Marisa Silveira Almeida Renaud
Engenheiro Agrônomo

Escala diagramática para avaliação da Mancha Marrom de Alternaria de citros e efeito de variáveis ambientais na infecção de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*

Orientadora:
Profª Drª **LILIAN AMORIM**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2005

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Renaud, Marisa Silveira Almeida
Escala diagramática para avaliação da Mancha Marrom de Alternaria de citros e efeito de variáveis ambientais na infecção de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* / Marisa Silveira Almeida Renaud. - - Piracicaba, 2005.
75 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

1. Doença de planta 2. Fungo fitopatogênico 3. Mancha-de-Alternaria 4. Microscopia 5. Tangerina I. Título

CDD 634.31

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

"O que antes parecia impossível torna-se
possível quando alguém se sente apto a
transpor todos os obstáculos, conhecendo
sua verdadeira grandeza interior"
Nuno Cobra

A Deus
OFEREÇO

Aos meus pais João e Sonia
Verdadeiros heróis e exemplos

Às minhas irmãs Daniela e Flávia
Quem amo muito e sinto falta

À minha querida sobrinha Maria Rachel
Presente de Deus, que fez o mundo ficar mais bonito

Ao meu noivo Gustavo
Amigo e companheiro de todas as horas, a quem tanto amo
DEDICO

Agradecimentos

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar este curso de Mestrado.

À minha orientadora, Profª Drª Lilian Amorim, pelo exemplo de competência, ética e dedicação ao ensino e à pesquisa em Fitopatologia, e sobretudo pela atenção e ensinamentos fundamentais na minha formação.

Ao Prof. Dr. Armando Bergamin Filho e aos pesquisadores Eduardo Feichtenberger e Marcel B. Spósito, pela contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Hiroshi Kimati, pela sua maneira sempre carinhosa e atenciosa comigo.

Aos professores, funcionários e estagiários do Departamento, pelo ensino e auxílio em vários momentos.

A todos os amigos do Setor de Fitopatologia, pela atenção, agradável convívio, companheirismo e amizade, em especial às minhas amigas Alessandra, Fabiana, Isolda, Raquel e Vanessa.

Aos pesquisadores Adriana Vieira e Pedro Abel, pela demonstração de verdadeira amizade e dedicação.

A todas as pessoas que com suas contribuições, tornaram possível a conclusão desta dissertação, pois as conquistas nunca são individuais, e sim coletivas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), pelo auxílio na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
1 INTRODUÇÃO 10
Referências 11
2 ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA DE CITROS 13
Resumo 13
Abstract 13
2.1 Introdução 14
2.2 Desenvolvimento 16
2.2.1 Revisão Bibliográfica 16
2.2.1.1 Importância e distribuição geográfica da Mancha Marrom de Alternaria 16
2.2.1.2 Sintomatologia da Mancha Marrom de Alternaria 17
2.2.1.3 Controle da Mancha Marrom de Alternaria 18
2.2.1.4 Quantificação da severidade de doenças 19
2.2.2 Material e Métodos 20
2.2.2.1 Elaboração da escala diagramática 20
2.2.2.2 Validação da escala diagramática 21
2.2.2.3 Análise dos dados 21
2.2.3 Resultados e Discussão 22
2.2.3.1 Elaboração da escala diagramática para quantificação da severidade da Mancha Marrom de Alternaria em frutos de citros 22
2.2.3.2 Validação da escala diagramática 24
2.3 Conclusões 32
Referências 32
3 EFEITOS DA TEMPERATURA E DO PERÍODO DE MOLHAMENTO NA INFECÇÃO DE *Alternaria alternata* f. sp. *citri* EM FRUTOS DE TANGOR 'MURCOTT' 36
Resumo 36
Abstract 37

3.1 Introdução 37
3.2 Desenvolvimento 39
3.2.1 Revisão Bibliográfica 39
3.2.1.1 Etiologia da Mancha Marrom de Alternaria 39
3.2.1.2 Epidemiologia da Mancha Marrom de Alternaria 40
3.2.2 Material e Métodos 41
3.2.2.1 Obtenção e preparo do inóculo 41
3.2.2.2 Efeitos da temperatura e do período de molhamento na germinação de isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri in vitro* 42
3.2.2.2.1 Análise dos dados 43
3.2.2.3 Efeitos da temperatura e do período de molhamento no desenvolvimento da Mancha Marrom de Alternaria 43
3.2.2.3.1 Análise dos dados 44
3.2.2.4 Análise de imagens da formação de apressórios de conídios de quatro isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* ao microscópio eletrônico de varredura 44
3.2.3 Resultados 45
3.2.3.1 Efeitos da temperatura e do período de molhamento na germinação de isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri in vitro* 45
3.2.3.2 Efeitos da temperatura e do período de molhamento foliar no desenvolvimento da Mancha Marrom de Alternaria 63
3.2.3.3 Análise de imagens da formação de apressórios de conídios de quatro isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* ao microscópio eletrônico de varredura 67
3.2.4 Discussão 70
3.3 Considerações Finais 72
Referências 72

RESUMO

Escala diagramática para avaliação da Mancha Marrom de Alternaria de citros e efeito de variáveis ambientais na infecção de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*

A doença conhecida como Mancha Marrom de Alternaria, incitada pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, é recente no Brasil e apenas métodos de controle preventivos são utilizados. Visando uma maior compreensão do patossistema citros - *A. alternata* f. sp. *citri*, esta dissertação teve por objetivos: (i) elaborar e validar uma escala diagramática para a avaliação da severidade da Mancha Marrom de Alternaria de citros; (ii) avaliar o efeito da temperatura (10 - 15 - 20 - 25 - 30 - 35 °C) e do período de molhamento (8 - 12 - 24 - 48 h) na germinação *in vitro* de quatro isolados do fungo; (iii) avaliar o efeito da temperatura (20 - 25 - 30 °C) e período de molhamento (8 - 24 - 48 h) na infecção de frutos de tangor 'Murcott' inoculados com dois isolados do fungo. Dois tipos de sintomas foram representados na escala diagramática: lesões pequenas circulares ou irregulares, com 6 níveis de severidade da doença (0,1; 1; 2,5; 5; 11 e 25%) e lesões grandes e circulares com 5 níveis (1; 2,5; 5; 10 e 17%). A escala foi validada por quatro avaliadores experientes na quantificação de doenças. Com o auxílio da escala diagramática, a avaliação da doença tornou-se mais precisa e mais acurada, do que quando a escala não foi utilizada. O efeito da temperatura e do período de molhamento foi avaliado na germinação dos conídios do fungo sob condições *in vitro* e na incidência da doença em frutos de tangor 'Murcott'. A germinação ocorreu em todas as combinações de temperatura e molhamento. A maior porcentagem de germinação ocorreu com 24 horas de molhamento na maioria das temperaturas, para os quatro isolados testados. O intervalo de temperatura mínima para a germinação dos isolados, estimado por modelos matemáticos ajustados aos dados foi 7,1 a 9,9 °C, e o intervalo de temperatura máxima foi 36,8 a 52,5 °C. Além desse ensaio, avaliou-se, *in vitro*, o efeito de descontinuidade dos períodos de molhamento a 25 °C. Apesar das maiores porcentagens de germinação ocorrerem sempre no período de molhamento contínuo de 24 horas, quando os períodos de molhamento foram descontínuos as porcentagens de germinação não foram muito reduzidas. No experimento *in vivo*, frutos de tangor 'Murcott' maduros foram inoculados com suspensão de conídios de dois isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* e avaliados durante 7 dias após a inoculação. Nas três temperaturas testadas, a incidência da doença foi acima de 70% para um isolado do fungo e acima de 90% para o outro, ambos para 24 horas de molhamento.

Palavras-chave: Patometria; germinação; microscopia eletrônica de varredura

ABSTRACT

Diagrammatic scale for assessment of Alternaria Brown Spot of citrus and effect of environmental variables in the infection of *Alternaria alternata* pv. *citri*

The disease known as Alternaria Brown Spot of citrus, caused by *Alternaria alternata* pv. *citri*, is recent in Brazil and only preventive methods of control have been adopted. In order to better understand the pathosystem citrus - *A. alternata* pv. *citri*, this study aimed to (i) generate and validate a diagrammatic scale to assess the severity of Alternaria Brown Spot of citrus; (ii) evaluate the effects of temperature (10 - 15 - 20 - 25 - 30 - 35 °C) and wetness period (8 - 12 - 24 h) in *in vitro* germination of four fungi isolates; and (iii) evaluate the effects of temperature (20 - 25 - 30 °C) and wetness period (8 - 24 - 48 h) on infection in 'Murcott' tangor fruits inoculated with two fungi isolates. Two types of symptoms were represented in the diagrammatic scale: small circular or irregular lesions in six levels of disease severity (0.1; 1; 2.5; 5; 11 and 25%) and large circular lesions in five levels (1; 2.5; 5; 10 and 17%). This scale was validated by four experts in disease quantification. The evaluation of the disease became more accurate and precise with the aid of the diagrammatic scale. The effects of temperature and wetness period was evaluated over conidia germination *in vitro* and on the incidence of the disease in 'Murcott' tangor fruits. Germination occurred under all combinations of temperature and wetness period. The greatest percentage of germination for all four isolates was with 24 wetness period on most temperatures for all isolates. The minimum germination temperature for the isolates, estimated by mathematical models fitted to the data, was from 7.1 to 9.9 °C, while the maximum temperature ranged from 36.8 a 52.5 °C. In another test, the effect of discontinued wetness periods was tested at 25 °C. Even though the greatest percentages of germination constantly occurred in the period of 24 h of continuous wetness, the germination ratios were not appreciably reduced with discontinued wetness periods. In an *in vivo* experiment, ripe 'Murcott' tangor fruits were inoculated with a suspension of two *A. alternata* pv. *citri* isolates and evaluated seven days later. On the tree tested temperatures, when fruits were kept under 24 hours of wetness after inoculation, disease incidence was above 70% to one fungus isolate and above 90% to another.

Keywords: Pathometry; germination; scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

A Região Sudeste é responsável pela maior produção brasileira de tangerinas, seguida pelas Regiões Sul, Nordeste, Centro-Oeste e Norte. Aproximadamente 57% da produção de tangerina, 87% de limão e 83% de laranja, da Região Sudeste são produzidas no Estado de São Paulo (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005). Atualmente, o Brasil exporta apenas 2,46% de sua produção de tangerina (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005), um mercado que poderia ser mais explorado, pois apenas os Estados Unidos, por exemplo, importam 84% do seu consumo de tangerina da Espanha (NACHREINER; SANTOS; BOTEON, 2004).

Em 2003, o tangor 'Murcott' tipo A foi comercializado com preço médio de R$ 1,05 por quilo, enquanto que o preço médio da tangerina 'Ponkan' tipo A, foi R$ 1,15 por quilo. Além da diferença de preços entre as variedades, os preços também diferem de acordo com a qualidade dos frutos, variando 32% em tangor 'Murcott' e 36% em tangerina 'Ponkan' (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005). A redução da qualidade dos frutos é causada, freqüentemente, por doenças que atacam tanto as plantas quanto os frutos, os quais constantemente ameaçam a citricultura paulista (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2004). Atualmente, no cultivo de tangerinas e seus híbridos, a principal doença é a Mancha Marrom de Alternaria, causada por *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, que pode causar intensa desfolha e queda de frutos, acarretando grandes perdas aos produtores (FEICHTENBERGER, 2003; TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000; TIMMER et al., 2003). O controle da doença é preventivo, realizado através da aplicação de fungicidas.

A quantificação de doenças deve ser feita através de métodos que proporcionem a aquisição de dados confiáveis. Assim, para quantificar doenças em frutos, a incidência é a variável normalmente utilizada. Entretanto, nesta dissertação, a severidade foi a variável utilizada para a elaboração da escala diagramática, pois o propósito era contribuir na adoção de práticas de controle, visando verificar a eficiência de fungicidas, a avaliação epidemiológica, a resistência entre variedades, etc. Atualmente, escalas diagramáticas constituem uma importante ferramenta na avaliação da severidade de doença (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996), por proporcionarem medidas mais acuradas e precisas.

A importância econômica desta doença, para as condições brasileiras, ainda é pouco conhecida, portanto, estudos sobre o efeito de variáveis ambientais no progresso de doenças

devem ser realizados. Tais estudos, usualmente, são conduzidos durante o monociclo da doença, sob condições controladas em câmaras de crescimento, que permitem isolar os efeitos de fatores ambientais específicos, fornecendo dados que explicam o desenvolvimento epidêmico da doença em campo (KRANZ; HAU, 1980; ROTEM, 1988). Assim, os efeitos da temperatura e da duração do período de molhamento podem ser estudados isoladamente, propiciando faixas de temperatura e de período de molhamento necessárias para que ocorra a germinação do patógeno e a infecção, explicando a evolução da doença em campo.

Os objetivos desta dissertação foram: (i) elaborar e validar uma escala diagramática para a avaliação da Mancha Marrom de Alternaria em frutos de tangor 'Murcott', tangerinas, outros tangores e tangelos; (ii) verificar o efeito da temperatura e da duração do período de molhamento na infecção de conídios de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em frutos e *in vitro*, sob condições controladas.

Referências

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais:** epidemiologia e controle econômico. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.

FEICHTENBERGER, E. Manejo integrado das principais doenças fúngicas dos citros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.76, 2003. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia.

FNP COSULTORIA & COMÉRCIO. Citrus. In:_____. **Agrianual 2004**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2004. p.241-283.

FNP COSULTORIA & COMÉRCIO. Citrus. In:_____. **Agrianual 2005**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p.287-320.

KRANZ, J; HAU, B. Systems analysis in epidemiology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 67-83, 1980.

NACHREINER, M.L.; SANTOS, R.R.P.; BOTEON, M. **Janelas de mercado**: a fruticultura brasileira no mercado internacional. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/indicador/hfbrasil/edicoes>. Acesso em: 3 nov 2004.

ROTEM, J. Techniques of controlled-condition experiments. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. (Ed.). **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Berlin: Springer, 1988. p.19-31.

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

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

2 ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA DE CITROS

Resumo

Uma escala diagramática para a avaliação de sintomas da Mancha Marrom de Alternaria em frutos de citros foi desenvolvida considerando a distribuição, a forma, a freqüência das lesões e os níveis mínimo e máximo de severidade encontrados em campo. Os níveis intermediários seguiram incrementos logarítmicos. A escala representa dois tipos sintomas: lesões pequenas circulares ou irregulares, com 6 níveis de severidade da doença 0,1; 1; 2,5; 5; 11 e 25% e lesões grandes e circulares com 5 níveis 1; 2,5; 5; 10 e 17% da área do fruto lesionada. A validação da escala constituiu-se de duas etapas: na primeira, quatro avaliadores experientes na quantificação de doenças estimaram a severidade de 79 fotos de frutos de tangor 'Murcott' com diferentes níveis de doença, sem o uso da escala diagramática; na segunda etapa, estes mesmos avaliadores estimaram a severidade dos mesmos frutos com o uso da escala. Regressões lineares entre severidade real e severidades estimadas foram calculadas. Quando a escala não foi utilizada, o coeficiente de determinação (r^2) da regressão linear entre severidade real e severidade estimada para todo o conjunto de dados foi 0,69, o intercepto (a) foi 1,42 e o coeficiente angular (b) foi 0,77, enquanto que, com a escala, esses parâmetros foram de 0,84, 1,59 e 0,84, para r^2, a e b, respectivamente. Os dados obtidos revelam que, embora o intercepto com o uso da escala, tenha ficado mais distante de zero, todos os avaliadores foram mais acurados e três foram mais precisos quando a escala foi utilizada, do que sem a sua utilização. Os valores subestimados dos avaliadores ocorreram em frutos com presença de várias lesões pequenas. Nos demais frutos, as avaliações foram mais precisas. A escala mostrou-se adequada para avaliações da severidade da Mancha Marrom de Alternaria, em frutos de tangor 'Murcott', tangerinas, outros tangores e tangelos.

Palavras-chave: *Alternaria alternata* f. sp. *citri*; patometria; avaliação de doença.

Abstract

Diagrammatic scale for assessment of Alternaria brown spot of citrus

A diagrammatic scale to assess the symptoms of Alternaria Brown Spot in citrus fruits was developed considering the distribution, shape and frequency of lesions as well as minimum and maximum severity levels found in the field. The intermediate levels followed logarithmic increments. The scale represents two types of symptoms: small circular or irregular lesions with six levels of disease severity (0.1, 1, 2.5, 5, 11 and 25%); and big circular lesions with five severity levels (1, 2.5, 5, 10 and 17%) of the fruit's damaged area. The validation of the scale was done in two stages. Firstly, four experts in quantification of diseases estimated disease severity of 79 photographs of 'Murcott' tangor fruits with different levels of disease severity without using the diagrammatic scale. Secondly, the same raters estimated the severity of the disease in the same fruits, using the scale. Linear regressions between the real and estimated disease severities were

calculated. When the scale was not used, the coefficient of determination (r^2) of the linear regression between real and estimated severity for all data was 0.69, the intercept (*a*) 1.42 and the angular coefficient (*b*) 0.77, while with the scale these parameters were 0.84, 1.59 and 0.84 for r^2, *a* and *b*, respectively. These data show that, although the intercept was further from zero, when the scale was used, all raters were more accurate and three were more precise when the scale was used. The underestimated values of the raters occurred when the fruits presented several small lesions. In the other fruits the assessment was more precise. The scale was shown to be appropriate for severity assessment of Alternaria Brown Spot in fruits of 'Murcott' tangor, mandarins, and other tangors and tangelos.

Keywords: *Alternaria alternata* pv. *citri*, pathometry, disease evaluation

2.1 Introdução

A Mancha Marrom de Alternaria, ou simplesmente Alternaria Marrom, é causada pelo fungo *Alternaria alternata* Fr. (Keissler) f. sp. *citri*, ocorrendo principalmente em tangerinas e seus híbridos (tangores e tangelos), os quais apresentam diferentes sintomas nas diferentes variedades infectadas. Os sintomas em frutos de tangor 'Murcott' são lesões com centro corticoso e saliente, formando pústulas que se destacam com facilidade, deixando depressões circulares na superfície do fruto (FEICHTENBERGER, 2003; TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000; TIMMER et al., 2003). Em frutos de tangerinas, o que se observa são poucas lesões por fruto, porém maiores que em tangor 'Murcott', de coloração marrom-escura, algumas apresentam halo amarelado, porém não possuem centro corticoso. Os frutos são suscetíveis ao patógeno até aproximadamente 4 meses de idade e as folhas, durante sua fase de desenvolvimento (FEICHTENBERGER, 2003; WHITESIDE, 1993). No Brasil, o controle da doença é preventivo, realizado com o auxílio de calendário fixo de aplicações de fungicidas.

A despeito da crescente importância da Mancha Marrom de Alternaria dos citros, pouco se sabe sobre sua epidemiologia nas condições brasileiras, portanto, uma providência imediata é a adoção de um método de avaliação uniforme da doença em frutos de tangerinas e seus híbridos. Estudos epidemiológicos de doenças de plantas exigem confiabilidade, precisão e métodos reproduzíveis de quantificação. A incidência (porcentagem/freqüência de plantas doentes, ou partes de plantas doentes, em uma amostra ou população) e a severidade (porcentagem da área ou do volume de tecido coberto por sintomas) são métodos diretos de quantificação de doenças (AMORIM, 1995). Entretanto, a incidência só pode ser utilizada para aquelas doenças que atacam a planta toda, como as viroses sistêmicas e as murchas vasculares, ou para aquelas em que uma

única infecção é suficiente para impedir a comercialização do produto, como as podridões de frutos (AMORIM, 1995).

Quando a incidência não pode ser usada para quantificar doenças, então a severidade é a variável utilizada (GAUNT, 1995). A severidade de doenças é geralmente estimada visualmente, portanto, sujeita a erros de subjetividade do avaliador que são minimizados pelo uso de escalas diagramáticas (LEITE; AMORIM, 2002). Uma escala diagramática é a representação ilustrada de plantas ou partes de plantas, com sintomas da doença em diferentes níveis de severidade (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996), é de fácil utilização, aplicável a uma ampla gama de condições diferentes com resultados reproduzíveis e permitem rápida avaliação (BERGER, 1980).

O sucesso do uso de escalas, medido pela precisão e acurácia na estimativa da severidade da doença, dependem da experiência e percepção individual de cada avaliador. Antes que uma escala seja utilizada como método de avaliação padrão, ela deve ser validada por avaliadores experientes na quantificação de doenças de plantas e, em caso de resultados insatisfatórios, deve ser corrigida (NUTTER JR; SCHULTZ, 1995). Por exemplo, uma baixa distribuição de níveis intermediários de severidade da doença na escala, pode levar à alta variabilidade em estimar um intervalo de severidade específico. Neste caso, a correção da escala com a inclusão de níveis adicionais de severidade deve ser realizada para orientar o avaliador (AMORIM et al., 1993).

A escala diagramática é uma ferramenta necessária em estudos que visam uma melhor compreensão do patossistema citros - *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, pois apenas com um método confiável, que permita avaliações precisas e acuradas da severidade da doença, é possível a recomendação segura de medidas de controle.

O objetivo do presente trabalho foi elaborar e validar uma escala diagramática para a avaliação da Mancha Marrom de Alternaria em frutos.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

2.2.1.1 Importância e distribuição geográfica da Mancha Marrom de Alternaria

A Mancha Marrom de Alternaria é uma importante doença em tangerinas (*Citrus reticulata*) e seus híbridos (tangores e tangelos) (CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999). O agente causal foi originalmente descrito como *Alternaria citri* Ellis & N. Pierce e, mais tarde, renomeado *Alternaria alternata* Fr. (Keissler) f. sp. *citri* (Pegg 1966 apud CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999). A doença foi descrita pela primeira vez em tangerina 'Emperor', na Austrália em 1903 (TIMMER et al., 1998; TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000; WHITESIDE, 1993). Posteriormente foi encontrada na Flórida, em 1974, e subseqüentemente na África do Sul, Israel, Turquia, Colômbia (TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000) e Espanha (PEEVER et al., 2002). Na Flórida, a doença tornou-se um grande problema em tangerina 'Dancy' e tangelo 'Minneola' (WHITESIDE, 1993). A nomenclatura da doença é devido às lesões marrons produzidas nos frutos da variedade 'Emperor', sendo o nome menos apropriado para outras variedades, como 'Dancy' e 'Murcott', onde o sintoma aparece mais tipicamente como erupções corticosas e menos comumente como largas manchas marrons.

No Brasil, a doença foi primeiramente relatada em 2001, afetando tangerinas 'Dancy' no Estado do Rio de Janeiro (GOES; MONTES DE OCA; REIS, 2001). A partir de então, a doença vem sendo constatada em diferentes municípios. Na safra de 2003, a doença foi verificada em pomares comerciais no município de Campanha, MG, afetando tangerinas 'Ponkan' e 'África do Sul' e tangor 'Murcott'. Também foi identificada, no município de Montenegro, RS, afetando tangerina 'Ponkan' e tangor 'Murcott'. Em São Paulo, a ocorrência da Mancha Marrom de Alternaria foi confirmada nos municípios de Aguaí, Botucatu, Capão Bonito, Casa Branca, Conchal, Itapetininga, Limeira, Mogi Guaçu, Mogi Mirim, Pilar do Sul e São Miguel Arcanjo, afetando principalmente tangerina 'Ponkan' e tangor 'Murcott'. Em Capão Bonito, na Unidade do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio (APTA), a doença foi confirmada nos seguintes genótipos: tangerinas 'Cravo', 'Nova', 'Ponkan', 'Sul da África' e 'Sunburst', clementina 'Clemenules' e nos tangores 'Murcott', 'Murcott irradiada' e 'Ortanique' (SPÓSITO et al., 2003).

A Mancha Marrom de Alternaria é uma doença de importância econômica, pois afeta a produção, causa intensa desfolha, seca de ramos e queda de frutos, além de prejudicar o aspecto dos frutos e a comercialização de frutas frescas.

2.2.1.2 Sintomatologia da Mancha Marrom de Alternaria

Os sintomas da doença podem ocorrer em folhas, ramos e frutos (FEICHTENBERGER, 2003; SPÓSITO et al., 2003; TIMMER et al., 2003). Em folhas novas aparecem, primeiramente, lesões que são pequenas manchas marrons a pretas, as quais rapidamente tornam-se rodeadas por um halo amarelo e expandem-se à medida que as folhas tornam-se maduras (TIMMER et al., 2003). As lesões são áreas necrosadas circulares ou irregulares que podem, algumas vezes, envolver amplas partes da folha (AGUILAR-VILDOSO, 2003; TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000). A clorose e a necrose podem se estender ao longo das nervuras, no sentido acropétalo, da maneira como a toxina é translocada (TIMMER et al., 2003). A extensão da necrose na nervura é característica da infecção da folha (WHITESIDE, 1993). Áreas necróticas podem ser rapidamente colonizadas por *Colletotrichum gloeosporioides* e seus corpos de frutificação aparecem em círculos concêntricos (TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000). Assim, os sintomas desta doença são algumas vezes confundidos com aqueles de antracnose.

As folhas freqüentemente caem quando infectadas por *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (TIMMER et al., 2003). O período de suscetibilidade das folhas é durante sua fase de crescimento (FEICHTENBERGER, 2003), e à medida que a folha cresce, vai se tornando mais resistente à infecção (TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000). As brotações novas apresentam-se com aspecto de requeima, tanto do caule como das folhas, com tendência a envassouramento e morte dos ponteiros (AGUILAR-VILDOSO, 2003). Usualmente, em brotos jovens, são produzidas lesões entre 1 a 10 mm de diâmetro (TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000). Em alguns ramos finos, ainda triangulares, ocorrem pequenas lesões com ou sem halo clorótico (AGUILAR-VILDOSO, 2003). Nos demais ramos, as lesões são necróticas, de tamanho variado e de coloração marrom escura (FEICHTENBERGER, 2003). Os frutos podem ser infectados logo após a queda das pétalas, e até mesmo uma pequena lesão no fruto em formação pode causar sua imediata queda (TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000), a suscetibilidade dos frutos ao patógeno é aproximadamente até os frutos atingirem 4 meses de idade (FEICHTENBERGER,

2003). Nos frutos verdes, as lesões apresentam-se como pequenas pontuações deprimidas (aproximadamente 1 mm de diâmetro), de cor preta nas bordas e ligeiramente mais claras no centro, com um halo ligeiramente clorótico, podendo haver uma a várias lesões por fruto (AGUILAR-VILDOSO, 2003). Mais tarde, o centro das lesões pode se tornar corticoso e saliente, formando pústulas, que se destacam facilmente, deixando depressões circulares na superfície do fruto (FEICHTENBERGER, 2003; TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000, TIMMER et al., 2003).

Os sintomas podem desenvolver-se em 2 a 3 dias quando as temperaturas são favoráveis (TIMMER, [19__?]), e às vezes, podem aparecer com apenas 24 horas após a infecção (FEICHTENBERGER, 2003; TIMMER et al., 2003). O período de incubação, verificado em experimento realizado no Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, variou entre 24 a 48 horas (MASSOLA JÚNIOR[1], comunicação pessoal).

2.2.1.3 Controle da Mancha Marrom de Alternaria

A doença é controlada principalmente com a aplicação de fungicidas. Para tanto, duas abordagens podem ser adotadas: a do calendário fixo e a do sistema de avisos. No primeiro caso, várias aplicações de fungicidas cúpricos (WHITESIDE, 1993), de mancozeb (SWART et al., 1996) ou de iprodione (SOLEL; KIMCHI, 1996) devem ser realizadas a partir da florada, durante 3 a 4 meses, no período de suscetibilidade do fruto. Dos fungicidas utilizados, apenas o iprodione, tornou-se inócuo ao controle da doença, pelo desenvolvimento de estirpes resistentes em Israel e nos Estados Unidos da América (SOLEL; KIMICHI, 1996). Sabe-se que sucessivas aplicações de fungicidas com o mesmo princípio ativo, podem levar a uma rápida resistência do patógeno, e que, a longo prazo, uma redução na quantidade de fungicidas aplicada aos frutos é indispensável.

A outra maneira de se controlar a Mancha Marrom de Alternaria é pela a aplicação de fungicidas de acordo com o sistema de avisos, denominado Alter-Rater. Este sistema é bastante recente e baseia-se em um modelo que indica os períodos em que há condições ambientais favoráveis à infecção (TIMMER, 2000; TIMMER; BHATIA, 2001). Esse modelo foi construído com dados experimentais coletados nos Estados Unidos e indica ao produtor a necessidade de

---

[1] MASSOLA JÚNIOR, N. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo.

pulverização, após monitoramento diário do clima.

Outras medidas de controle também devem ser utilizadas, tais como: plantar mudas sadias, selecionar áreas para o cultivo com boa circulação de ar, aumentar o espaçamento entre as plantas para diminuir umidade, reservar áreas mais altas e arejadas do pomar para o cultivo das variedades mais suscetíveis, manter boas condições de nutrição e sanidade do pomar, evitando-se o uso intenso de adubações nitrogenadas, que contribuem para aumentar os surtos de brotação nova nas plantas, além de pulverizar as plantas com fungicidas que apresentam comprovada ação contra o fungo, como estrubilurinas, dicarboximidas, triazóis, ditiocarbamatos e produtos à base de cobre (FUNDECITRUS, 2005).

2.2.1.4 Quantificação da severidade de doenças

Uma das fases mais importantes de um programa de manejo de doenças de plantas é a quantificação de doenças. O desenvolvimento de métodos de quantificação, prevenindo erros na aquisição de dados é necessário, tanto para o estudo de medidas de controle, como para a construção de curvas de progresso da doença e estimativas dos danos por ela provocados (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996).

Existem várias técnicas modernas para avaliar a severidade de doenças com precisão: imagens de vídeo, fotografia infravermelha, termógrafo infravermelho, reflectância espectral de copa e imagem de ressonância magnética nuclear (NILSSON, 1995). Algumas técnicas requerem equipamentos sofisticados, que são caros, com exceção da análise de imagens e da avaliação indireta da doença medida pelo estresse da planta. O estresse da planta pode incluir outros fatores como um estresse abiótico, deficiência nutricional, etc., além da doença (GODOY et al., 1997), o que torna este método de avaliação desvantajoso.

A estimativa da severidade consiste em um método direto de avaliação de doenças, no qual a porcentagem de área de tecido coberto por sintomas retrata melhor a intensidade da doença do que a incidência (AMORIM, 1995). Embora a estimativa da severidade da doença seja um método subjetivo de avaliação de doença, esta variável é a que melhor se relaciona ao dano causado pelos patógenos. Dentre as várias estratégias propostas para facilitar a avaliação da severidade de doenças, diversas escalas diagramáticas têm sido adotadas como padrões de comparação, representativos de área lesionada (AMORIM et al., 1993; LEITE; AMORIM, 2002).

A elaboração de uma escala diagramática deve levar em consideração os seguintes aspectos: o limite superior da escala deve corresponder à quantidade máxima de doença observada no campo; a determinação da quantidade real de doença no campo e sua representação na escala devem ter alta precisão; as subdivisões da escala devem respeitar as limitações da acuidade visual humana; a vista humana lê tecido doente para níveis de severidade inferior a 50% e tecido sadio para níveis de severidade superior a 50% (HORSFALL; COWLING, 1978). Além desses cuidados, o sucesso do uso de escalas, medido pela precisão e acurácia na estimativa da severidade da doença, depende da experiência e percepção individual de cada avaliador, para isto, existem atualmente alguns programas de computador, a exemplo os programas Distrain (TOMERLIN; HOWELL, 1988) e Dispro (NUTTER JR; WORAWITLIKIT, 1989), destinados especificamente ao treinamento de pessoas para a quantificação de doenças.

2.2.2 Material e Métodos

2.2.2.1 Elaboração da escala diagramática

Na confecção da escala diagramática, 200 frutos de tangor 'Murcott' e 200 de tangerina 'Ponkan' com sintomas característicos de Mancha Marrom de Alternaria, apresentando variações nos níveis de severidade da doença, foram fotografados com máquina digital (Science Kodak DC 120 Zoom), visando determinar a forma, a distribuição e a freqüência das lesões, assim como quantificar a área sadia e a área lesionada do fruto. A medida da área lesionada foi obtida após a reprodução das lesões em plástico transparente e a área total foi obtida diretamente por impressões que reproduziram o tamanho original dos frutos. Ambas as áreas foram mensuradas com o auxílio de um medidor de área (LICOR® LI-3000). Os níveis mínimo e máximo foram determinados por dois critérios: os níveis reais observados no campo e por sugestões de pesquisadores experientes na quantificação de doenças dos citros. Os valores de severidade adotados em cada nível da escala obedeceram ao princípio da lei de "Weber-Fechner", onde acuidade visual é proporcional ao logaritmo da intensidade do estímulo (HORSFALL; BARRATT, 1945). A representação da escala foi feita no programa Paint (Microsoft® versão 5.1), onde um fruto de tangor 'Murcott' de tamanho padrão foi desenhado onze vezes e os sintomas foram representados por meio de pequenos círculos ou áreas irregulares (coalescência de lesões) em seis deles e por meio de

círculos maiores em cinco, de modo a reproduzir os dois tipos de sintomas mais freqüentemente encontrados no campo. A quantificação da severidade desses frutos foi feita no programa Quant versão 1.0.1 (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2001). Além do Quant também foi utilizado o medidor de área, como descrito anteriormente, para a confirmação da severidade.

2.2.2.2 Validação da escala diagramática

A validação da escala diagramática consistiu de duas etapas. Na primeira, um grupo de quatro avaliadores experientes na quantificação de doenças de plantas estimou a severidade da doença (em porcentagem de área com sintomas) de 79 fotos de frutos de tangor 'Murcott' com sintomas da Mancha Marrom de Alternaria, sem o auxílio da escala diagramática. Na segunda etapa, os mesmos avaliadores estimaram a severidade da doença dos mesmos frutos de tangor 'Murcott', com o uso da escala diagramática. A severidade real de todos os frutos utilizados na validação foi quantificada com medidor de área (LICOR® LI-3000) e no programa Quant versão 1.0.1 da mesma forma descrita no item anterior.

2.2.2.3 Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada por regressões lineares entre a severidade real (variável independente) e as severidades estimadas (variável dependente) por meio do programa estatístico Statistica versão 6.0 (StatSoft, Inc.), onde se verificou a acurácia e a precisão dos avaliadores. A acurácia das estimativas de cada avaliador foi determinada pela aplicação do teste t ao intercepto (a) para verificar se foi significativamente diferente de 0 (zero) à probabilidade p=0,05. O teste t, também foi aplicado ao coeficiente angular (b) para avaliar se foi significativamente diferente de 1,0 à probabilidade p=0,05. A precisão das estimativas foi avaliada pelo coeficiente de determinação (r^2) da mesma regressão linear e pela variação dos erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) (NUTTER JR; SCHULTZ 1995). A reprodutibilidade das avaliações foi verificada por regressão linear, considerando as estimativas do melhor avaliador como variável independente (x) e as estimativas dos demais avaliadores como variável dependente (y).

2.2.3 Resultados e Discussão

2.2.3.1 Elaboração da escala diagramática para quantificação da severidade da Mancha Marrom de Alternaria em frutos de citros

A escala diagramática elaborada para a doença Mancha Marrom de Alternaria de citros foi representada com dois tipos de lesões: pequenas circulares ou irregulares, típicas de tangor 'Murcott', e grandes e circulares, típicas de tangerina 'Ponkan'. Na representação das lesões pequenas circulares ou irregulares, a escala contém 6 níveis de severidade da doença (0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 11,0 e 25,0%) e para as lesões grandes e circulares a escala possui 5 níveis de severidade (1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 17,0%) (Figura 1). Considerando que outros tangores, tangerinas e tangelos possuam sintomas semelhantes aos representados na escala, esta pode ser utilizada para a avaliação da severidade da doença dos mesmos. Amorim (1995) relata que em muitas mensurações em campo a severidade máxima observada foi em torno de 50%, entretanto o valor máximo encontrado em campo, nesse trabalho, foi ao redor de 25%.

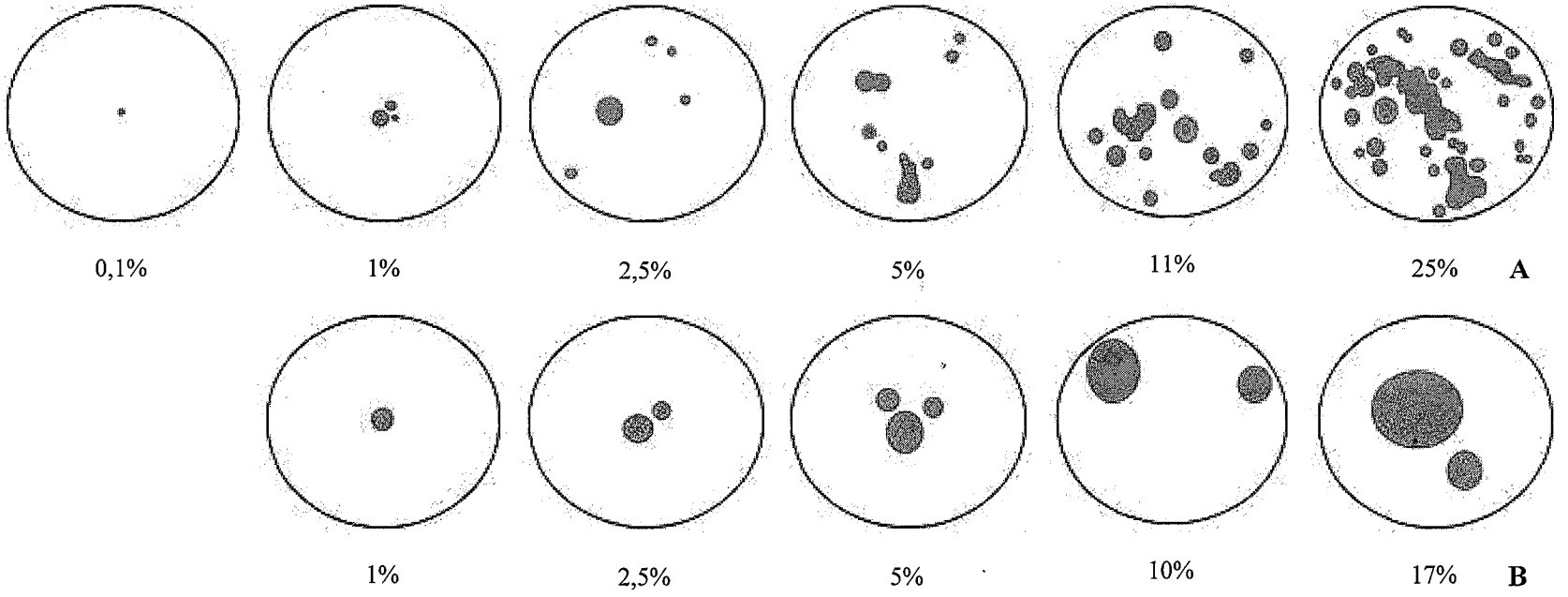

Figura 1 - Escala diagramática para avaliação da Mancha Marrom de Alternaria dos citros (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em frutos de tangor 'Murcott', com seis níveis de severidade da doença para pequenas lesões circulares ou áreas irregulares (A) e cinco níveis para lesões grandes e circulares (B)

2.2.3.2 Validação da escala diagramática

Na primeira etapa da validação, sem o auxílio da escala diagramática, os avaliadores apresentaram precisão, com coeficientes de determinação da reta de regressão (r^2) variando de 0,74 a 0,85, mostrando que há variação de subjetividade na estimativa entre avaliadores (Tabela 1, Figura 2). O coeficiente angular da reta de regressão do avaliador A não diferiu de 1,0 ($p<0,05$), enquanto os avaliadores B, C e D subestimaram a doença, o que pode ser observado pelos valores de *b*, significativamente menores que 1,0 ($p<0,05$) (Tabela 1). Assim, quanto mais distante da unidade, maior a inacurácia do avaliador. Os coeficientes angulares registrados revelam que para cada 1% de aumento na severidade real, o erro na severidade estimada, avaliado pela diferença do valor ideal (1,00) e o valor observado pela regressão conjunta dos avaliadores, foi 0,23 quando a escala não foi utilizada, indicando a presença de erros sistemáticos. Com o uso da escala, os coeficientes angulares revelaram que para cada 1% de aumento na severidade real, o erro na severidade estimada foi 0,16 (Tabela 1). Desta maneira, pode-se observar que com o uso da escala todos os avaliadores ficaram mais acurados, diminuindo a tendência de subestimar a severidade da doença, uma vez que os valores dos coeficientes angulares obtidos ficaram mais próximos de 1,0 (Tabela 1, Figura 3).

A proximidade do valor do coeficiente angular com a unidade (1,00) quando se adota a escala diagramática como ferramenta na avaliação da severidade da Mancha Marrom de Alternaria, torna-se muito importante, pois, quando se estima valores altos de severidades os erros são menores, por exemplo: para o coeficiente angular de 0,77 (valor de *b* sem o uso da escala) e o valor real de severidade igual a 25% (valor máximo da escala para pequenas lesões circulares ou áreas irregulares) o erro é de 5,75% (25 x 0,77 = 19,25; 25 - 19,5 = 5,75), enquanto que quando se tem o coeficiente angular de 0,84 (valor de *b* com a utilização da escala), se tem um erro de 4% (25 x 0,84 = 21; 25 - 21 = 4). O valor do coeficiente angular (*b*) obtido pela regressão conjunta dos dados de todos os avaliadores sem a utilização da escala diagramática foi menor que com o uso da escala, confirmando que com a utilização da escala, as estimativas de severidade da doença, pelos avaliadores, foram mais acuradas (Tabela 1, Figura 4).

Apesar do valor do intercepto ter ficado mais distante de zero, o parâmetro da equação mais importante na determinação da acurácia de um avaliador é o coeficiente angular, pois quanto mais distante de 1,00, a severidade estimada pelo avaliador torna-se mais distante da real. Nesse

caso, o valor do intercepto (*a*) obtido pela regressão conjunta dos dados de todos os avaliadores sem a utilização da escala diagramática foi 1,42, enquanto que com o uso da escala foi 1,59 (Tabela 1, Figura 4).

Três avaliadores melhoraram a precisão na estimativa da severidade da Mancha Marrom de Alternaria com o auxílio da escala diagramática, haja vista que maiores valores do coeficiente de determinação (r^2) foram obtidos com o uso da escala (Tabela 1, Figura 3). Estimativas da severidade efetuadas sem o auxílio da escala diagramática, quando os dados de todos os avaliadores foram agrupados explicaram 69% da variação na mensuração da doença, enquanto que com o uso da escala a variação foi de 84% (Tabela 1, Figura 4).

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram os encontrados por Amorim et al. (1993), Godoy et al. (1997) e Nutter Jr e Schultz (1995), que observaram variabilidade entre avaliadores, mesmo com o uso de escalas, pois, a acurácia e a precisão das avaliações são altamente influenciadas pela habilidade que cada indivíduo possui em estimar severidade de doença. Weber e Jorg (1991) relatam que o coeficiente de determinação (r^2) para equações de regressão que relacionam estimativas visuais (y) com níveis reais (x) variaram 70 a 95% entre avaliadores. Os coeficientes de determinação obtidos neste trabalho assemelham-se aos encontrados por Godoy et al. (1997) e por Leite e Amorim (2002), que obtiveram coeficientes de determinação superiores a 0,80.

A correção de desvios sistemáticos é importante em patossistemas nos quais decisões de manejo são baseadas em limiares da doença. Isto ocorre porque, à medida em que há um erro na estimativa da severidade da doença, há um erro da mesma magnitude na decisão de aplicar ou não uma medida de controle (NUTTER JR et al., 1993).

Tabela 1 - Intercepto (*a*), coeficiente angular (*b*) e coeficiente de determinação (r^2) das regressões lineares entre severidades real e estimada por cada avaliador separadamente e por todos juntos sem e com o uso da escala diagramática

Avaliador	**Sem escala**			**Com escala**		
	Parâmetros		r^2	**Parâmetros**		r^2
	a	***b***		***a***	***b***	
A	0,47	0,99	0,82	0,58	1,00	0,86
B	1,55*	0,61*	0,85	2,56*	0,80*	0,82
C	0,74*	0,63*	0,78	1,56*	0,84*	0,86
D	2,81*	0,85*	0,74	1,67*	0,90*	0,82
Todos	**1,42**	**0,77**	**0,69**	**1,59**	**0,84**	**0,84**

*indica valores de *a* significativamente diferentes de zero e de *b* significativamente diferentes de 1,0 a 5% de probabilidade pelo teste *t*.

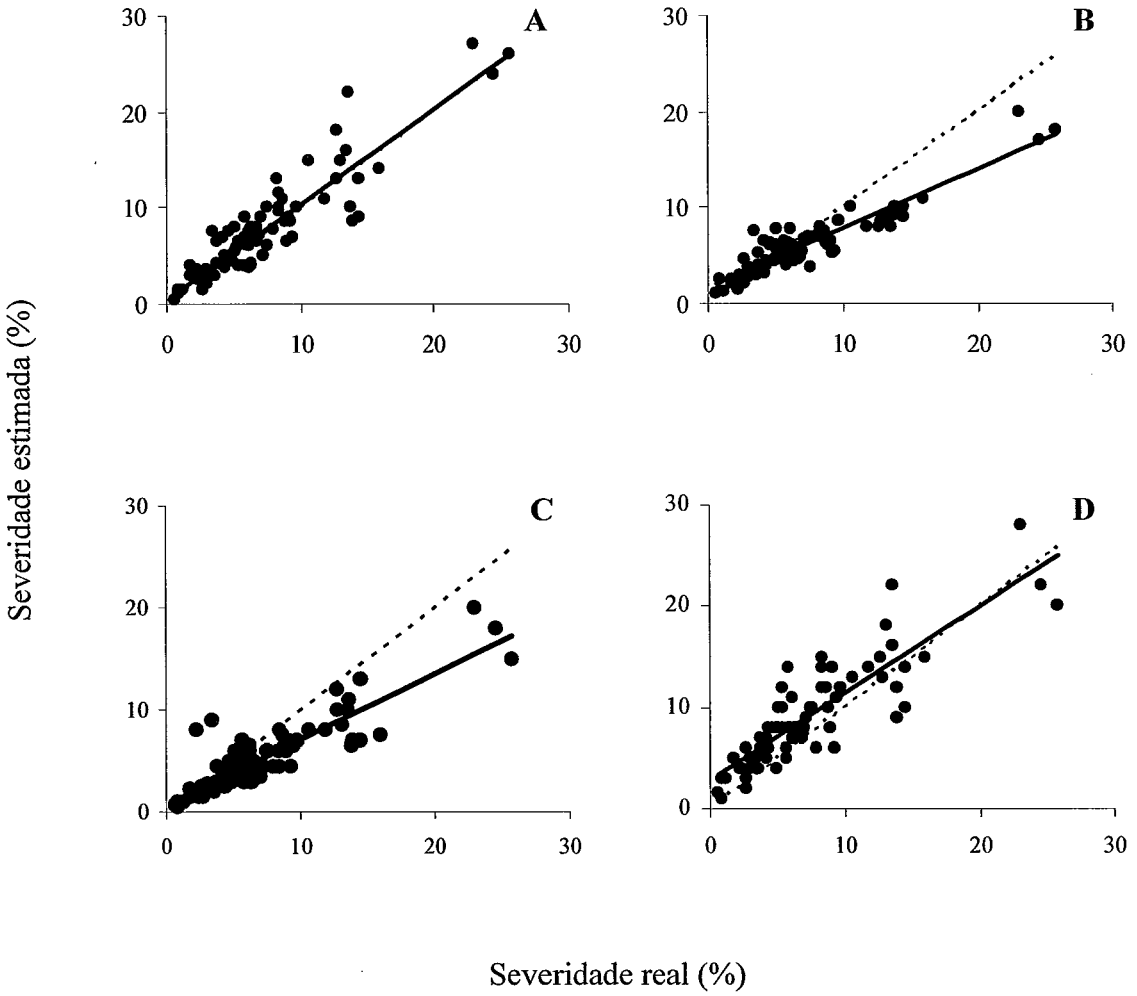

Figura 2 - Regressões lineares entre severidades real e estimada da Mancha Marrom de Alternaria por quatro avaliadores (A a D) sem a utilização da escala diagramática. A linha tracejada representa a estimativa ideal da severidade e a linha contínua a reta de regressão de cada avaliador

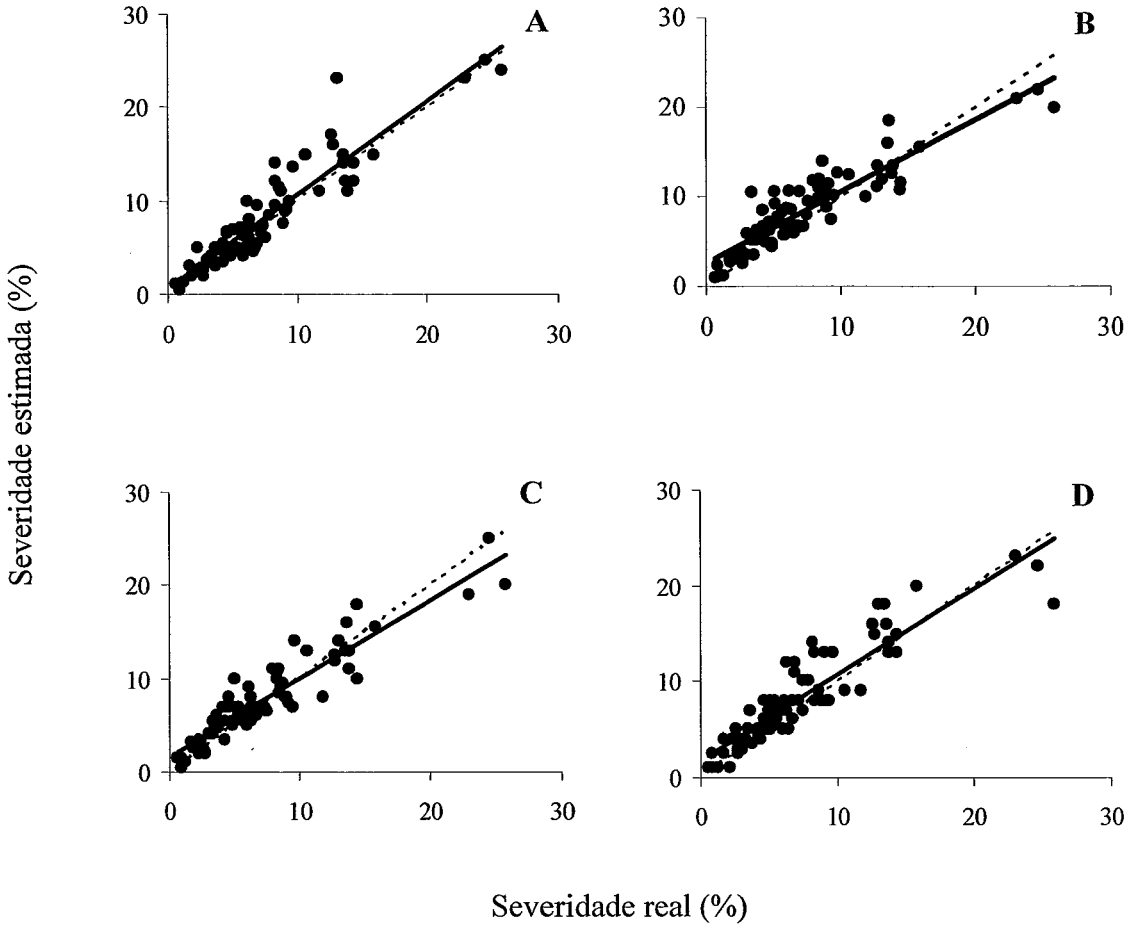

Figura 3 - Regressões lineares entre severidades real e estimada da Mancha Marrom de Alternaria por quatro avaliadores (A a D) com a utilização da escala diagramática. A linha tracejada representa a estimativa ideal da severidade e a linha contínua a reta de regressão de cada avaliador

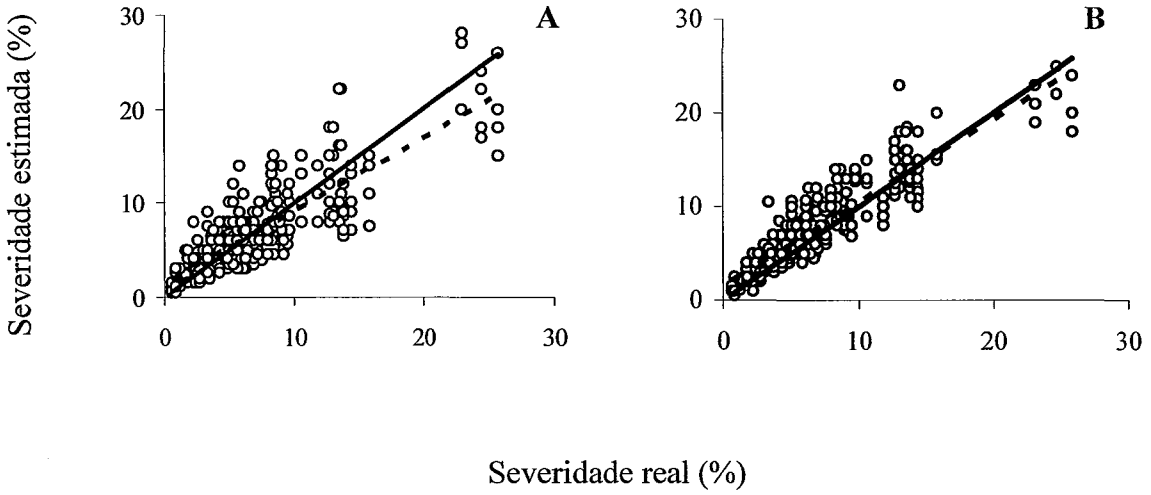

Figura 4 - Regressões lineares entre severidades real e estimada da Mancha Marrom de Alternaria por todos os avaliadores juntos sem (A) e com (B) a utilização da escala diagramática. A linha tracejada representa a estimativa ideal da severidade e a linha contínua a reta de regressão de todos os avaliadores juntos

Os erros absolutos (resíduos) encontrados pela diferença entre severidade real e severidade estimada pelos avaliadores diminuíram com o auxílio da escala diagramática, significando que a escala ajudou na avaliação da severidade da doença, pois sem o uso da escala diagramática, os valores variaram entre -8,46 a 10,84, com média em valores absolutos de 2,07 (Figura 5), enquanto que com o auxílio da escala os erros absolutos variaram entre -9,91 a 7,84, com média em valores absolutos de 1,57 (Figura 6). Na maioria dos casos, os desvios foram maiores quando a severidade da doença variou entre 5 e 15% (Figura 5 e 6), possivelmente em razão da grande dificuldade dos avaliadores em estimar a severidade da doença quando várias lesões pequenas e irregulares são formadas. Este resultado é semelhante ao encontrado por Parker; Shaw; Royle (1995), no qual foi observada falta de acurácia na avaliação da severidade da mancha salpicada da folha causada por *Septoria tritici* em trigo, devido à dificuldade em quantificar a severidade em folhas senescentes. Godoy et al. (1997), propuseram várias escalas diagramáticas para doenças de feijoeiro e verificaram que a menor acurácia dos avaliadores ocorreu nas avaliações da ferrugem, devido à presença de um alto número de pequenas pústulas.

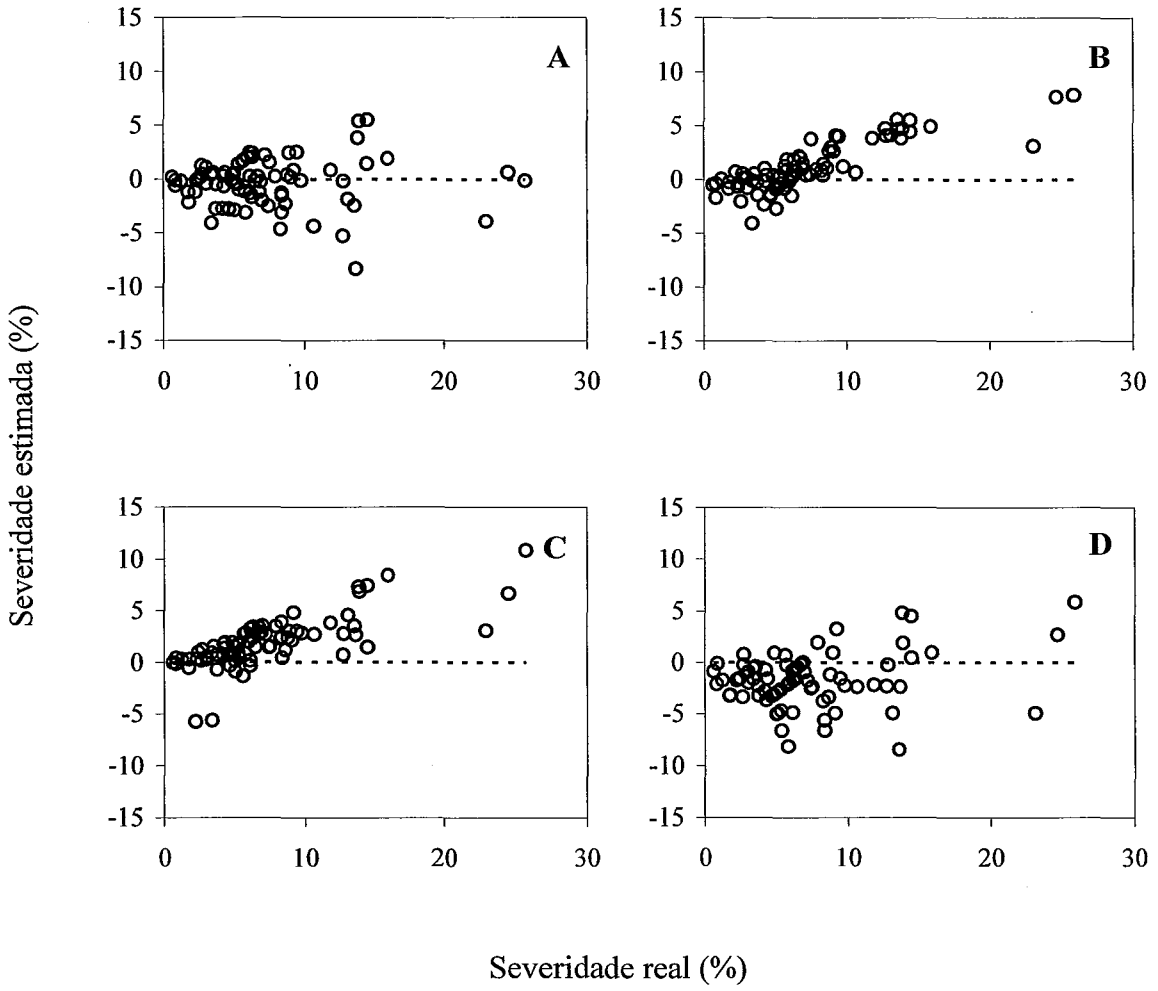

Figura 5 - Erros absolutos (diferenças entre severidades real e estimada) dos quatro avaliadores (A a D) nas estimativas da severidade da Mancha Marrom de Alternaria realizadas sem o auxílio da escala diagramática

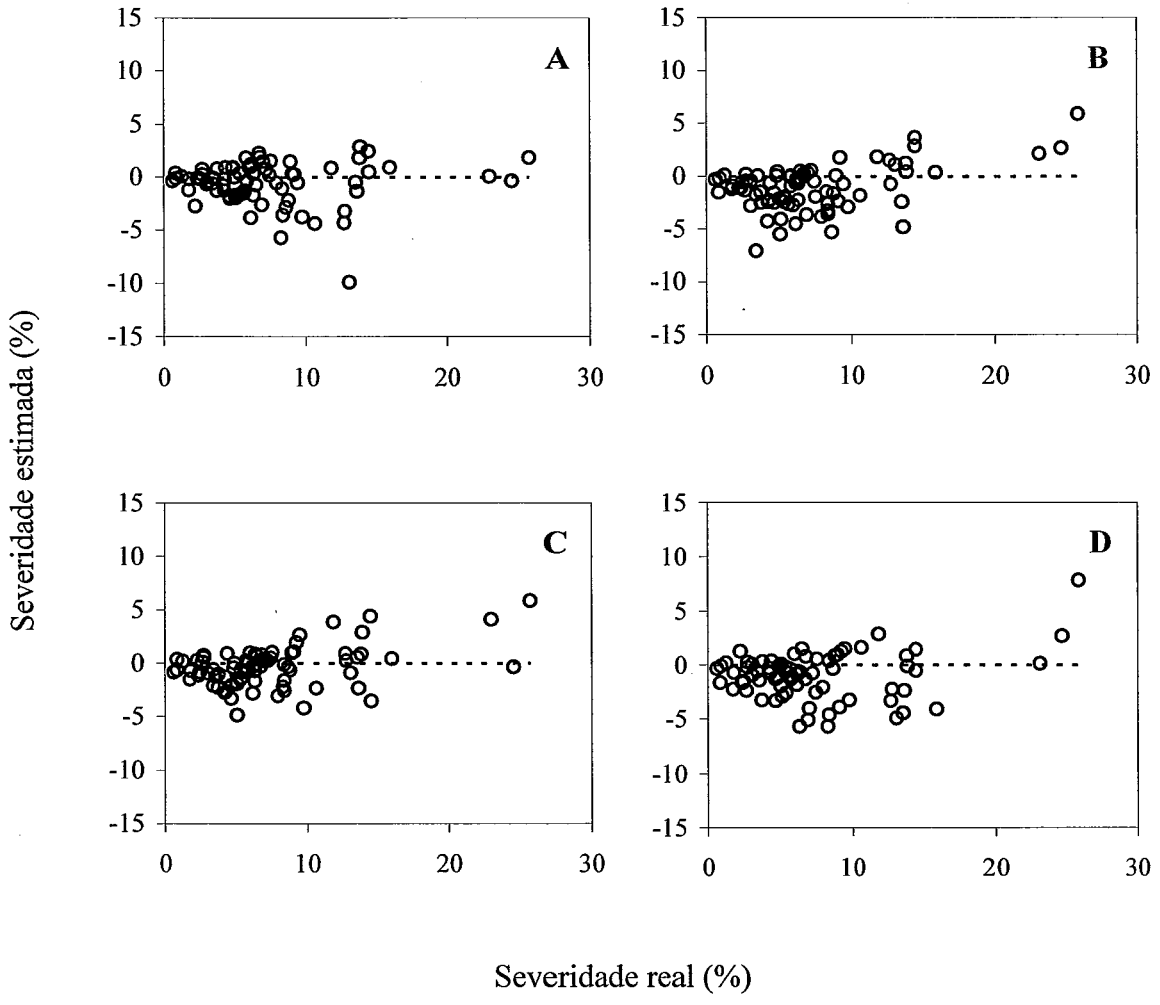

Figura 6 - Erros absolutos (diferenças entre severidades real e estimada) dos quatro avaliadores (A a D) nas estimativas da severidade da Mancha Marrom de Alternaria realizadas com o auxílio da escala diagramática

Os coeficientes de determinação (r^2) das regressões lineares estimadas entre a severidade do melhor avaliador e a dos demais avaliadores foram satisfatórios (r^2>0,8) (Tabela 2). Em relação aos valores dos interceptos e dos coeficientes angulares, ocorreu resultado semelhante daquele obtido quando os avaliadores, com a utilização da escala diagramática, estimaram a severidade da doença, e estas foram comparadas com a severidade real.

Tabela 2 - Intercepto (*a*), coeficiente angular (*b*) e coeficiente de determinação (r^2) das regressões lineares entre severidades real e estimada do melhor avaliador (A) com as estimativas dos demais avaliadores (B, C e D)

Avaliador	Parâmetros		R^2
	a	*b*	
B	2,55*	0,74*	0,81
C	1,51*	0,78*	0,87
D	1,60*	0,84*	0,83

*indica valores de *a* significativamente diferentes de zero e de *b* significativamente diferentes de 1,0 a 5% de probabilidade pelo teste *t*.

2.3 Conclusões

A utilização da escala diagramática para avaliação da severidade da Mancha Marrom de Alternaria dos citros possibilita estimativas de severidade da doença mais precisas e mais acuradas, minimizando a subjetividade das estimativas dos avaliadores.

A escala diagramática desenvolvida neste trabalho é recomendada como uma ferramenta de auxílio na estimativa da severidade da Mancha Marrom de Alternaria em frutos de tangerinas e seus híbridos, principalmente tangor 'Murcott' e tangerina 'Ponkan', contribuindo no controle adequado da doença.

Referências

AGUILAR-VILDOSO, C.I. Mancha de Alternaria das tangerinas. **Informativo Centro de Citricultura**, Cordeirópolis, n.93, p.1, 3, fev. 2003.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p.647-671.

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. PALAZZO, D.A.; BASSANEZI, R.B.; GODOY, C.V.; TORRES, G.A.M. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.2, p. 174-180, 1993.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais:** epidemiologia e controle econômico. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.

BERGER, R.D. Measuring disease intensity. In: TENG, P.S.; KRUPA, S.V. (Ed.). **Crop loss assessment.** Saint Paul: APS Press, 1980. p.28-31.

CANIHOS, Y.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infeccion of Minneola tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, n.5, p.429-433, 1999.

FEICHTENBERGER, E. Manejo integrado das principais doenças fúngicas dos citros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.76, 2003. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia.

FUNDECITRUS. Alternativa de controle. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, ano 21, n.129, p.12-13, jul./ago. 2005.

GAUNT, R.E. The relationship between plant disease severity and yield. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p. 119-144, 1995.

GODOY, C.V.; CARNEIRO, S.M.T.P.G.; IAMAUTI, M.T.; PRIA, M.D.; AMORIM, L.; BERGER, R.D.; BERGAMIN FILHO, A. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.104, n.4, p.336-345, 1997.

GOES, A.; MONTES DE OCA, A.G.; REIS, R.F. Ocurrencia de la mancha de Alternaria en mandarina 'Dancy' en el Estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 386, 2001. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34., 2001, Brasília.

HORSFALL, J.G.; BARRAT, R.W. An improved grading system for measuring plant disease. **Phytopathology**, St. Paul, v.35, p. 655, 1945.

HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. Patometry: the measurement of plant disease. In: HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. (Ed.). **Plant disease an advanced treatise**: how disease develops in population. New York, Academic Press, 1978. v.2, p. 119-136, 1978.

LEITE, R.M.V.B.C.; AMORIM, L. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de Alternaria em girassol. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.28, n.1, p.14-19, 2002.

NILSSON, H.E. Remote sensing and image analysis in plant pathology. **Canadian Journal of Plant Pathology,** Ottawa, v.17, p. 154-166, 1995.

NUTTER JUNIOR, F.W.; GLEADSON, M.L.; JENCO, J.H.; CHRISTIANS, N.C. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.8, p.806-812, 1993.

NUTTER JUNIOR, F.W.; SCHULTZ, P.M. Improving the accuracy and precision of disease assessment: selection methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.17, p.174-184, 1995.

NUTTER JUNIOR, F.W.; WORAWITLIKIT, O. Disease:Pro: a computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n.10, p.1135, 1989.

PARKER, S.R.; SHAW, M.W.; ROYLE, D.J. The reliability estimates of disease severity on cereal leaves. **Plant Pathology**, Oxford, v.44, p.856-864, 1995.

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

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

SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L.; RENAUD, M.S.A. 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, p.231, 2003. Resumo. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia.

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., Sun City, 1996. **Proceedings International Society of Citriculture**, Riverside: International Society of Citriculture, 1999. v.1, p.379-384.

TIMMER, L.W. **Preharvest diseases of citrus in Florida**. Lake Alfred: University of Florida, Citrus Research and Education Center, [19__?] 144 p.

TIMMER, L.W. The ALTER-RATER, a new weather-based model for timing fungicide sprays for Alternaria control. **Citrus Industry**, Tampa, v.81, n.3, p.23-24, 2000.

TIMMER, L.W., BHATIA, A. Evaluation of the Alter-Rater model for timing fungicide applications for control of Alternaria Brown Spot of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, S88-89, 2001.

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

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

TIMMER, L.W.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T.R.; IBAÑEZ 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.

TOMERLIN, J.R.; HOWELL, T.A. Distrain: a computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, n.5, p.455-459, 1988.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. Quantificação de doenças. **Quant v.1.0.1**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa: 2001.

WEBER, G.E.; JORG, E. Errors in disease assessment - A survey. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.10, p.1238, 1991.

WHITESIDE, J.O. Alternaria brown spot of mandarins. In: WHITESIDE, J.O.; GARNEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 1993. p. 8.

3 EFEITOS DA TEMPERATURA E DO PERÍODO DE MOLHAMENTO NA INFECÇÃO DE *Alternaria alternata* f. sp. *citri* EM FRUTOS DE TANGOR 'MURCOTT'

Resumo

Os efeitos da temperatura e do período de molhamento na infecção de quatro isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* foram quantificados em ambiente controlado, sob condições *in vitro* e *in vivo*. No experimento *in vitro*, a porcentagem de germinação de cada isolado foi avaliada após a incubação das suspensões de conídios em câmaras de crescimento ajustadas para 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C com 8, 12, 24 e 48 horas de molhamento, sob alternância de luz (12 horas claro/12 horas escuro). Foram realizadas doze repetições para as temperaturas 15, 30 e 35 °C e oito para 10, 20 e 25 °C. Cada repetição constituiu-se de uma gota de suspensão em placa de poliestireno. O efeito da temperatura na germinação dos conídios foi descrito pela função beta generalizada e o do molhamento pelo modelo monomolecular. A germinação dos isolados do fungo ocorreu em todas as combinações de temperatura e molhamento, porém a maior porcentagem de germinação deu-se com 24 horas de molhamento para os quatro isolados testados, com exceção das temperaturas de 10 e 15 °C para o isolado 1, que obteve uma maior porcentagem de germinação com 12 horas de molhamento. O intervalo de temperatura mínima para a germinação dos isolados, estimado pela superfície de resposta, obtido pela multiplicação das funções beta generalizada e monomolecular foi 7,1 a 9,9 °C e o intervalo de temperatura máxima foi 36,8 a 52,5 °C. O coeficiente de determinação (r^2) da superfície de resposta para o isolado 1 foi de 0,64, para o isolado 2 foi de 0,73, para o isolado 3 foi de 0,78 e para o isolado 4 foi de 0,66, mostrando que há variabilidade entre os isolados. Quando os conídios dos isolados foram submetidos à temperatura de 25 °C com períodos de molhamento descontínuos, a germinação dos isolados foi menor do que o período de molhamento contínuo de 24 horas. Entretanto, a porcentagem de germinação dos isolados no período descontínuo em relação ao período contínuo não foi muito reduzida. No experimento com frutos maduros de tangor 'Murcott' inoculados com dois isolados do fungo e acondicionados em câmaras de crescimento com temperaturas ajustadas para 20, 25 e 30 °C, fotoperíodo (12 horas claro/12 horas escuro) e períodos de molhamento de 8, 24 e 48 horas. O molhamento de 24 horas propiciou a maior incidência da doença, nas três temperaturas testadas, resultando incidências acima de 70% para um isolado e acima de 90% para o outro, confirmando a variabilidade dos isolados. Para verificar como o patógeno penetra no hospedeiro, um ensaio utilizando microscopia eletrônica de varredura foi desenvolvido. Pôde-se verificar que o fungo predominantemente penetra no hospedeiro através da formação de apressórios e não via aberturas naturais como estômatos.

Palavras-chave: Mancha marrom de Alternaria; germinação; microscopia eletrônica de varredura

Abstract

Effects of temperature and wetness period on infection of *Alternaria alternata* pv. *citri* in 'Murcott' tangor fruits

The effects of temperature and wetness period in the infection of four *Alternaria alternata* pv. *citri* isolates were quantified in controlled environment under *in vitro* and *in vivo* conditions. In the *in vitro* experiment, the percentage germination of each isolate was determined following incubation of conidia suspension in growth chambers adjusted to temperatures 10 - 15 - 20 - 25 - 30 - 35°C and wetness period of 8 - 12 - 24 - 48 h under 12 hours light/12 hours dark. A total of 12 replicates were made for temperatures 15, 30 and 35°C and 8 replicates for 10, 20 and 25 °C, each sample consisted of a drop of suspension on a polystyrene plate. The effect of temperature on conidia germination was described by the generalized beta function and the effect of wetness by the monomolecular model. There was germination in all combinations of temperature and wetness levels, for all isolates, but the greatest germination rates were found in the wetness period of 24 h for all tested isolates except for temperatures of 10 and 15°C for isolate 1, where a greater germination percentage occurred with 12 h of wetness period. The minimum germination temperature for the isolates, estimated by mathematical models fitted to the data, was from 7.1 to 9.9 °C, while the maximum temperature ranged from 36.8 a 52.5 °C. The coefficient of determination (r^2) of response surface was of 0.64 for isolate 1, 0.73 for isolate 2, 0.78 for isolate 3 and 0.66 for isolate 4, showing variability between isolates. When the conidia from the isolates were submitted to a temperature of 25°C with discontinued wetting periods, isolate germination was lesser then with a continuous 24 h wetting. Nevertheless, the germination rate of the isolates on discontinued wetting periods was not greatly reduced. 'Murcott' tangor fruits were inoculated with two fungus isolates and conditioned in growth chambers with temperatures adjusted to 20, 25 and 30 °C, photoperiod 12 hours light/12 hours dark and wetness periods of 8, 24 and 48 h. The 24 h wetness resulted in the greatest disease incidence on the tree tested temperatures, resulting above 70% of incidence to one isolate and above 90% to another, uphold the variability of isolates. To verify how the fungus enters to the host, scanning electron microscopy was done. It was observed that the fungus enters to the host by forming apressorium and not through natural openings such as stomata.

Keywords: Alternaria brown spot, germination, scanning electron microscopy

3.1 Introdução

As tangerinas, assim como seus híbridos, são espécies cítricas cujo plantio vem aumentando ano após ano no Brasil e, somente no Estado de São Paulo, o total de plantas destas espécies passou de 7,0 para 9,6 milhões, entre os anos de 1995 e 2000 (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2003). Atualmente, o Estado é responsável por aproximadamente 57% da produção nacional de tangerina e seus híbridos (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005).

O custo da produção de tangerinas convencionais para pomares com produção crescente (4° ao 8° ano) é R$ 6.338,00 por hectare e para pomares com produção estável (9° ao 18° ano) é R$ 7.901,00 por hectare. Os tratos fitossanitários correspondem ao maior custo na produção, principalmente no que refere-se à aplicação de fungicidas, pois, gastam-se R$ 940,40 por hectare para pomares em crescimento e R$ 1.289,69 por hectare para pomares estáveis (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005). Assim, estudos como esse, que visam melhor compreensão de patosistemas para auxiliar no controle da doença, são cada vez mais necessários.

A Mancha Marrom de Alternaria dos citros, doença causada pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, foi identificada pela primeira vez no Brasil no Estado do Rio de Janeiro (GOES; MONTES DE OCA; REIS, 2001), afetando tangerinas 'Dancy'. Entretanto, na safra de 2003, a doença já havia se disseminado para vários estados brasileiros como Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul, afetando, além de várias espécies de tangerinas, alguns tangores e clementina (SPÓSITO et al., 2003).

O agente causal da doença é um fungo saprófita, que sobrevive nos tecidos de plantas cítricas hospedeiras, sendo seus conídios disseminados a longas distâncias pelo vento. A elevada dependência das condições ambientais e a rapidez com que os sintomas aparecem proporcionam rápidas infecções deste patógeno, caso ocorra vários dias de condições ambientais favoráveis (CIVERA, 2004). Portanto, em anos em que ocorrem períodos prolongados de condições ambientais favoráveis ao patógeno, a doença pode aparecer de forma explosiva, caso contrário, a doença não surge de maneira repentina em uma parcela (CIVERA, 2004).

O conhecimento preciso das condições ambientais que favorecem a expansão e desenvolvimento da doença é fundamental no controle de doenças de plantas. Atualmente, o controle da Mancha Marrom de Alternaria depende da adoção de métodos culturais, como a eliminação e destruição de materiais doentes, evitar fertilização e irrigação excessivas e a aplicação de fungicidas com auxílio de calendário fixo (CIVERA, 2004). Assim, é necessário um método de controle da doença, que visa a aplicação de fungicida somente quando houver condições ambientais favoráveis para que ocorra a infecção, como o desenvolvido nos Estados Unidos. Para que esse método seja aplicado no Brasil, é necessário, inicialmente, verificar se os requerimentos climáticos, principalmente aqueles relacionados aos efeitos da temperatura e do período de molhamento para a infecção, são os mesmos dos isolados dos Estados Unidos. Isto é particularmente importante para esta doença, que possui seu desenvolvimento altamente

condicionado pelas variações climáticas, pois tanto a disponibilidade de inóculo, como a presença de material vegetal suscetível, parecem manter-se constantes ao longo de todo o ciclo de cultivo (CIVERA, 2004).

Os objetivos deste trabalho foram: (i) determinar o efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de quatro isolados do fungo *in vitro*; (ii) determinar o efeito da temperatura e do período de molhamento na incidência da doença, em frutos de tangor 'Murcott' inoculados artificialmente com dois isolados do patógeno.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão Bibliográfica

3.2.1.1 Etiologia da Mancha Marrom de Alternaria

O gênero *Alternaria* compreende espécies parasitas ou saprófitas no tecido da planta (BARNETT; HUNTER, 1986). Os conídios de *Alternaria alternata* possuem forma de clava ou pêra invertidos, ovóides ou elipsóides, formados em longas cadeias, freqüentemente com extremidades curtas, cilíndricas ou cônicas e são melanizados (PATOLOGIA DE SEMENTES, 2004). Os conídios acham-se inseridos em conidióforos simples ou ramificados, retos ou sinuosos, com coloração clara ou oliva, medindo 50 µm de comprimento e 3 a 6 µm de largura (ELLIS, 1971). O comprimento da extremidade apical do conídio de *A. alternata* pode ser superior a 25 µm, mas nunca chega a igualar o comprimento total do conídio, representando geralmente 33 a 25% do conídio (SIMMONS, 1967). Os conídios possuem até 8 septos transversais e vários longitudinais, e dimensões médias de 37 µm de comprimento por 13 µm de largura na base (PATOLOGIA DE SEMENTES, 2004). Os conídios de *Alternaria alterna* f. sp. *citri* são grandes, pigmentados, multi-celulares, produzidos na superfície do tecido doente (TIMMER, [19__?]), e em cadeia.

Alternaria alternata f. sp. *citri* possui dois patótipos (KOHMOTO; SCHEFFER; WHITESIDE, 1979): o "patótipo limão rugoso", que produz a toxina-ACRL, específica para limão rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) e limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), e o "patótipo tangerina", que produz a toxina-ACT, específica para tangerinas e seus híbridos (PEEVER et al., 2002; ROTEM, 1994; SOLEL, 1991; WHITESIDE, 1993). Em geral, isolados de tangerinas não

são patógenos para limão rugoso e vice-versa (TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000). Entretanto, Masunaka et al. (2005), isolaram um patótipo de limão rugoso que produz as duas toxinas, infectando portanto tangerinas e seus híbridos. Durante a infecção pelo patógeno, a toxina é liberada na germinação do esporo. Num período de incubação de 12 horas, a germinação do esporo de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* libera aproximadamente 0,035 pg da principal fração (Ib) da toxina AC. A toxina causa desordens na membrana plasmática, as quais são o evento central na patogênese precoce, permitindo o acesso do fungo às células do hospedeiro (ROTEM, 1994; TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000), resultando numa reação necrótica que aparece em menos de dois dias (WHITESIDE, 1993).

3.2.1.2 Epidemiologia da Mancha Marrom de Alternaria

Os conídios do de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* são produzidos em lesões nos ramos e nas folhas maduras, tanto nas folhas remanescentes nas árvores, como nas folhas sobre o solo do pomar (TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000). Embora nem sempre ocorra esporulação em frutos (TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000), esta já foi descrita por Whiteside (1993) e observada em condições de laboratório. Entretanto Timmer; Solel e Orozco-Santos (2000) e Whiteside (1993), são unânimes em reconhecer a importância das brotações, onde há esporulação abundante, como a principal fonte de inóculo. A liberação dos esporos é incitada pela precipitação, irrigação ou pela brusca queda de umidade relativa do ar (TIMMER et al., 1998; CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999; FEICHTENBERGER, 2003), enquanto a disseminação é realizada pelo vento (FEICHTENBERGER, 2003). Entretanto, a vibração e a irradiação vermelha/infravermelha não influenciam a liberação dos esporos (CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999). A precipitação é provavelmente mais importante para a liberação dos esporos em áreas úmidas, como a Flórida e São Paulo. Entretanto, em áreas do Mediterrâneo, com baixa precipitação durante o período de suscetibilidade da planta, a liberação dos esporos pode ser provocada pela brusca queda na umidade relativa do ar (TIMMER et al., 2003).

A doença é mais severa quando ocorre temperatura favorável à infecção e brotos vigorosos nas árvores, estimulados por práticas inadequadas de manejo do pomar, tais quais, excesso de nitrogênio e irrigação (WHITESIDE, 1993). A faixa de temperatura ótima para que ocorra a expansão da lesão da Mancha Marrom de Alternaria variou entre 20 e 25 °C, em estudo realizado

em Israel por Solel e Kimchi (1998).

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Obtenção e preparo do inóculo

Os experimentos foram realizados no laboratório de Epidemiologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, em Piracicaba.

Todos os isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* testados fazem parte da coleção do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio/Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (APTA/SAA) e foram gentilmente cedidos pelo pesquisador Dr. Eduardo Feichtenberger da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, da APTA/SAA. Os isolados 1 (21/03) e 2 (22/03) foram isolados diretamente de frutos de tangor 'Murcott' e de tangerina 'Ponkan', respectivamente, ambos do município de Botucatu – SP. O isolado 3 (24/03) foi isolado diretamente de ramos de tangor 'Murcott' provenientes do município de São Miguel Arcanjo - SP e o isolado 4 (43/03) foi isolado de tangerina 'De Wildt' do município de Capão Bonito - SP. Os isolados foram conservados em óleo, seguindo a metodologia proposta por Mariano e Sayonara (2000). O fungo foi cultivado no meio batata-dextrose-ágar (BDA), sob luz constante e temperatura ambiente de ± 25 °C. Após a obtenção de colônias dos isolados em placas de Petri contendo meio BDA, foi acrescentado 20 mL de água destilada e esterilizada, as colônias foram raspadas, o excesso de água foi descartado e as placas foram mantidas sob luz fria por dois dias, a fim de promover a esporulação do fungo. A suspensão de conídios para os ensaios foi obtida a partir da placa de Petri contendo colônias esporuladas do fungo, com adição de água destilada e esterilizada. A suspensão de esporos foi ajustada para 10^4 conídios/mL.

3.2.2.2 Efeitos da temperatura e do período de molhamento na germinação de isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri in vitro*

Na execução deste ensaio, para cada isolado, alíquotas de 40 µL da suspensão de conídios foram pipetadas e depositadas em placas de poliestireno, as quais foram colocadas dentro de um gerbox contendo papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada. Os gerbox foram incubados em câmaras de crescimento (Ação Científica/AC 71) com temperaturas ajustadas para 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C e para períodos de molhamento constituídos de câmara úmida por 8, 12, 24 e 48 h, sob alternância de luz (12 horas claro/12 horas escuro). Para a interrupção do processo de germinação, foram adicionados 20 µL de lactoglicerol à suspensão de conídios, ao final de cada período de molhamento. A contagem da porcentagem de germinação foi realizada no microscópio óptico com contraste de fase em aumento de 100 vezes.

Para cada isolado, o delineamento estatístico utilizado foi fatorial com 2 fatores (temperatura e período de molhamento), 24 tratamentos (6 níveis de temperatura e 4 níveis de molhamento), doze repetições para as temperaturas 15, 30 e 35 °C e oito para 10, 20 e 25 °C. Cada repetição, constituiu-se por uma gota da suspensão na placa de poliestireno.

Adicionalmente foram realizados dois ensaios na temperatura de 25 °C com três tratamentos, no qual o período de molhamento de um dos tratamentos foi descontínuo. No primeiro ensaio os tratamentos foram: 6 horas de molhamento contínuo, 6 horas de molhamento - 12 horas sem molhamento - 6 horas com molhamento e 24 horas de molhamento contínuo. No segundo ensaio, os tratamentos foram: 4 horas de molhamento contínuo, 4 horas de molhamento - 12 horas sem molhamento - 8 horas com molhamento e 24 horas de molhamento contínuo.

Ao completar o primeiro período de molhamento (6 horas para o ensaio 1 e 4 horas para o ensaio 2), as placas contendo as suspensões foram levadas à câmara de fluxo laminar vertical, a fim de proporcionar a rápida secagem das gotas de suspensões, as quais despenderam ao redor de 30 minutos. Em seguida, as placas foram incubadas novamente na câmara com temperatura controlada. Findo o período sem molhamento, os conídios aderidos às placas receberam 40 µL água destilada e esterilizada para o restabelecimento da câmara úmida.

3.2.2.2.1 Análise dos dados

Os dados obtidos nos ensaios *in vitro* foram analisados por meio de regressões não-lineares, utilizando o programa Statistica versão 6.0 (StatSoft, Inc) no qual também foram elaborados os gráficos. O efeito da temperatura sobre a germinação dos isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* foi descrito pela função beta generalizada $y = b_1 * ((x - b_2) \wedge b_3) * ((b_4 - x) \wedge b_5)$ (HAU; KRANZ, 1990), onde y é a porcentagem relativa de germinação, x é a temperatura, b_2 e b_4 são as temperaturas mínima e máxima, respectivamente e b_1, b_3 e b_5 são parâmetros da equação. O efeito do período de molhamento na germinação de cada isolado foi descrito pelo modelo monomolecular $y = b_6 * (1 - b_7 * exp (- b_8 * m))$, descrita por Bergamim Filho (1995), onde y representa a quantidade relativa de geminação, m representa o período de molhamento e b_6,, b_7 e b_8 são parâmetros do modelo. As funções beta generalizada e monomolecular, obtidas nos ensaios com diferentes temperaturas e períodos de molhamento, respectivamente, foram multiplicadas para elaboração de superfícies de resposta que possibilitou verificar o efeito de diferentes combinações de temperatura e molhamento na germinação de conídios dos isolados de *A. alternata* f. sp. *citri*. Para os ensaios com períodos de molhamento descontínuos, a análise dos dados foi realizada por meio de análise de variância no programa Statistica versão 6.0 (StatSoft, Inc).

3.2.2.3 Efeitos da temperatura e do período de molhamento no desenvolvimento da Mancha Marrom de Alternaria

Frutos maduros de tangor 'Murcott' previamente desinfestados com álcool 70%, foram acondicionados em bandejas de plástico (10 frutos/bandeja), que continham algodão umedecido em água destilada. Cada fruto foi inoculado com duas gotas de suspensão de conídios de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* preparada da mesma forma descrita anteriormente, uma gota do isolado 3 e a outra gota do isolado 4, na concentração de 10^4 conídios/mL. Em seguida, cada bandeja foi coberta por um saco plástico transparente que foi amarrado, servindo como câmara úmida, levada à câmaras climatizadas (Conviron/CMP 3244) com temperaturas ajustadas para 20, 25 e 30 °C, submetida a 3 períodos de molhamento (8, 24 e 48 h) com fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro. Após o término de cada período de molhamento os sacos foram removidos

das bandejas e estas permaneceram nas câmaras.

Empregando-se esta metodologia, o experimento foi conduzido em esquema fatorial com dois fatores (temperatura e molhamento), 9 tratamentos (temperaturas de 20, 25 e 30°C e molhamento de 8, 24 e 48 h), com 10 repetições, sendo cada fruto uma repetição. As testemunhas constituíram-se de 5 repetições inoculadas com água destilada e esterilizada, para cada tratamento testado. A avaliação foi realizada diariamente pelo período de 7 dias para verificar a incidência da doença e a área das lesões.

3.2.2.3.1 Análise dos dados

O efeito da temperatura e do período de molhamento, sobre a incidência da doença e área das lesões, foram analisados por meio de regressões quadráticas.

3.2.2.4 Análise de imagens da formação de apressórios de conídios de quatro isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* ao microscópio eletrônico de varredura

Folhas destacadas de tangerina 'Ponkan' e de tangor 'Murcott' foram desinfestadas com álcool 70% e, em seguida, colocadas sob câmara úmida em placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro estéril umedecido com água destilada e esterilizada. Após o preparo das suspensões de conídios, conforme descrito anteriormente, alíquotas de 40 μL das suspensões dos isolados 1 e 3 foram pipetadas sobre a superfície inferior de folhas de tangor 'Murcott' e dos isolados 2 e 4 sobre a superfície inferior de folhas de tangerina 'Ponkan'. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento (Ação Científica/AC 71) com temperatura ajustada para 25 °C e com período de molhamento constituído de câmara úmida por 24 h, sob alternância de luz (12 horas claro/12 horas escuro). Ao completar o período de molhamento, as amostras constituídas de fragmentos de folhas, onde estava contida a suspensão fúngica, foram submetidas a um protocolo destinado à observação em microscópio eletrônico de varredura. O protocolo constou de sete etapas: a) fixação do material em Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, $CaCl_2$ 0,001 M); b) lavagem (três passagens das amostras em tampão cacodilato 0,05 M); c) pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%; d) desidratação em concenrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%); e) secagem ao ponto

crítico (CO_2); f) montagem em suporte; g) metalização com ouro (KITAJIMA; LEITE, 1999). As imagens foram elétron-micrografadas em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS Germany, modelo DSM940A).

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Efeitos da temperatura e do período de molhamento na germinação de isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri in vitro*

A germinação dos quatro isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* ocorreu em uma grande amplitude de temperatura, variando de 10 a 35 °C (Tabela 1 e Figuras 1 a 4). A maior porcentagem relativa de germinação ocorreu a 20 °C para os isolados 1 (84,1%) e 3 (70,4%) e a 30 °C para os isolados 2 (85,0%) e 4 (93,1%), com 24 h de molhamento. A amplitude, ou faixa de temperatura, favorável à germinação dos conídios, varia entre 20 e 30 °C, porém, à medida que se aumenta o período de molhamento, a faixa de temperatura favorável à germinação dos isolados do fungo também aumenta, variando entre 15 e 35 °C (Figuras 1 a 4).

No extremo inferior de temperatura testado (10 °C), a germinação de todos os isolados foi bastante reduzida; nas demais temperaturas, a porcentagem de germinação dos isolados foi semelhante, com exceção do período de molhamento de 8 h para todos os isolados (Figuras 1 a 4).

Em geral, o ajuste gerado pelo modelo beta generalizado foi satisfatório, porém pelos valores discrepantes da temperatura mínima no isolado 2 e da temperatura máxima para o isolado 4, pode-se observar que para o período de molhamento de 24 h o modelo não adequou-se satisfatoriamente (Tabela 1), isto ocorreu devido a presença de porcentagens de germinação semelhantes, portanto, ensaios com temperaturas superiores e inferiores as testadas neste experimento são necessários.

Tabela 1 - Coeficientes de determinação (r^2) e parâmetros da função beta generalizada, $y = b_1 * ((x - b_2) \wedge b_3) * ((b_4 - x) \wedge b_5)$ ajustada aos dados de germinação de esporos de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* nas temperaturas de 10 a 35 °C, onde y é a porcentagem relativa de germinação, x é a temperatura, b_2 e b_4 são respectivamente as temperaturas mínima e máxima e b_1, b_3 e b_5 são parâmetros da equação, ajustado para os diferentes períodos de molhamento e isolados

Isolado	**Período de molhamento**	**Parâmetros**					r^2
		b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	
1	8 horas	0,23	7,11	1,33	36,05	0,71	0,83
	12 horas	0,15	7,16	0,76	52,27	1,19	0,79
	24 horas	0,60	7,56	0,70	53,64	0,85	0,59
	48 horas	0,09	6,36	0,90	50,80	1,20	0,73
2	8 horas	9,77	8,93	0,51	35,21	0,21	0,86
	12 horas	14,79	8,74	0,38	36,57	0,24	0,77
	24 horas	0,30	-13,09	1,36	37,55	0,24	0,67
	48 horas	55,25	9,99	0,08	35,00	0,01	0,95
3	8 horas	0,27	9,68	1,19	37,03	0,84	0,97
	12 horas	0,01	8,73	1,49	43,07	1,51	0,93
	24 horas	0,00	5,38	1,49	48,77	1,75	0,75
	48 horas	22,12	10,00	0,07	75,10	0,17	0,82
4	8 horas	5,36	9,92	0,62	35,47	0,30	0,98
	12 horas	0,01	7,97	1,92	40,38	1,35	0,98
	24 horas	56,80	10,00	0,11	128,97	0,02	0,94
	48 horas	15,00	10,00	0,10	52,46	0,37	0,93

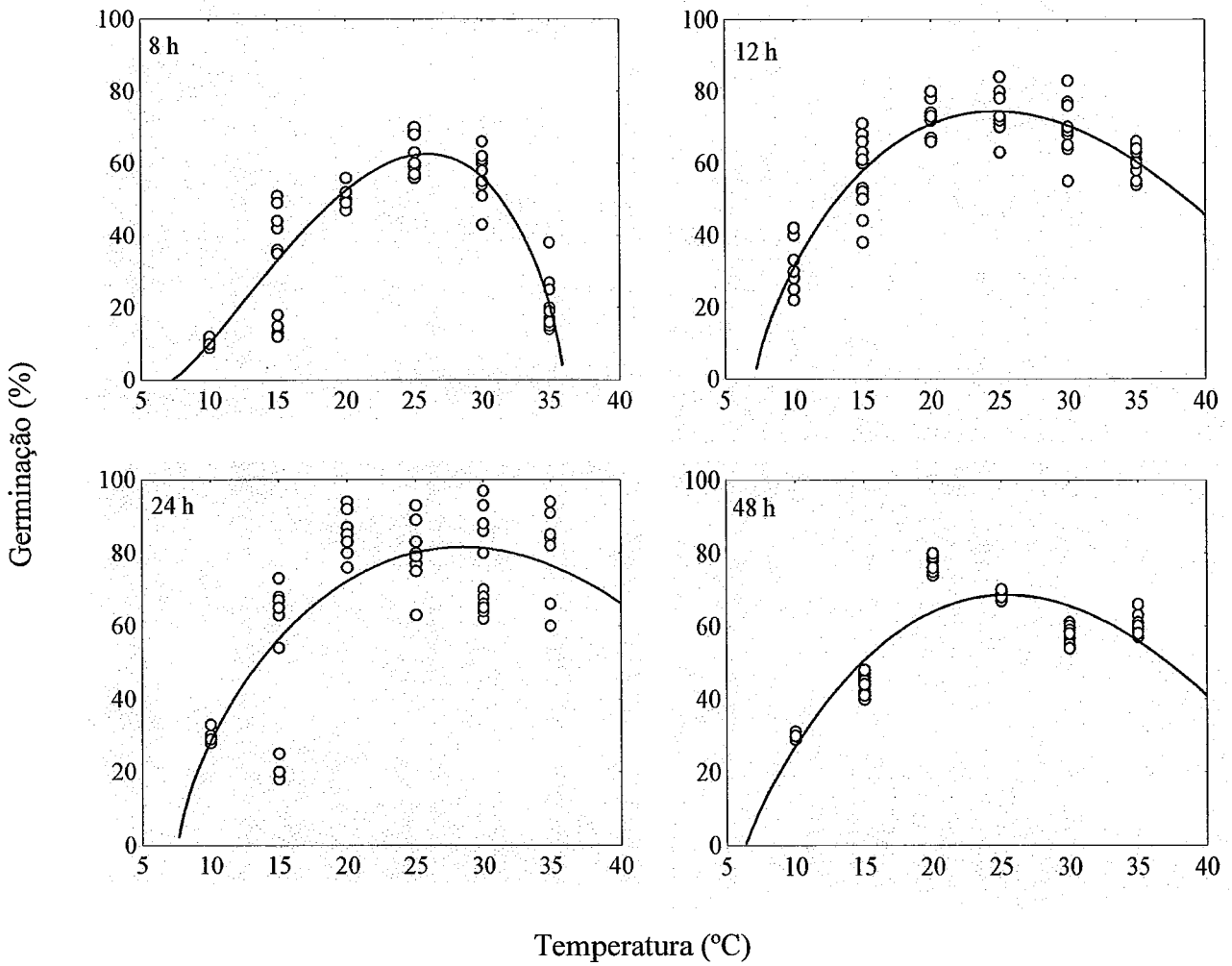

Figura 1 - Porcentagem relativa de germinação do isolado 1 de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função de diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C) e períodos de molhamento (8, 12, 24 e 48 h). Pontos representam as repetições dos tratamentos e linhas representam o ajuste obtido com a função beta generalizada

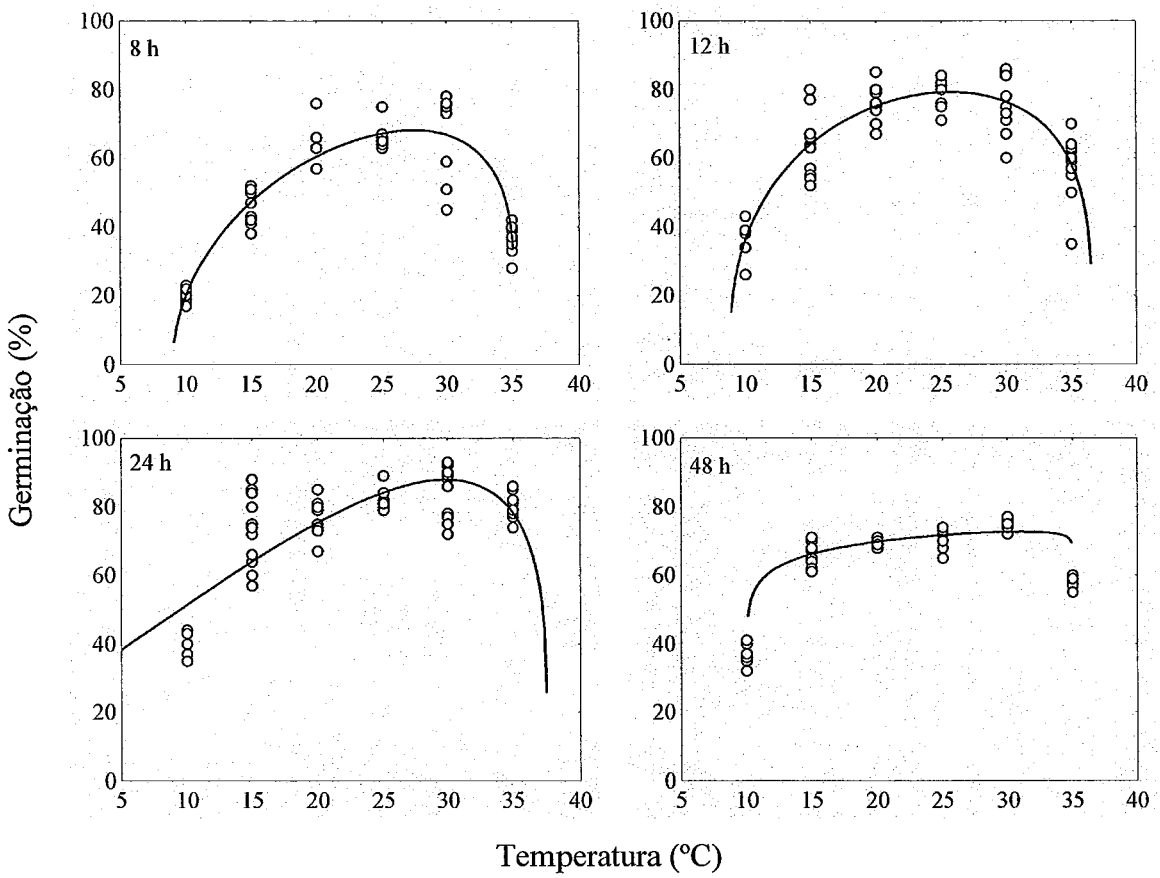

Figura 2 - Porcentagem relativa de germinação do isolado 2 de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função de diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C) e períodos de molhamento (8, 12, 24 e 48 h). Pontos representam as repetições dos tratamentos e linhas representam o ajuste obtido com a função beta generalizada

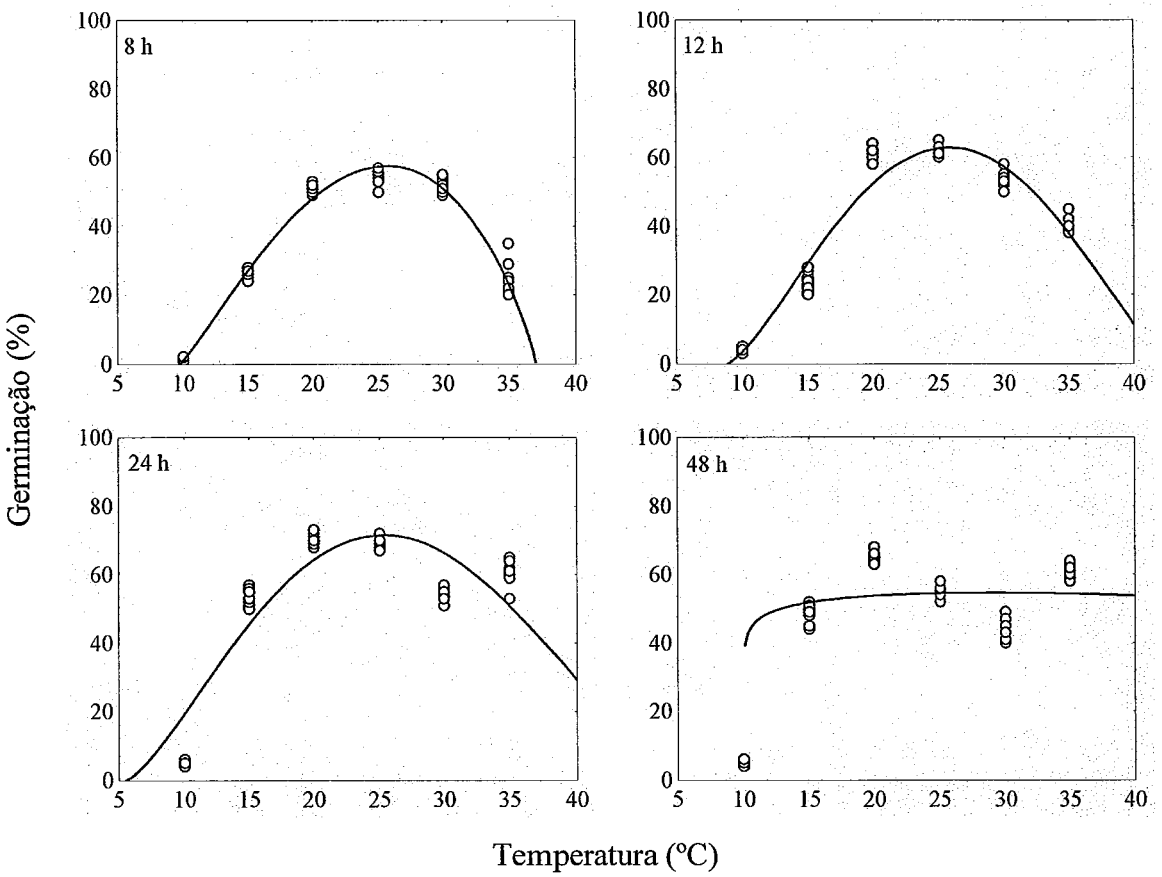

Figura 3 - Porcentagem relativa de germinação do isolado 3 de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função de diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C) e períodos de molhamento (8, 12, 24 e 48 h). Pontos representam as repetições dos tratamentos e linhas representam o ajuste obtido com a função beta generalizada

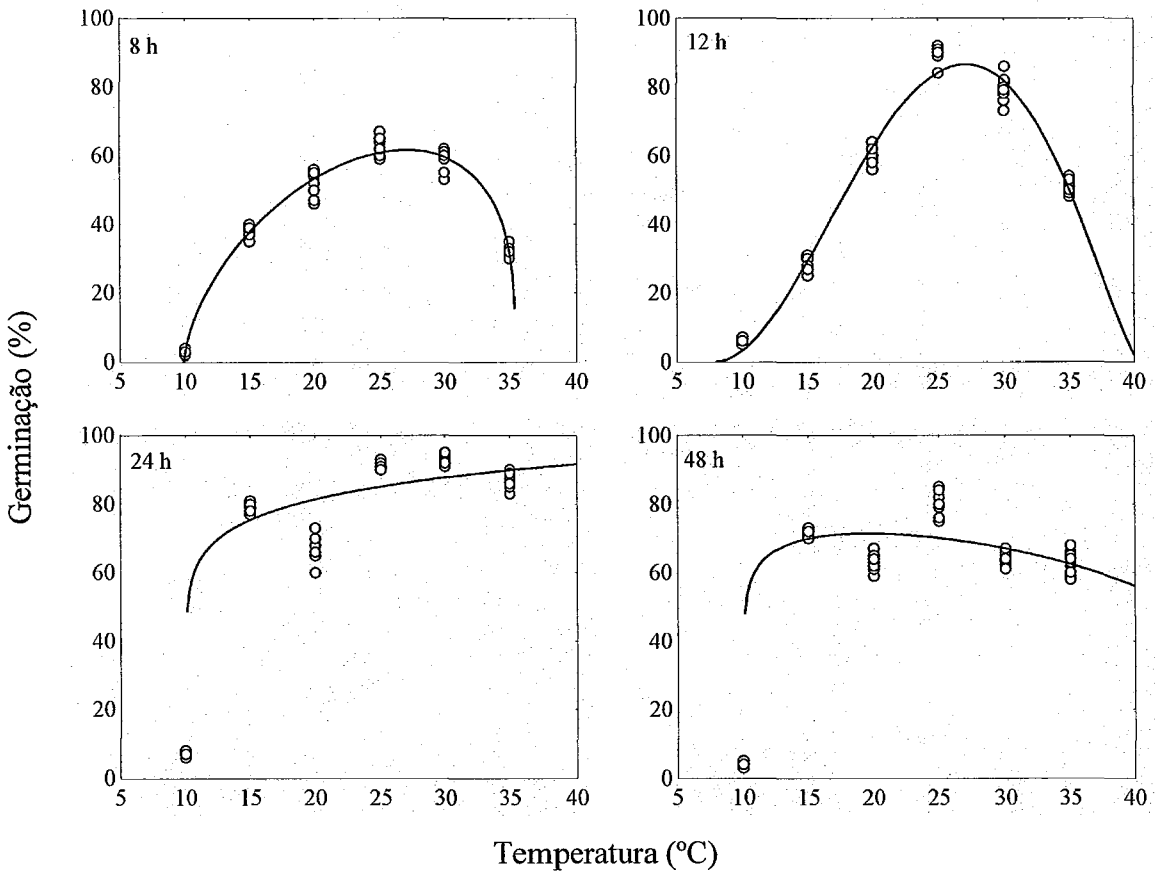

Figura 4 - Porcentagem relativa de germinação do isolado 4 de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função de diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C) e períodos de molhamento (8, 12, 24 e 48 h). Pontos representam as repetições dos tratamentos e linhas representam o ajuste obtido com a função beta generalizada

Quando houve aumento do período de molhamento, a germinação dos conídios dos isolados de *A. alternata* f. sp. *citri*, descrita pelo modelo monomolecular, foi favorecida (Tabela 2, Figuras 5 a 8). A partir de 8 horas de molhamento, os conídios dos isolados 1, 2, 3 e 4, submetidos a 25 °C germinaram 62,7, 66,0, 54,6 e 62,6%, respectivamente (Figuras 5 a 8). No período de molhamento de 48 h, a porcentagem de germinação de todos os isolados foi menor do que no período de 24 h (Figuras 5 a 8).

Tabela 2 - Coeficientes de determinação (r^2) e parâmetros da função monomolecular, $y = b_6 * (1 - b_7 * exp(- b_8 * m))$ ajustada aos dados de germinação de esporos de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* nos períodos de molhamentos de 8 a 48 h, onde y representa a quantidade relativa de geminação, m representa período de molhamento, b_6, b_7 e b_8 são parâmetros do modelo dos diferentes isolados

(continua)

Isolado	**Temperatura**	**Parâmetros**			r^2
	(°C)	b_6	b_7	b_8	
1	10	30,29	-1956e4	2,14	0,86
	15	50,69	-1043e4	2,15	0,20
	20	80,84	-4,08	0,33	0,85
	25	74,37	-84,34	0,78	0,33
	30	67,39	-1004e3	1,95	0,18
	35	69,68	-22,92	0,44	0,80
2	10	38,18	-44,39	0,57	0,83
	15	69,61	-4,51	0,35	0,59
	20	74,00	-4436e3	2,14	0,45
	25	77,12	-3026e3	2,10	0,44
	30	79,74	-1,90	0,36	0,26
	35	68,44	-4,36	0,30	0,63

Tabela 2 - Coeficientes de determinação (r^2) e parâmetros da função monomolecular, $y = b_6 * (1 - b_7 * exp (- b_8 * m))$ ajustada aos dados de germinação de esporos de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* nos períodos de molhamentos de 8 a 48 h, onde y representa a quantidade relativa de geminação, m representa período de molhamento, b_6, b_7 e b_8 são parâmetros do modelo dos diferentes isolados

(conclusão)

Isolado	Temperatura (°C)	Parâmetros			r^2
		b_6	b_7	b_8	
3	10	4,81	-7,91	0,31	0,79
	15	52,16	-0,24	0,09	0,77
	20	67,96	-0,80	0,24	0,89
	25	62,31	-38,34	0,72	0,28
	30	—	—	—	—
	35	61,92	-1,32	0,16	0,95
4	10	5,75	-1445e3	1,85	0,49
	15	77,98	-0,23	0,08	0,72
	20	65,31	-0,58	0,24	0,72
	25	86,87	-4907e4	2,37	0,83
	30	78,81	-1188e2	1,63	0,39
	35	73,89	-2,17	0,21	0,76

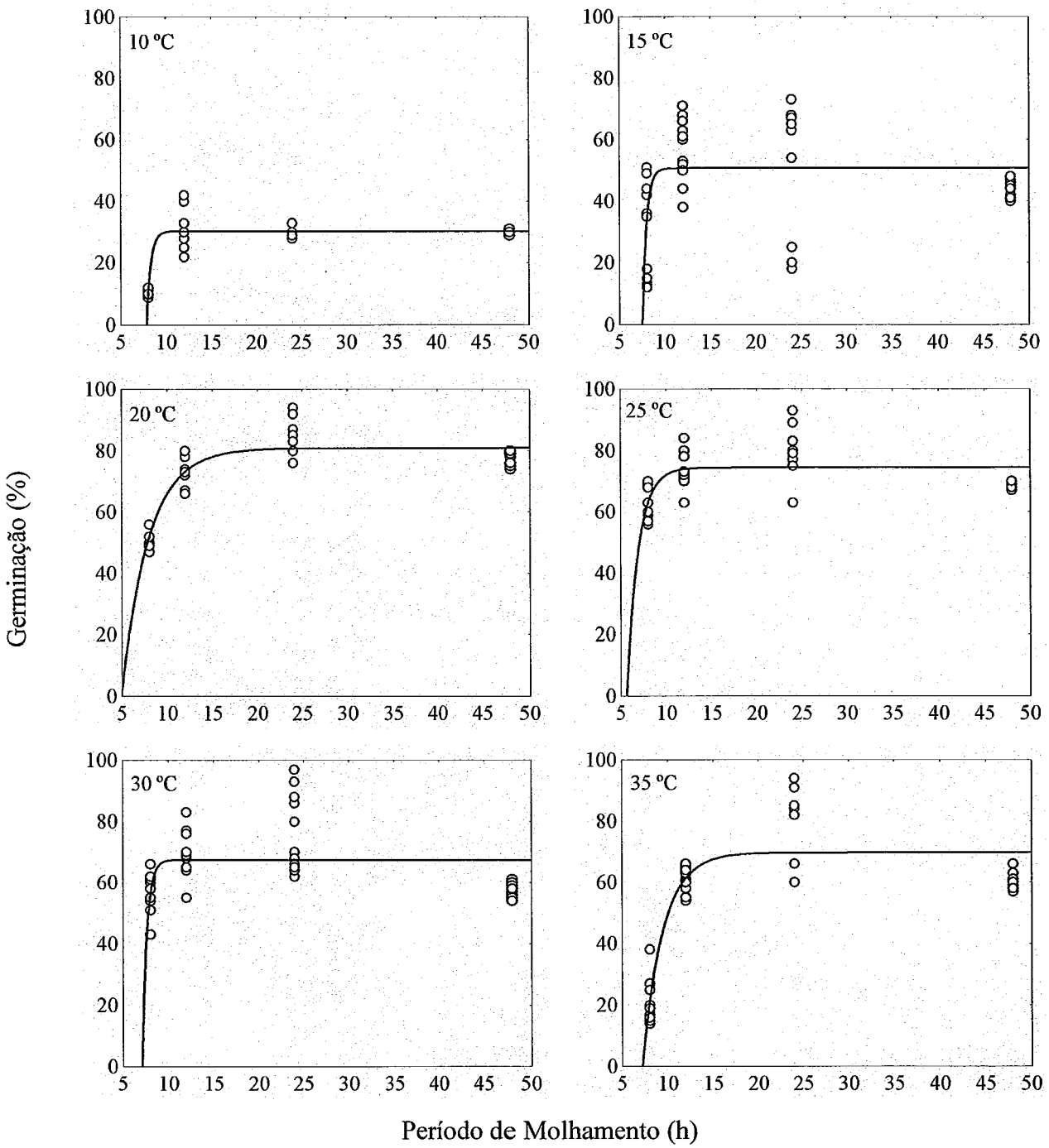

Figura 5 - Porcentagem relativa de germinação do isolado 1 de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função de diferentes períodos de molhamento (8, 12, 24 e 48 h) e temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C). Pontos representam as repetições dos tratamentos e linhas representam o ajuste obtido com o modelo monomolecular

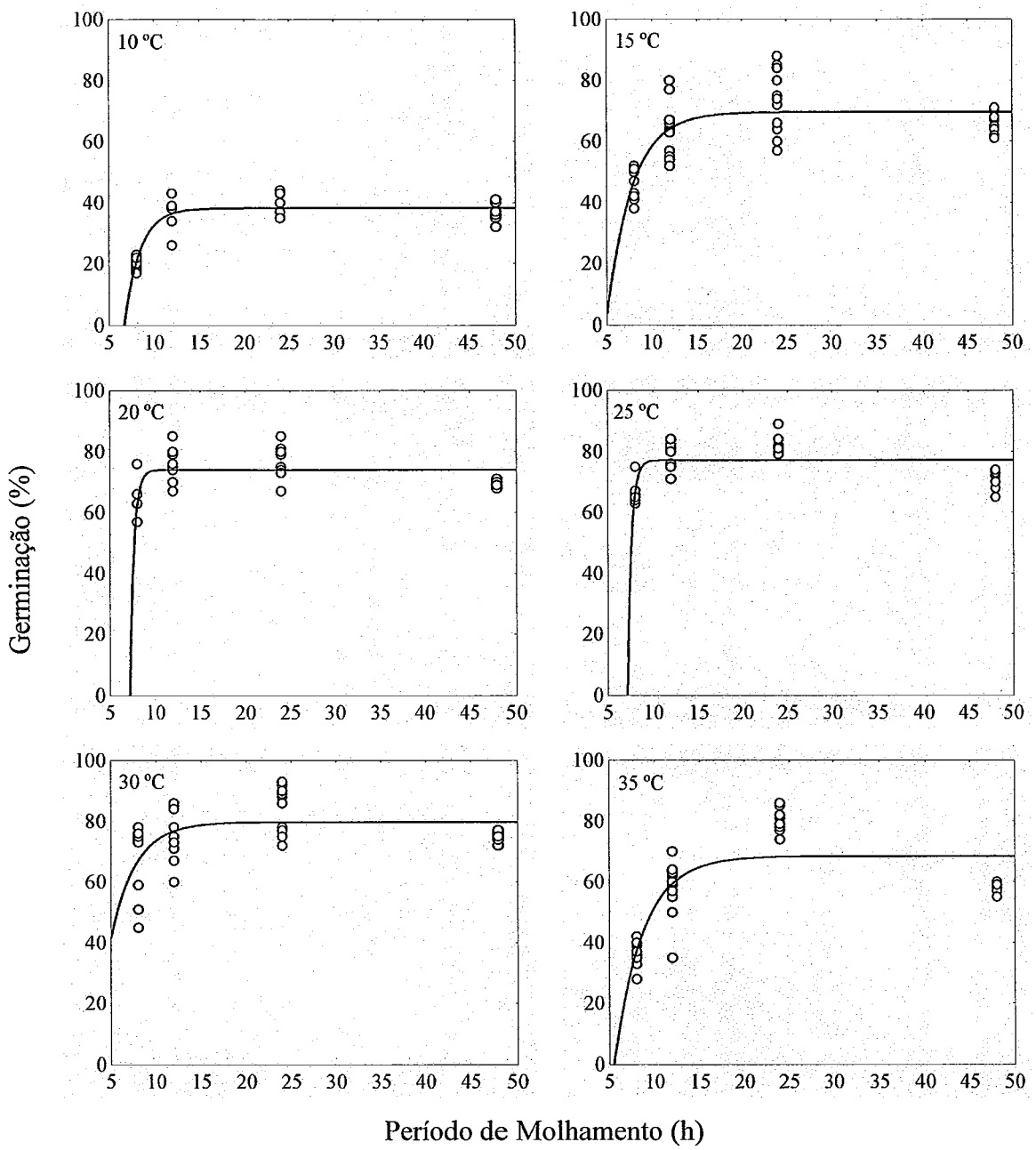

Figura 6 - Porcentagem relativa de germinação do isolado 2 de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função de diferentes períodos de molhamento (8, 12, 24 e 48 h) e temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C). Pontos representam as repetições dos tratamentos e linhas representam o ajuste obtido com o modelo monomolecular

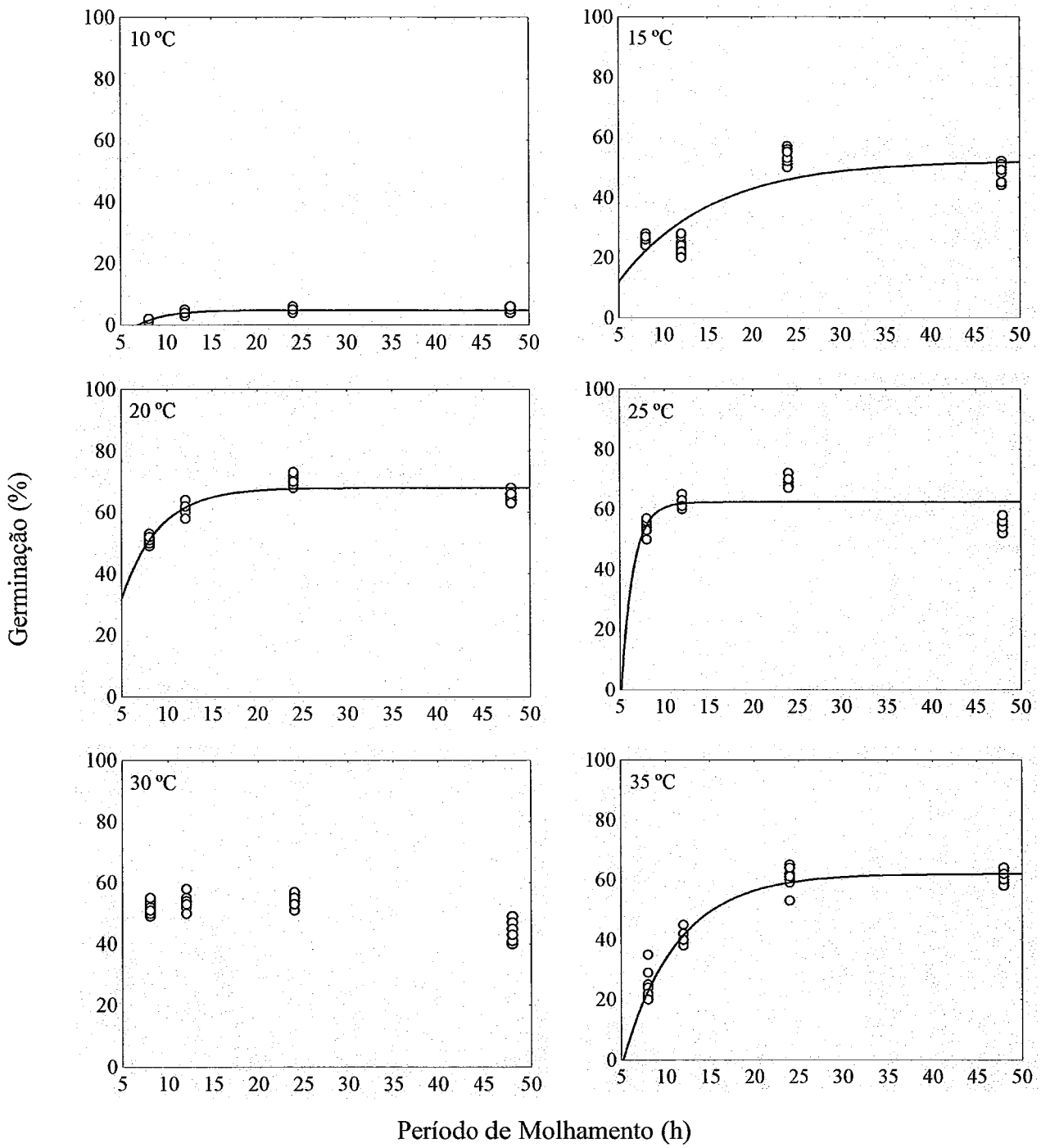

Figura 7 - Porcentagem relativa de germinação do isolado 3 de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função de diferentes períodos de molhamento (8, 12, 24 e 48 h) e temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C). Pontos representam as repetições dos tratamentos e linhas representam o ajuste obtido com o modelo monomolecular

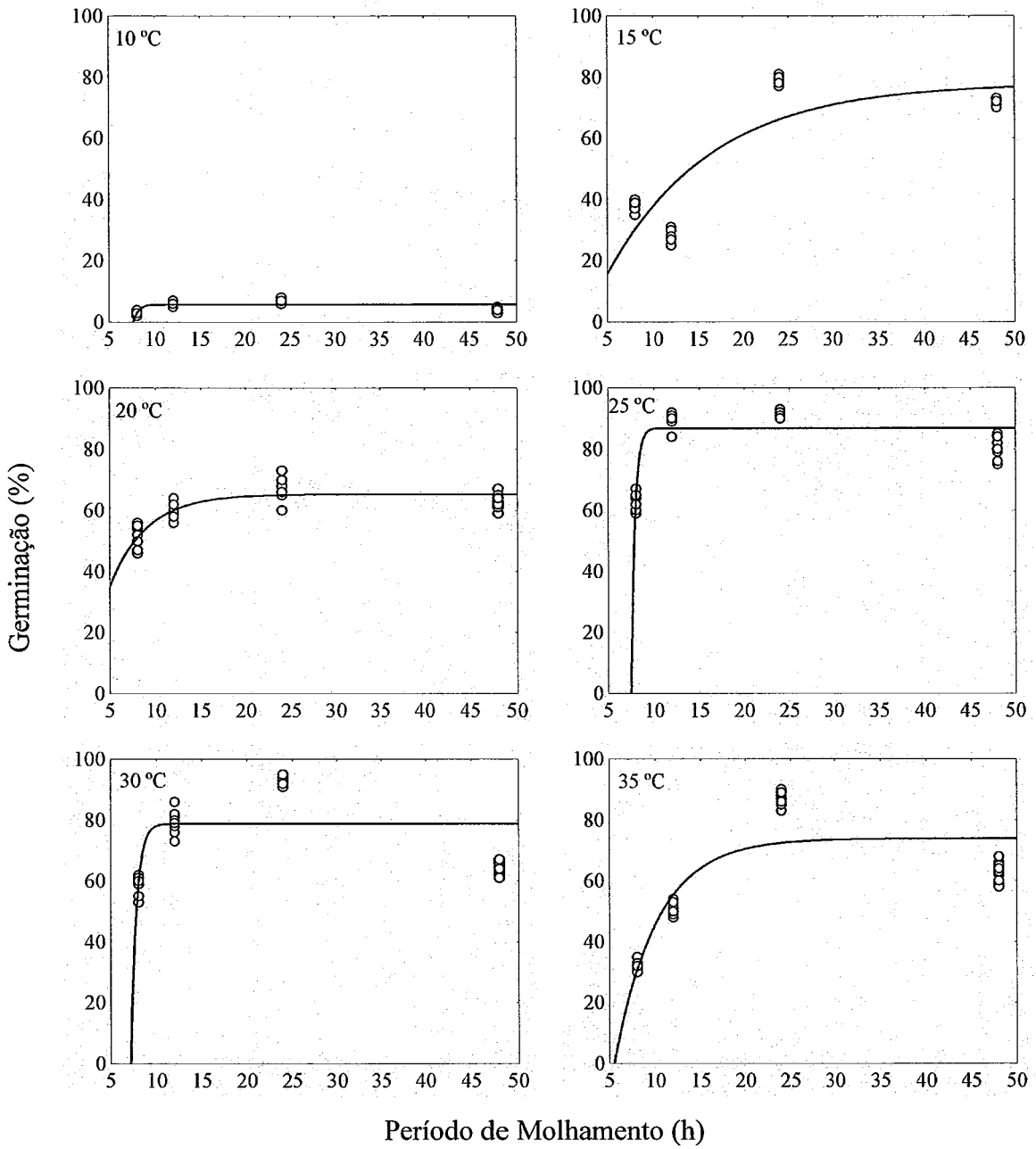

Figura 8 - Porcentagem relativa de germinação do isolado 4 de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função de diferentes períodos de molhamento (8, 12, 24 e 48 h) e temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C). Pontos representam as repetições dos tratamentos e linhas representam o ajuste obtido com o modelo monomolecular

As superfícies de resposta da germinação de conídios dos quatro isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função da temperatura e da duração do período de molhamento, obtidas pela multiplicação das funções beta generalizada e monomolecular, apresentaram bom ajuste aos dados (Figuras 9 a 12). Os coeficientes de determinação (r^2) das regressões foram 0,64, 0,73, 0,78 e 0,66, para os isolados 1 a 4, respectivamente.

As equações que descrevem as superfícies de resposta dos isolados 1, 2 , 3 e 4 são as eq. (1), eq. (2), eq. (3), e eq. (4), respectivamente, descritas a seguir.

$$y = 0{,}16 * ((x - 8{,}55) \wedge 0{,}56) * ((42{,}38 - x) \wedge 0{,}54) * 20{,}60 * (1 - 5{,}26 * \exp(-0{,}34 * m)) \quad (1)$$

$$y = 0{,}01 * ((x - 7{,}10) \wedge 0{,}60) * ((52{,}57 - x) \wedge 0{,}97) * 32{,}48 * (1 - 27{,}8772 * \exp(-0{,}58 * m)) \quad (2)$$

$$y = 0{,}19 * ((x - 9{,}98) \wedge 0{,}39) * ((36{,}87 - x) \wedge 0{,}23) * 61{,}35 * (1 - 1{,}54 * \exp(-0{,}20 * m)) \quad (3)$$

$$y = 0{,}06 * ((x - 9{,}92) \wedge 0{,}57) * ((39{,}02 - x) \wedge 0{,}43) * 81{,}37 * (1 - 0{,}31 * \exp(-12{,}13 * m)) \quad (4)$$

Nessas equações y é a porcentagem relativa de germinação, x é a temperatura em °C e m é o período de molhamento. Os valores mostram que a germinação do isolado 2 pode ocorrer em uma maior amplitude de temperatura do que os demais isolados, ao contrário, a menor amplitude onde ocorre a germinação foi obtida para o isolado 3.

Nos dois experimentos com períodos descontínuos de molhamento, as maiores porcentagens de germinação ocorreram sempre no período de molhamento contínuo de 24 h (Tabelas 3 e 4), e embora os tratamentos diferissem estatisticamente entre si, a redução na porcentagem de germinação devida à interrupção do molhamento foi pequena para todos os isolados no primeiro ensaio (Tabela 3), enquanto no segundo ensaio, foram maiores (Tabela 4). Além disso, os períodos de molhamento de 4 e 6 h também mostraram elevadas taxas de germinação, reforçando a idéia de que sob temperatura ideal o fungo germina com curtos períodos

de molhamento.

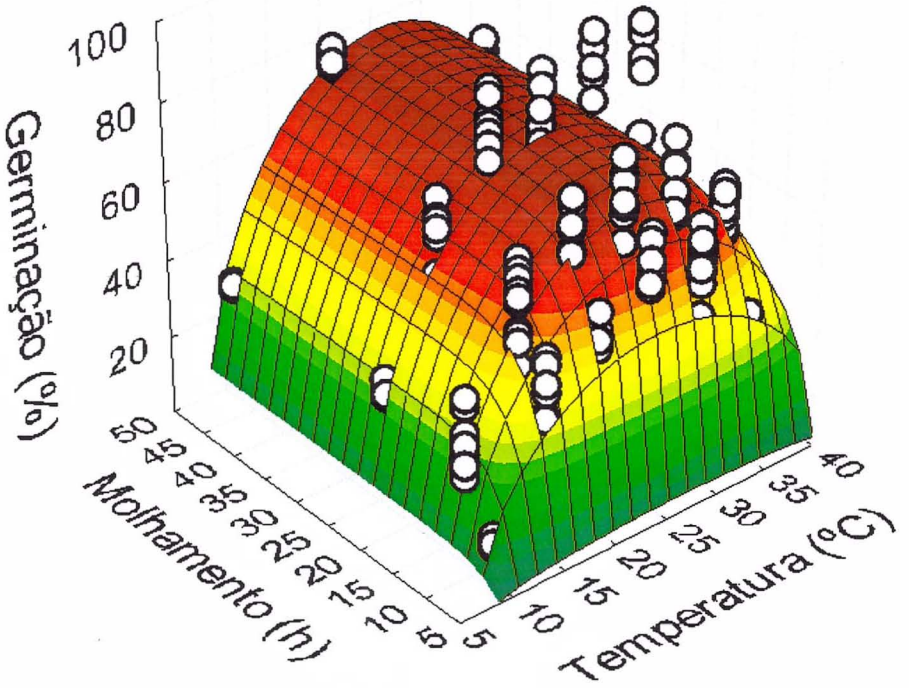

Figura 9 - Superfície de resposta ajustada à porcentagem de germinação do isolado 1, em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela função $y = b_1 * ((x - b_2) \wedge b_4) * ((b_3 - x) \wedge b_5) * b_6 * (1 - b_7 * \exp(- b_8 * m))$ onde y é a porcentagem relativa de germinação, x é a temperatura em °C e m é o período de molhamento e b_1 a b_8 são parâmetros do modelo

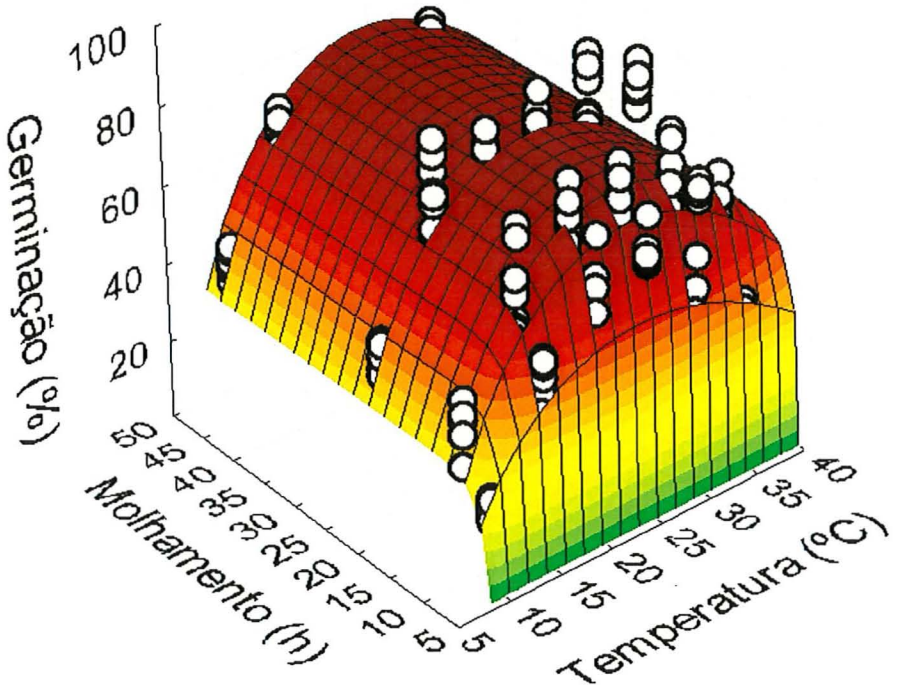

Figura 10 - Superfície de resposta ajustada à porcentagem de germinação do isolado 2, em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela função $y = b_1 * ((x - b_2) \wedge b_4) * ((b_3 - x) \wedge b_5) * b_6 * (1 - b_7 * \exp(- b_8 * m))$ onde y é a porcentagem relativa de germinação, x é a temperatura em °C e m é o período de molhamento e b_1 a b_8 são parâmetros do modelo

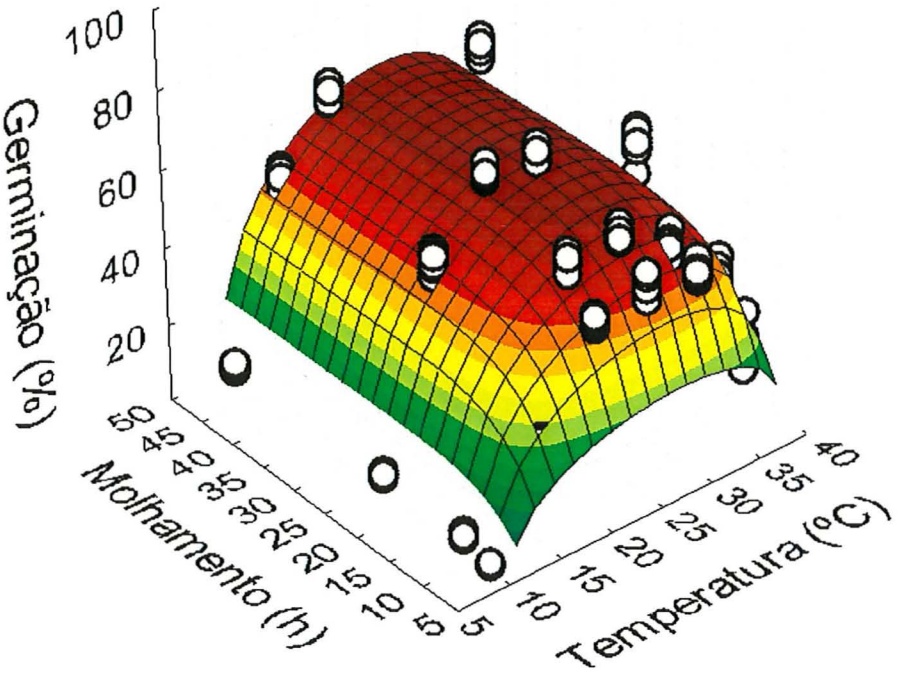

Figura 11 - Superfície de resposta ajustada à porcentagem de germinação do isolado 3, em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela função $y = b_1 * ((x - b_2) \wedge b_4) * ((b_3 - x) \wedge b_5) * b_6 * (1 - b_7 * \exp(- b_8 * m))$ onde y é a porcentagem relativa de germinação, x é a temperatura em °C e m é o período de molhamento e b_1 a b_8 são parâmetros do modelo

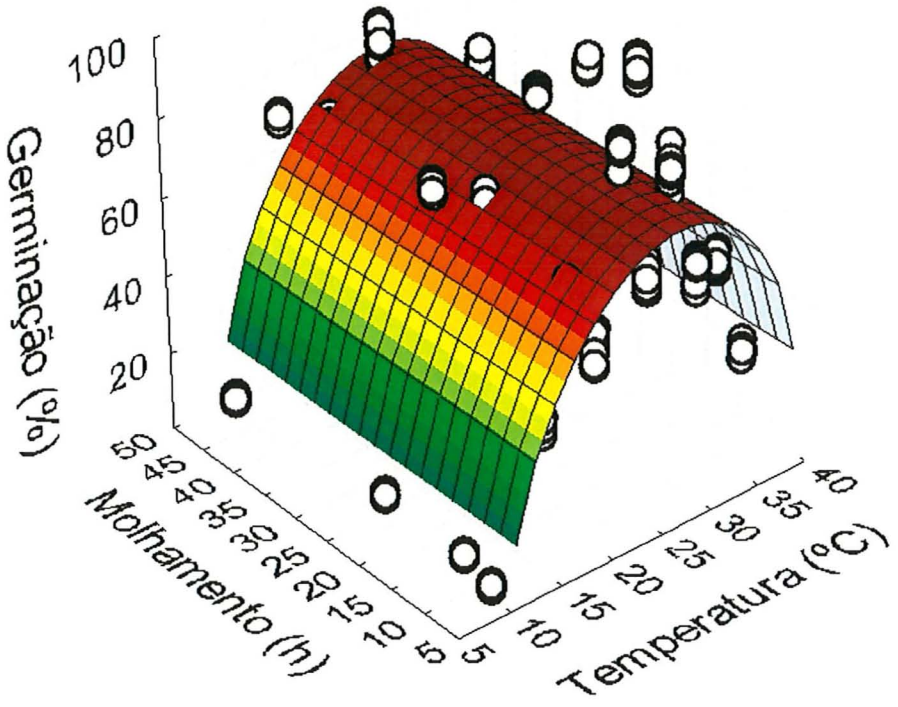

Figura 12 - Superfície de resposta ajustada à porcentagem de germinação do isolado 4, em função da temperatura e do período de molhamento, descrita pela função $y = b_1 * ((x - b_2) \wedge b_4) * ((b_3 - x) \wedge b_5) * b_6 * (1 - b_7 * \exp(- b_8 * m))$ onde y é a porcentagem relativa de germinação, x é a temperatura em °C e m é o período de molhamento e b_1 a b_8 são parâmetros do modelo

Tabela 3 - Análise de variância das porcentagens de germinação dos isolados obtidas no experimento com períodos de molhamento descontínuo. O tratamento 1 corresponde a 6 h com molhamento, o 2 são 24 h com molhamento e o tratamento 3 corresponde a 6 h com molhamento - 12 h sem molhamento - 6 h com molhamento

Tratamentos	**Porcentagem de Germinação**			
	Isolado 1	**Isolado 2**	**Isolado 3**	**Isolado 4**
1	83,62c*	83,00c	65,75c	81,87c
2	98,00a	97,52a	77,50a	96,25a
3	94,25b	92,50b	73,87b	93,25b

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $p<0,05$.

Tabela 4 - Análise de variância das porcentagens de germinação dos isolados obtidas no experimento com períodos de molhamento descontínuo. O tratamento 1 corresponde a 4 h com molhamento, o 2 são 24 h com molhamento e o tratamento 3 corresponde a 4 h com molhamento - 12 h sem molhamento - 8 h com molhamento

Tratamentos	**Porcentagem de Germinação**			
	Isolado 1	**Isolado 2**	**Isolado 3**	**Isolado 4**
1	60,75c*	62,75c	50,25c	62,87c
2	98,50a	98,37a	69,25a	90,87a
3	80,12b	77,25b	56,75b	80,37b

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $p<0,05$.

3.2.3.2 Efeitos da temperatura e do período de molhamento foliar no desenvolvimento da Mancha Marrom de Alternaria

A maior incidência da doença observada foi 100%, no período de molhamento de 24 h a 20 °C para o isolado 3, e a 20 e 25 °C para o isolado 4 (Figura 13). O molhamento de 24 h propiciou os melhores resultados em todas as temperaturas testadas para os dois isolados (Figura 13).

A duração do período de molhamento de 48 h não foi tão favorável à infecção dos frutos pelos patógenos (Figura 13), resultado semelhante ao obtido pelos isolados no experimento *in vitro*, onde após 24 h de molhamento a germinação dos isolados decaiu. Para o isolado 3, o molhamento de 48 h a 20 °C proporcionou 70% de incidência da doença, bastante próximo à porcentagem de germinação que foi de 77%. Nas demais temperaturas (25 e 30 °C) não houve doença com 48 h de molhamento. Não houve desenvolvimento de doença após a inoculação com o isolado 3 no molhamento de 8 h para 25 e 30 °C. Para o isolado 4, com 48 h de molhamento, as incidências foram de 90, 70 e 40% para as temperaturas de 20, 25 e 30 °C , respectivamente (Figura 13), contudo, quando avaliou-se a germinação, os resultados foram diferentes, sendo 71,4, 63,0 e 80,3% para a mesma seqüência de temperaturas.

A função que descreve a equação quadrática para a incidência da doença dos isolados 3 e 4 é a eq. (5), onde y é a incidência de doença, b_1, b_2 e b_3 são parâmetros da equação e x, o período de molhamento (Tabela 5).

$$y = b_1 x^2 + b_2 x - b_3 \qquad (5)$$

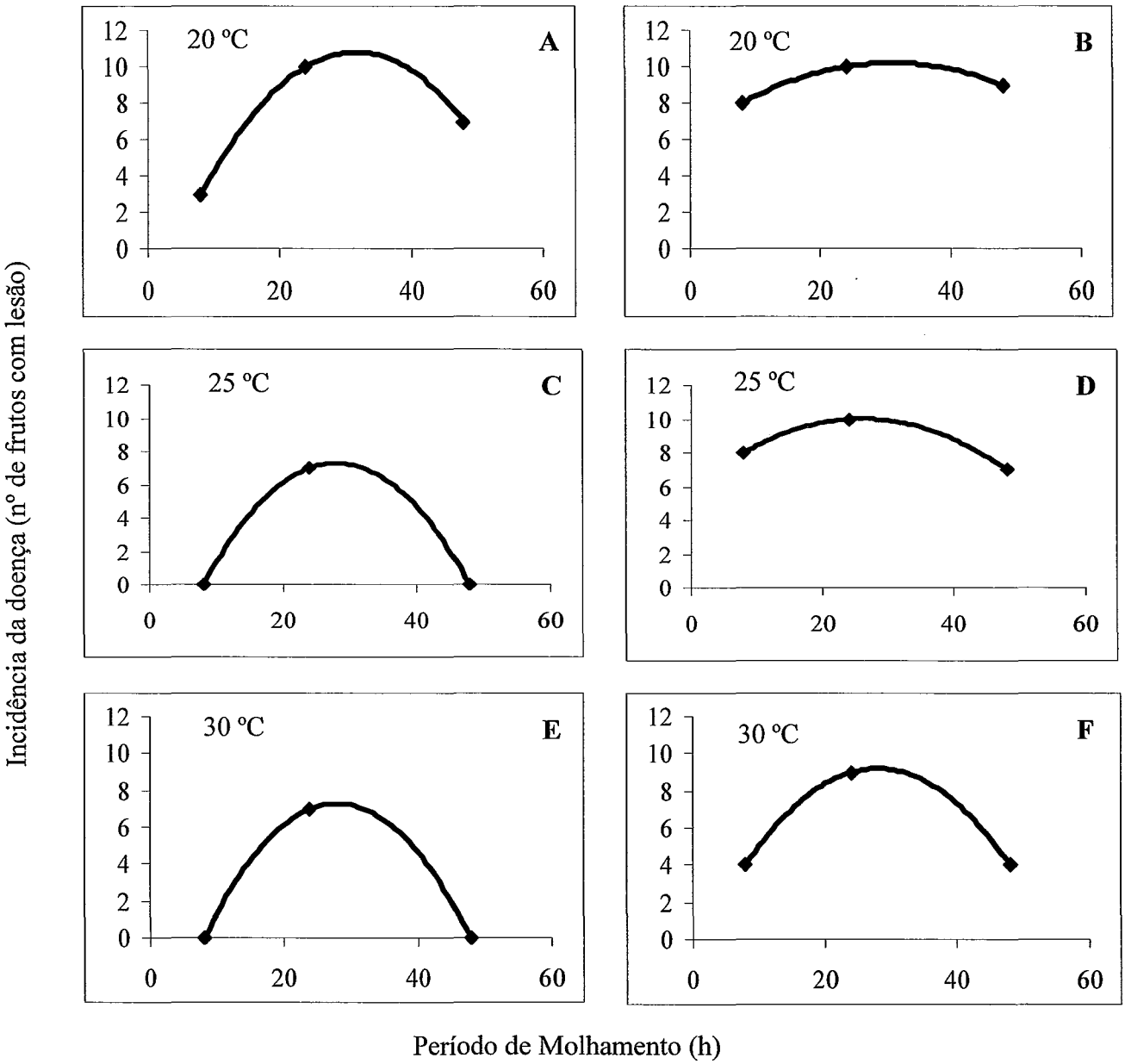

Figura 13 - Incidência de doença em frutos inculados com os isolados 3 (A, C e E) e 4 (B, D e F) de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (representada pelo número de frutos com lesão), em função de diferentes períodos de molhamento (8, 24 e 48 h) e temperaturas (20, 25 e 30 °C). Pontos representam a incidência de doença em cada tratamento e as linhas representam o ajuste obtido com a regressão quadrática

Tabela 5 - Parâmetros da equação quadrática $y = b_1 x^2 + b_2 x - b_3$, onde y é a incidência de doença, b_1, b_2 e b_3 são parâmetros da equação e x o período de molhamento, para cada temperatura avaliada, para os dois isolados testados

Isolado	**Temperatura (°C)**	**Parâmetros**		
		b_1	b_2	b_3
3	20	-0,01	0,88	-3,2
	25	-0,01	1,02	-7,0
	30	-0,01	1,02	-7,0
4	20	-0,00	0,25	6,2
	25	-0,00	0,32	5,8
	30	-0,01	0,72	-1,0

As maiores médias das áreas das lesões para os dois isolados testados, independentemente do período de molhamento, ocorreram a 20 °C (Figura 14). Embora a incidência de lesões do isolado 4 tenha sido a mesma para 20 e 25 °C no molhamento de 24 h, as médias das áreas das lesões nestas duas temperaturas foram diferentes (Figuras 13 e 14), medindo 7,8 e 5,1 mm^2, respectivamente (Figura 14).

A eq. (5) também foi utilizada ao ajuste dos dados de área média das lesões. Todos os valores encontrados nas regressões para os isolados 3 e 4 estão apresentados na Tabela 6.

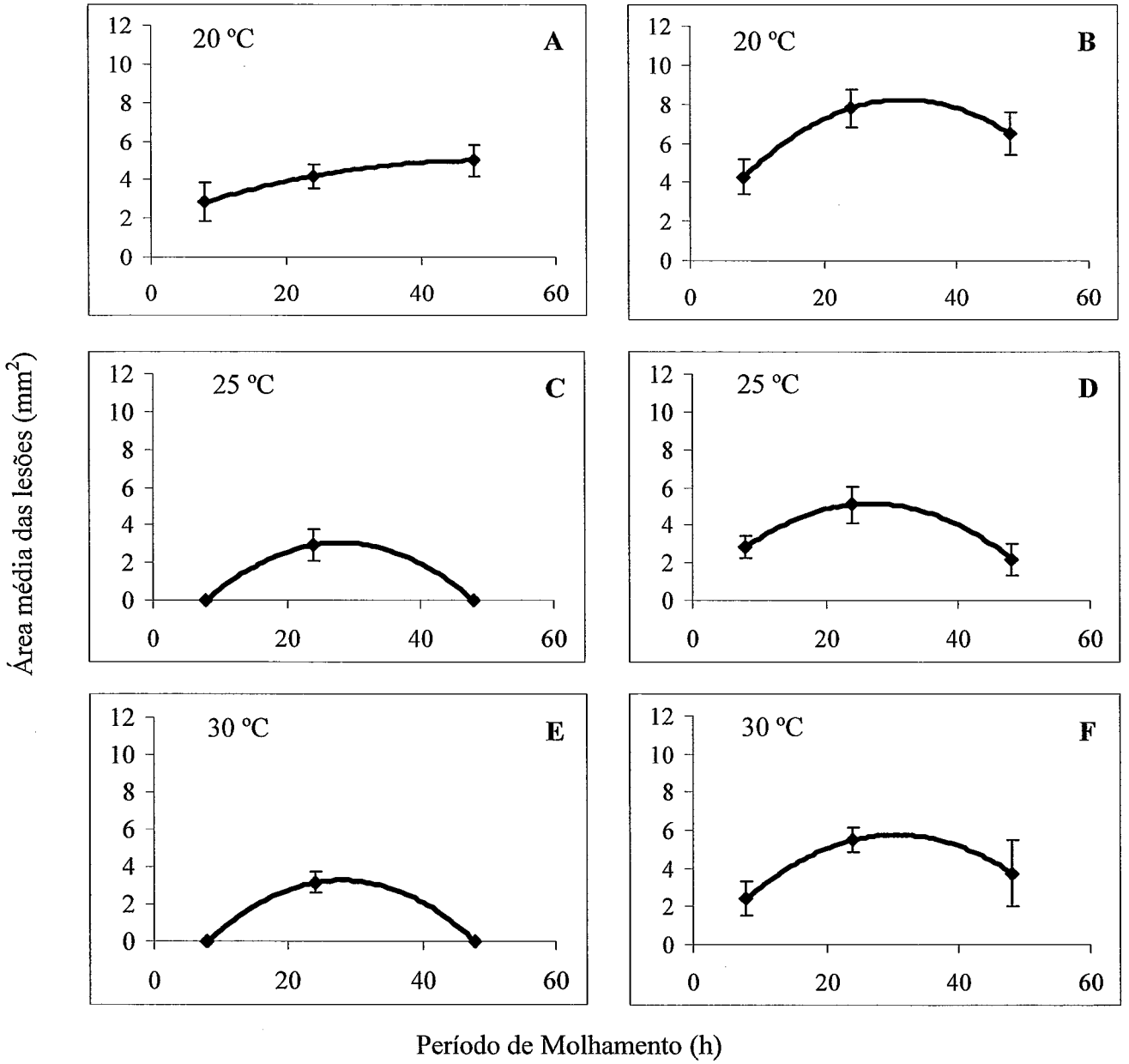

Figura 14 – Área média das lesões causadas pelos isolados 3 (A, C e E) e 4 (B, D e F) de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em função de diferentes períodos de molhamento (8, 24 e 48 h) e temperaturas (20, 25 e 30 °C). Pontos representam a incidência de doença em cada tratamento e as linhas representam o ajuste obtido com a regressão linear

Tabela 6 - Parâmetros da equação quadrática $y = b_1 x^2 + b_2 x - b_3$, onde y é a área média de lesões, b_1, b_2 e b_3 são parâmetros da equação e x o período de molhamento, para cada temperatura avaliada, para os dois isolados testados

Isolado	Temperatura (°C)	Parâmetros		
		b_1	b_2	b_3
3	20	-0,00	0,12	1,9
	25	-0,01	0,42	-2,9
	30	-0,01	0,45	-3,1
4	20	-0,01	0,43	1,2
	25	-0,01	0,35	0,46
	30	-0,01	0,40	-0,36

3.2.3.3 Análise de imagens da formação de apressórios de conídios de quatro isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* ao microscópio eletrônico de varredura

As imagens elétron-micrografadas das amostras observadas em microscopia eletrônica de varredura possibilitaram a visualização e digitalização de imagens dos conídios germinando e formando apressórios sobre a superfície de folhas de tangerina 'Ponkan' e tangor 'Murcott' (Figuras 15 a 18). Foi possível verificar que todos os isolados testados comportam-se semelhantemente penetrando a superfície da folha do hospedeiro, e que apesar das hifas e tubos germinativos crescerem muito próximos e até passarem várias vezes sobre os estômatos, poucas vezes ocorreu penetração pelas aberturas estomáticas. A penetração do patógeno no hospedeiro ocorreu, em sua grande maioria, após a formação de apressórios (Figuras 15 a 18). Os apressórios formados, eram algumas vezes pequenos e delicados dificultando sua identificação, e outras, eram bastante distintos facilmente visualizados, essas duas formas de apressórios foram visualizadas em cada isolado testado.

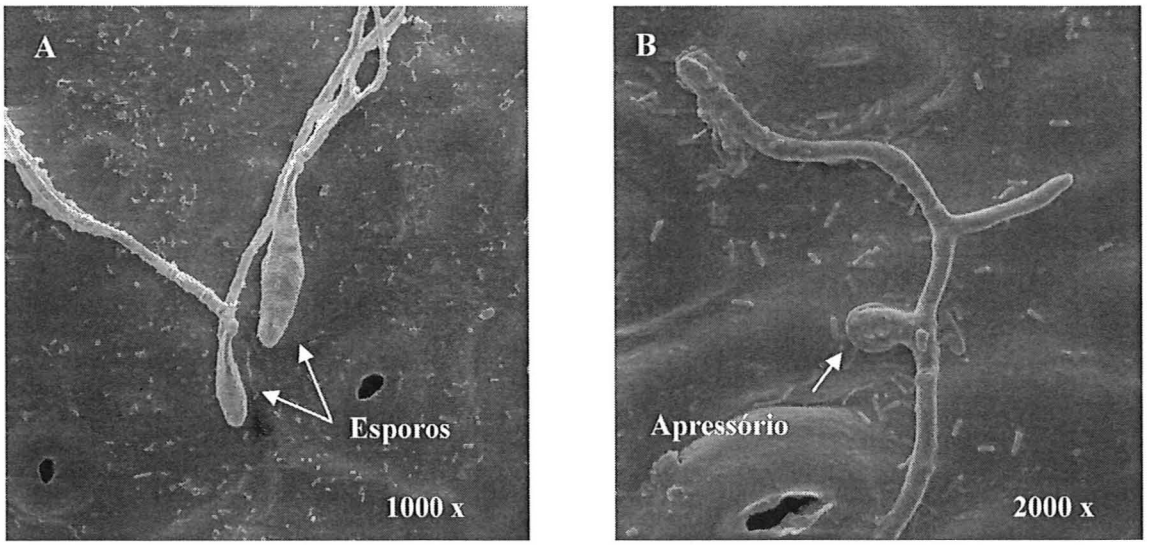

Figura 15 - Elétron-micrografia de varredura da germinação (A) e formação de apressórios (B) de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (isolado 1) na superfície inferior de folhas de tangor 'Murcott'

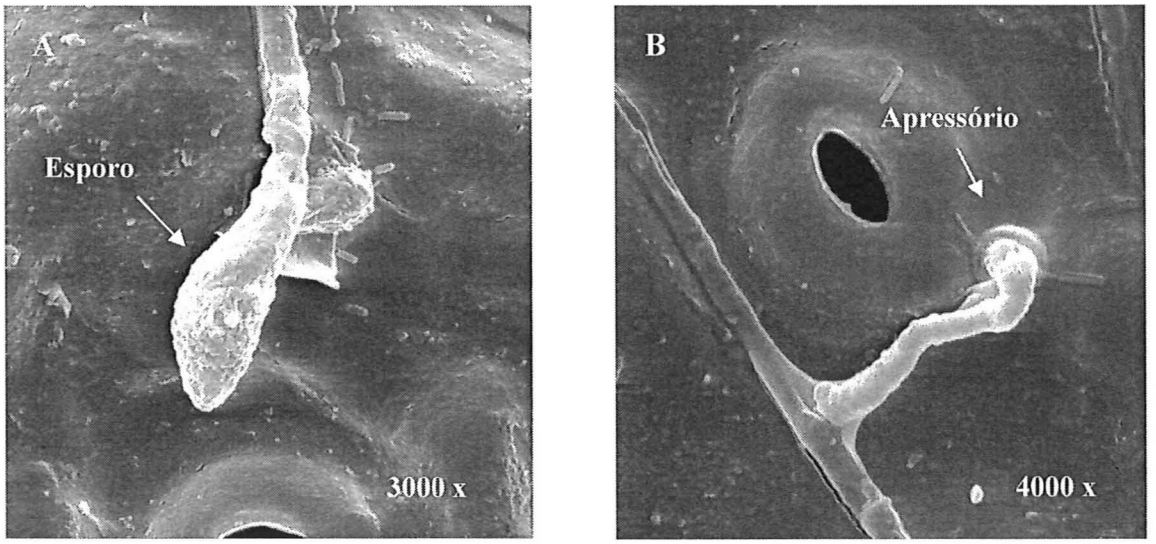

Figura 16 - Elétron-micrografia de varredura da germinação (A) e formação de apressórios (B) de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (isolado 2) na superfície inferior de folhas de tangerina 'Ponkan'

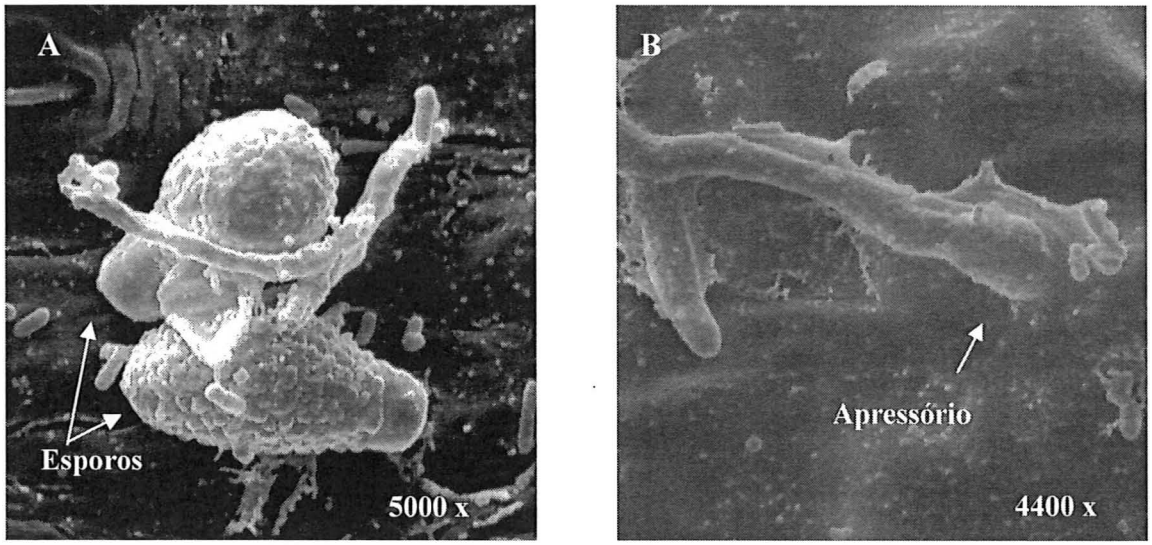

Figura 17 - Elétron-micrografia de varredura da germinação (A) e formação de apressórios (B) de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (isolado 3) na superfície inferior de folhas de tangor 'Murcott'

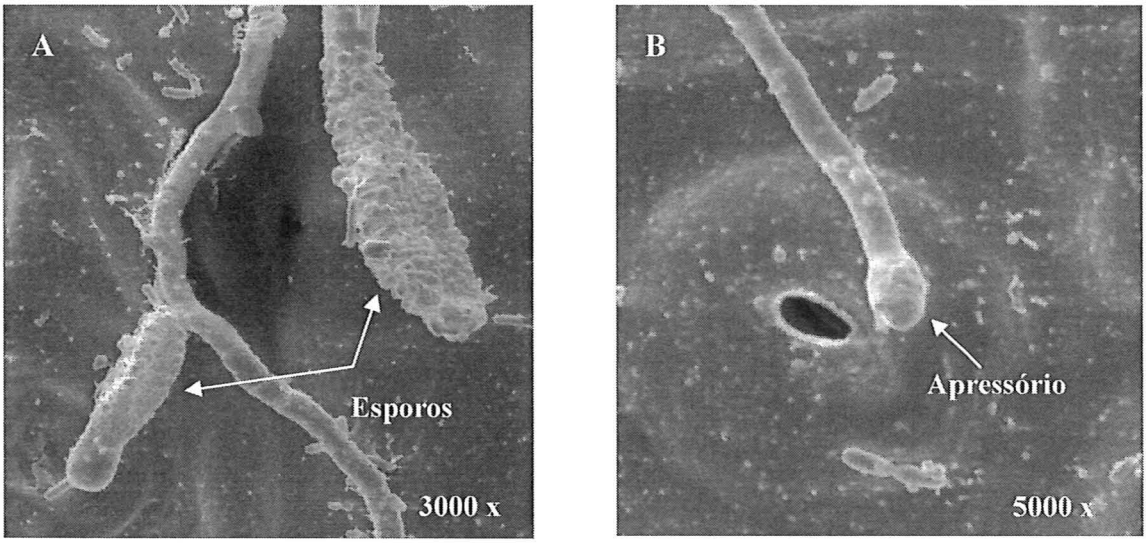

Figura 18 - Elétron-micrografia de varredura da germinação (A) e formação de apressórios (B) de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (isolado 4) na superfície inferior de folhas de tangerina 'Ponkan'

3.2.4 Discussão

Os conídios dos isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* germinam numa amplitude de temperatura, variando de 10 a 35 °C, entretanto, 10 °C foi a mais limitante à germinação do fungo. A faixa favorável de temperatura para a germinação do fungo varia de 20 a 30 °C e, à medida que aumenta o período de exposição do fungo à umidade, a faixa de temperatura também aumenta para a maioria dos isolados, variando entre 15 a 35 °C. Porém, quando o fungo foi exposto ao período de molhamento de 48 horas, a faixa de temperatura favorável à germinação diminuiu para todos os isolados testados. Entretanto, se considerada apenas uma variável climática como fator limitante para a germinação dos isolados, a temperatura é mais limitante.

A importância da umidade na infecção por *Alternaria*, também foi analisada por Sawamura (1972 apud ROTEM, 1994), que observou que *A. alternata* f. sp. *mali* infecta folhas de macieira com 3 h de molhamento, mas necessita de 48 h para infectar frutos. Para *A. macrospora* em algodão, 4 h de molhamento bastam para infecção em cotilédones altamente suscetíveis, porém um mínimo de 6 h é preciso para infecção de folhas mais resistentes (BASHI et al., 1993 apud ROTEM, 1994). Para outros patógenos, a exemplo de *Magnoporthe grisea*, agente causal da brusone do arroz, a germinação de conídios e a formação de apressórios ocorreram na superfície de folhas de arroz na presença de gotas de água numa grande amplitude de temperaturas (10 a 33 °C), com ótimo para a germinação entre 25 e 28 °C e para a formação de apressórios entre 16 e 25 °C (SUZUKI, 1969). Para *Alternaria alternata* f. sp. *citri* as infecções podem ocorrer quando a temperatura média é superior a 15 °C, sendo necessário que o tecido da planta permaneça molhado por muitas horas, e à medida que a temperatura aumenta, o número de horas com água livre necessário é menor, situando-se o ótimo de temperatura para que ocorra a infecção em torno de 25 °C com, ao menos 8 horas de água livre sobre a planta (CIVERA, 2004).

Timmer (1999), em experimentos realizados nos Estados Unidos, verificou que as condições ambientais favoráveis à infecção foliar ocorrem com períodos de molhamento superiores a 8 horas e temperaturas entre 20 e 30 °C. Porém, a temperatura ótima para que ocorra infecção foliar por *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, está entre 20 a 27 °C, podendo variar de acordo com a área geográfica (TIMMER; SOLEL; OROZCO-SANTOS, 2000). Ainda segundo os mesmos autores, embora ocorra infecção a partir de 8 horas de molhamento, os períodos de umidade sobre a folha, menores que 10 a 12 horas resultam em baixos níveis de infecção. Solel e Kimchi (1998) observaram que para temperaturas inferiores a 17 °C, extensos períodos de

molhamento (superiores a 24 horas) são necessários para que ocorra infecção, enquanto a temperatura ótima para a expansão da lesão foi entre 20 e 25°C.

Entretanto, em razão da carência de dados, não foi possível analisar conclusivamente qual variável ambiental mais influencia a incidência da doença, sugerindo-se futuros estudos. Canihos; Peever e Timmer (1999), em trabalho realizado com folhas novas, destacadas de tangelo 'Minneola', verificaram que o período de molhamento não parece ser muito restritivo ao desenvolvimento da doença, já que 4 horas de molhamento foram suficientes para a infecção, sendo a temperatura ótima encontrada pelos autores de 27 °C. Vários pesquisadores têm chegado a diferentes conclusões sobre a temperatura ideal à infecção de fumo por *A. alternata*: Stavely e Main (1970 apud ROTEM, 1994) relatam temperatura ótima de 20 °C, Ramm e Lucas (1962 apud ROTEM, 1994) de 25 °C e Riley (1949 apud ROTEM, 1994) de 30 °C. A relação entre infecção e condições ambientais é útil em programas de sistema de avisos de doença, que têm por propósito determinar o momento ideal para pulverizações de fungicidas em campo. No sistema de avisos Alter-Rater, dias com molhamento foliar acima de 10 h e temperaturas entre 20 a 28 °C proporcionam mais infecção de *A. alternata* f. sp. *citri*, do que dias com menores horas de molhamento e temperatura acima de 28 °C ou abaixo de 20 °C (TIMMER, 2003), diferindo dos dados obtidos nesse trabalho, onde 8 h de molhamento dependendo do isolado proporciona 80% de incidência a 20 ou a 25 °C.

Nas análises de imagens de microscopia eletrônica de varredura das folhas inoculadas com os isolados do fungo foi possível verificar que todos os isolados possuem comportamento semelhante, havendo formação de apressórios e poucas penetrações via estômato. Entretanto, na maioria das vezes em que um tubo germinativo ou uma hifa passava sobre um estômato, não houve penetração. Pegg (1966 apud CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999), ao examinar folhas com manchas de 24 horas de idade, também concluiu que o tubo germinativo não havia crescido em nenhuma direção particular na superfície foliar e, em muitos casos, pareciam ter crescido sobre as aberturas estomáticas sem que houvesse penetração, porém, o autor verificou que não havia penetração por *A. alternata* f. sp. *citri* dentro da folha. Noronha (2002), verificou que a formação de apressórios de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta em citros, sobre folhas destacadas de limão 'Siciliano' variaram em forma e tamanho, entretanto o tubo germinativo quando longo, apresentava apressório menor que quando o tubo germinativo era curto.

3.3 Considerações Finais

A ampla faixa de temperatura favorável à germinação dos conídios de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* indica que a ocorrência da doença deve ser muito freqüente e que as regiões produtoras de tangerinas e seus híbridos estão dentro da amplitude térmica favorável ao fungo. Assim, a doença ocorre em qualquer época do ano, sendo mais influenciada pela disponibilidade de inóculo que pelo clima. Portanto, tornam-se indispensáveis para o controle da doença medidas de manejo que visam à redução do inóculo em campo, como a retirada e queima de ramos doentes, além de evitar excesso de adubação nitrogenada e de irrigação.

O sistema de avisos Alter-Rater possui condições climáticas diferentes daquelas encontradas no presente trabalho para a infecção do patógeno. Entretanto, sugere-se mais pesquisas a campo para complementar os resultados obtidos neste trabalho, antes de rejeitar efetivamente a utilização do sistema no Brasil.

Referências

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4thed. New York: Macmillan Publishing, 1986. 218p.

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de progresso da doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p.602-626.

CANIHOS, Y.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infeccion of Minneola tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, n.5, p.429-433, 1999.

CIVERA, A.V. **Conocimientos actuales sobre la mancha marrón de la mandarina fortune causada por *Alternaria***. Disponível em: <http://www.elmont.es/productos/agricolas/agro_info_even_2002_pdf6.html> Acesso em 03 set. 2004.

ELLIS, M.B. ***Dematiaceous-Hyphomycetes***. Surrey: Commowealth Mycologycal Institute, 1971. 608 p.

FEICHTENBERGER, E. Manejo integrado das principais doenças fúngicas dos citros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.76, 2003. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia.

FNP COSULTORIA & COMÉRCIO Citrus. In:_____. **Agrianual 2003**: anuário de agricultura brasileira, São Paulo, 2003. 554 p.

FNP COSULTORIA & COMÉRCIO. Citrus. In:_____. **Agrianual 2005**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p.287-320.

GOES, A.; MONTES DE OCA, A.G.; REIS, R.F. Ocurrencia de la mancha de Alternaria en mandarina 'Dancy' en el Estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 386, 2001. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34., 2001, Brasília.

HAU, B.; KRANZ, J. Mathematics and statistics for analysis in epidemiology. In: KRANZ, J. (Ed.). **Epidemics of plant diseases**: mathematical analysis and modeling. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p.12-52.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura.** Piracicaba: ESALQ, NAP, MEPA, 1999. 45 p.

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

MARIANO, R.L.R.; SAYONARA, M.P.A. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p.37-47.

MASUNAKA, A.; OHTANI, K; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W.; TSUGE, T.; YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. An isolate of Alternaria alternata that is patogenic to both tangerines and rough lemon and produces two host-selective toxins, ACT- and ACR-toxins. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, n.3, p.241-247, 2005.

NORONHA, M.A. **Escala diagramática para avaliação da mancha preta em folhas de citros e efeito da temperatura e da duração do molhamento na pré-penetração de conídios de *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) van der Aa]**. 2002. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

PATOLOGIA DE SEMENTES: **Alternaria**. Disponível em: <http://faem.ufpel.edu.br /dfs/ patologiasementes/cgibin/sementes/detalhes.cgi?praga=89>. Acesso em: 16 nov. 2004.

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

ROTEM, J. **The genus *Alternaria***: biology, epidemiology, and pathogenicity. St. Paul: APS Press, 1994. 326 p.

SIMMONS, E.G. Typification of Alternaria, Stemphyllium and Ulocladium. **Mycologia**, New York, v.59, p.67-92, 1967.

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

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

SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L.; RENAUD, M.S.A. 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, p.231, 2003. Resumo. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia.

SUZUKI, H. Temperature related to the spore germination and apressorium formation of rice blast fungus. **Plant Protection**, Kyushu, v.17, p. 6-9, 1969.

TIMMER, L.W. **Preharvest diseases of citrus in Florida**. Lake Alfred: University of Florida, Citrus Research and Education Center, [19__?]144 p.

TIMMER, L.W. Disease of fruit and foliage. In: TIMMER, L. W.; DUNCAN, L. W. (Ed.). **Citrus health management**. St. Paul: APS Press, 1999. p.107-115.

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

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

TIMMER, L.W.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T.R.; IBAÑEZ 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.

WHITESIDE, J.O. Alternaria brown spot of mandarins. In: WHITESIDE, J.O.; GARNEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. In: St. Paul: APS Press, 1993. p. 8.