC-CAA	AAG-CAG	
“Folha Murcha” x “Poncã”	101	48	21	20

Foram analisadas um total de 101 plantas e encontradas 49 híbridos, ou seja 48,5%. As 52 plantas restantes, são clones nucleares. O par de “primer” ACC-CAA identificou um total de 48 plantas diferentes da planta mãe. Já o par de “primer” AAG-CAG identificou apenas 21 plantas, sendo que deste total 20 plantas são iguais as já identificadas com o par de “primer” ACC-CAA. Este resultado indica que apenas o par de “primer” ACC-CAA é suficiente para identificar 97,8% dos híbridos oriundos do cruzamento “Folha Murcha” x “Poncã” (Tabela 1).

Os híbridos foram separados por grupos de acordo com o cruzamento do qual foi originado. Entre os parentais, foi realizado o teste e confirmada a suscetibilidade da tangerineira “Poncã” e a resistência da variedade de laranja doce Folha Murcha.

Avaliou-se, através do teste de fitopatogenicidade, 27 híbridos do cruzamento “Folha Murcha” x “Poncã”. (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resumo do teste de fitopatogenicidade realizado nas progênes, oriundas dos cruzamentos “Folha Murcha” x “Poncã”, inoculadas com isolados de *Alternaria alternata* f.sp. *citri*.

“Folha Murcha” x “Poncã”			
Progênes	Avaliações (dias após instalação)		
	4	7	10

Testemunha	-	-	-
FP39	+	+++	+++
FP42	+	+++	+++
FP43	-	-	+++
FP44	+	+++	+++
FP48	++	+++	+++
FP49	+	++	+++
FP55	++	++	+++
FP56	+	++	+++
FP57	+++	+++	+++
FP60	+	++	+++
FP62	++	+++	+++
FP72	+	+	++
FP77	+	++	+++
FP79	+	+	+++
FP80	++	+++	+++
FP85	+	++	+++
FP98	+	++	+++
FP99	+++	+++	+++
FP104	+	+++	+++
FP109	-	++	+++
FP113	-	+	+
FP123	+++	+++	+++
FP131	-	-	-
FP132	-	++	+++
FP134	-	+++	+++
FP139	+	+	+
FP142	+	++	+++

- = não apresentou sintoma  
+ = presença de sintoma  
++ = folha parcialmente tomada pelo fungo  
+++ = folha totalmente tomada pelo fungo

Não foi observado sintoma de mancha de alternaria nas testemunhas. Esse resultado já era esperado devido o fato das testemunhas terem sido pulverizadas com água destilada e autoclavada (Tabela 2).

A maioria dos híbridos submetidos ao teste de fitopatogenicidade apresentaram sintoma de suscetibilidade ao isolado de *Alternaria alternata* f.sp. *citri*. Entretanto, observa-se, através da Tabela 2, que houve uma grande variação no grau de resistência e/ou suscetibilidade dos híbridos de acordo com as avaliações realizadas (aos 4, 7 e 10 dias após a inoculação).

A maioria dos híbridos apresentaram sintomas após 4 dias da inoculação e o desenvolvimento da lesão foi aumentando de tamanho de acordo com as avaliações, até a folha ficar completamente tomada pelo fungo (após 10 dias após a inoculação). Entretanto, o híbrido FP72 e FP139, embora tenham apresentado sintoma na primeira avaliação, a lesão se manteve constante durante o período de realização do teste. Outros, como o FP57, FP99, FP123 e NP4 se apresentaram altamente suscetível ao fungo.

Em alguns híbridos (FP109, FP113, FP132, FP134, PP5 e PP24), o surgimento do sintoma só foi observado após 7 dias da inoculação. Dentre estes, pode-se destacar o FP113 e PP5 que não favoreceram o desenvolvimento do sintoma, ficando estes estáveis até o final do teste. Já o híbrido FP43 somente apresentou sintoma após 10 dias. Entretanto, a lesão já estava bastante desenvolvida.

O FP131 foi o único, dentre os híbridos testados, que não apresentou sintoma em nenhuma das avaliações. Nas condições em que o trabalho foi conduzido, o híbrido mostrou-se resistente ao isolado de *Alternaria alternata* f.sp. *citri*.

A variação encontrada no grau de resistência e/ou suscetibilidade a *Alternaria alternata* f.sp. *citri* é comum em trabalhos de fitopatogenicidade envolvendo espécies cítricas. Vicent et al. (2003),

avaliando a suscetibilidade de variedades de citros a *Alternaria alternata* pv. *citri* em laboratório, também encontrou grande variação na suscetibilidade entre variedades de citros testadas em seu trabalho. Gardner et al. (1986), também relata que essa variação é influenciada pelo tipo de teste utilizado. No presente trabalho, o teste utilizado, com alguns ajustes, seguiu a metodologia já consagradas em inúmeros trabalhos (Kohmoto et al., 1991; Solel e Kimchi, 1997; Peever et al., 1999 e 2002 e Vicent et al., 2003), os quais são conduzidos para testar a suscetibilidade dos cítricos a mancha marrom de alternaria. Outro fator que contribui para a variação no grau de resistência e/ou suscetibilidade a mancha marrom das tangerineiras e o tipo de isolado e o local em que o isolado foi obtido. Desta forma, a confirmação de resistência de algumas variedades de tangerina e híbridos destes à *Alternaria alternata* já foram verificadas em vários trabalhos.

Finalmente, vale ressaltar que os híbridos identificados são plantas que apresentam um potencial para resistência a uma série de doenças que estão presentes na citricultura. Também podem apresentar outras características agronomicamente desejáveis. Desta forma, as plantas serão levadas para o campo e novas avaliações serão realizadas futuramente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL 2003 : anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2002. p.513-524.
- FIGUEIREDO, J.O. de. Cultivares de laranjeiras no Brasil. In: 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTICULTURA E PRODUÇÃO E QUALIDADE DE FRUTOS CÍTRICOS, 1, Botucatu, 1999. p.87-108.
- 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**, v.29, p.293-304, 1986.
- GOES de 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. In: XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 24, 2001, São Pedro, SP. **Anais...** São Pedro, SP, 2001. p.386.
- INFORMATIVO CENTRO DE CITRICULTURA. **Mancha de Alternaria das tangerineiras**. Cordeirópolis, n.3, 2003. 4p. (Informativo Centro de Citricultura).
- KOHMOTO, K.; AKIMITSU, K.; OTANI, H. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. **Phytopathology**, v.81, p.719-722, 1991.
- MACHADO, M.A. et al. Melhoramento de citros para resistência à doenças. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS, 2., 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa-MG: UFV, 2000. p.82-86.
- PEEVER, T.L.; CANIHOS, Y.; OLSEN, L.; ALBANEZ, A.; LIU, Y.C.; TIMMER, W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. Causing brow spot of Minneola Tangelo and Rough Lemon in Florida. **Phytopathology**, v.89, n.10, p.851-860, 1999.
- PEEVER, T.L.; OLSEN, L.; ALBANEZ, A.; TIMMER, W. Genetic differentiation and host specificity among population of *Alternaria* spp. Causing brow spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. **Phytopathology**, v.90, n.4, p.407-414, 2000.
- PERES, N.A.R.; TIMMER, L.W. Mancha de Alternaria: uma nova doença das tangerineiras. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v.33, p.8-9, 2003.
- SOLEL, Z.; KIMCHI, M. Suscetibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. **Journal of Phytopathology**, v.145, p.389-391, 1997.
- SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L.; RENAUD, M.S.A. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, v.28 (Suplemento), p.S231, 2003.
- STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. **Laranjeira Folha Murcha**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP/EECB, 2000. 35p. (Boletim Citrícola, 12).
- VICENT, A.; BADAL, M.J.; ASENSI, 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.00, p.1-7, 2003.