



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DISSERTAÇÃO

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DA MANCHA MARROM
DE ALTERNARIA EM TANGERINEIRA ‘DANCY’**

MIRELLY MIGUEL PORCINO

AREIA-PB

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA EM TANGERINEIRA ‘DANCY’

MIRELLY MIGUEL PORCINO

Sob a Orientação da Professora
Luciana Cordeiro do Nascimento

Dissertação submetida como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Agronomia,
no Programa de Pós-Graduação em
Agronomia.

Areia-PB
Fevereiro de 2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

nbsp; Porcino, Mirelly Miguel.
Óleos Essenciais no Manejo da Mancha Marrom de
Alternaria em Tangerineira 'Dancy' / Mirelly Miguel
Porcino. - João Pessoa, 2019.
77 f.

Orientação: Luciana cordeiro do Nascimento.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA-Areia.

1. Alternaria alternata f. sp. citri; Citrus tangerin.
I. do Nascimento, Luciana cordeiro. II. Título.

UFPB/BC

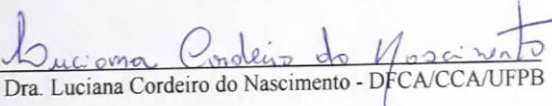
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICAÇÃO DE APROVAÇÃO

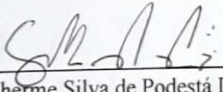
TÍTULO: ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DA MANCHA MARROM DE
ALTERNARIA EM TANGERINEIRA 'DANCY'

AUTOR: MIRELLY MIGUEL PORCINO

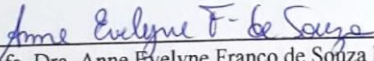
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRA em
Agronomia (Agricultura Tropical) pela comissão examinadora.



Profa. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento - DFCA/CCA/UFPB
(Orientadora)

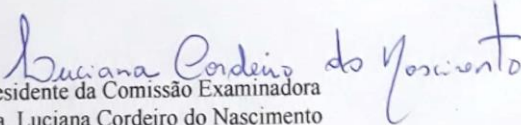


Prof. Dr. Guilherme Silva de Podestá DFCA/CCA/UFPB



Profa. Dra. Anne Evelyne Franco de Souza DCV/CCA/UFPB

Data da realização: 19 de fevereiro de 2018


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento
(Orientadora)

*Mesmo desacreditado e ignorado por todos,
não posso desistir, pois para mim,
vencer é nunca desistir.*

Albert Einstein

Ao meu pai Manoel Porcino da Silva Neto (in memoriam)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar o meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha orientadora Luciana Cordeiro do Nascimento que me concedeu a orientação necessária para a conclusão de mais essa etapa na minha vida acadêmica, pela disponibilidade, paciência e ensinamentos.

À minha Mãe, Maria Lúcia Miguel Porcino e a minha irmã Marily Miguel Porcino, pelo amor incondicional e apoio.

À minha amiga de infância, Joseneide Pereira, pelo apoio ao longo dos anos sempre me incentivando e pelo companheirismo.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado, Mileny Souza, Hilderlande Florêncio, Edcarlos Camilo, Robério de Oliveira, Edlânia Maria.

Aos amigos, Valdeir de Souza, Silvana Nunes, Jakeline Florencio, Maria Joelma, Ana Cecília Muniz, Camila Cordeiro, Wenia Figueiredo, Rommel Siqueira, pela ajuda na realização desse trabalho e pelo carinho.

Aos grandes amigos, Iolanda Costa, Heriverta Virginio, Roberto Pessoa, Wilza Carla, Paula Mikacia, Isack Pinto, Uanderson Alves, Ana Claudia Medeiros, pelo companheirismo.

Aos funcionários, Severino da Silva (Nino), José Tomáz de Aquino e Dona Francisca Souto, pelo apoio diário.

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia (LAFIT/UFPB), a vocês todo o meu carinho, por todos os momentos de aprendizado que a convivência nos proporcionou.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, por conceder-me a oportunidade do aperfeiçoamento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

MUITO OBRIGADA!

PORCINO, M. M. Óleos Essenciais no Manejo da Mancha Marrom de *Alternaria* em tangerineira ‘Dancy’. Areia-PB, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Fev. 2018, 77. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Orientadora: Profa. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento.

RESUMO GERAL

O Brasil é considerado o quinto maior produtor mundial de tangerinas, no entanto, sua produção vem diminuindo devido ao ataque de doenças, com destaque para a mancha marrom de alternaria, que tem como agente causal a *Alternaria alternata* Fr:Fr. Keissler f. sp. *citri* responsável por causar sérios problemas econômicos na cultura. No manejo da doença, são utilizados principalmente fungicidas sintéticos, porém o uso de produtos alternativos como os óleos essenciais tem se mostrado uma alternativa viável. Esse trabalho teve como objetivo determinar o efeito de diferentes óleos essenciais sobre *A. alternata* f. sp. *citri* *in vitro*, em frutos e mudas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka). Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia, de Biologia e Tecnologia pós-colheita e em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias, UFPB. Foram realizados dois experimentos: No primeiro experimento foram utilizados três isolados de *A. alternata* f. sp. *citri* (Massaranduba-Paraíba, Pratânia-São Paulo e Trás dos Montes-Portugal). Para verificar a eficiência dos tratamentos nos isolados *in vitro*, adicionaram-se os óleos essenciais de sementes de uva, girassol, eucalipto, gengibre, copaíba, menta, erva-doce, citronela, cravo e linhaça na concentração de 1% diluídos em meio de cultura BDA com pH 6,0. No centro das placas foi adicionado um disco de 5 mm de diâmetro da colônia fungíca pura, para o experimento *in vitro*. Os frutos foram tratados com os mesmo óleos essenciais utilizados no experimento *in vitro* diluídos em água destilada esterilizada, contando com o controle e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L), imersos nos tratamentos por 5 min. Os frutos foram aspergidos com a suspensão de esporos na concentração 10⁵ conídios/mL de *A. alternata* f. sp. *citri*. Foi avaliado índice de velocidade de crescimento micelial, diâmetro de colônia (durante sete dias), produção de conídios e dimensões de conídios, (*in vitro*); severidade da doença em frutos (segundo escala de nota específica) *in vivo*. As análises Físico-Químicas foram realizadas por cinco período, as avaliações de sólidos solúveis totais, acidez titulavel, relação sólidos solúveis totais e acidez titulavel, pH, firmeza, rendimento de suco, ácido ascórbico, totalizando cinco avaliações e perda de massa; e atividade enzimática (peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônio-liase) em frutos de tangerineira ‘Dancy’. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos, composto de quatro repetições de três placas (*in vitro*) e quatro repetições de três frutos (*in vivo*). De acordo com os resultados obtidos, os óleos essenciais de menta, eucalipto, erva-doce e citronela foram eficientes no controle *in vitro* do patógeno, inibindo totalmente o crescimento *in vitro* das colônias fungícas. O óleo de eucalipto foi eficiente no manejo de *A. alternata* f. sp. *citri* em frutos de tangerineira ‘Dancy’ em relação aos demais tratamentos. Os óleos essenciais não interferiram na qualidade pós-colheita de frutos de tangerineira ‘Dancy’. A atividade enzimática aumentou no segundo período de avaliação dos frutos. No segundo experimento foram utilizados dois isolados de *A. alternata* f. sp. *citri* dos municípios de Massaranduba-PB e Pratânia-SP. Foram utilizadas mudas de tangerineira ‘Dancy’, tratadas com óleos essenciais de gengibre, copaíba, menta, erva-doce e citronela na concentração de 1 %, acrescidos de Tween 80 e diluídos em água destilada

esterilizada, fungicida Tiabendazol (400 mL/100L) e ADE (sem tratamento), aspergidos até o ponto de escorrimento. Para a inoculação do patógeno a suspensão foi ajustada para 10^5 conídios/mL aspergida até o ponto de escorrimento. Os parâmetros avaliados foram severidade da doença e trocas gasosas em mudas de tangerineira ‘Dancy’. Os dados de severidade da doença e trocas gasosas foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, composto por sete tratamentos e quatro repetições de duas plantas. Os resultados mostraram que o óleo essencial de erva-doce foi eficiente no manejo de *A. alternata* f. sp. *citri* em mudas de tangerineira ‘Dancy’ e os óleos essenciais de citronela, copaíba e gengibre não afetaram negativamente as trocas gasosas nas mudas.

Palavras-chave: *Alternaria alternata* f. sp. *citri*; *Citrus tangerina*; controle alternativo

PORCINO, M. M. Essential oils in the management of *Alternaria* brown spot in 'Dancy' mandarin. Areia-PB, Center for Agrarian Sciences, Federal University of Paraíba, Feb. 2018, 77. Dissertation (Master's degree in Agronomy). Postgraduate Program in Agronomy. Advisor: Profa. Dr. Luciana Cordeiro do Nascimento.

GENERAL ABSTRACT

Brazil is considered the fifth highest producer of tangerines in the world. However, its production has been decreasing due to the attack of diseases, especially the brown spot of alternaria, which has as its causal agent the *Alternaria alternata* (Fr: Fr) Keissler f. sp. *Citri* that causes serious economic problems in the culture. In the management of, alternative products are used as the essential oils. This work aimed to determine the effect of different essential oils on *A. alternata* f. sp. *Citri in vitro*, in 'Dancy' tangerine (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka). The experiments were carried out at the Phytopathology, Biology and Post-Harvest Technology Labs and in a greenhouse at the Centro de Ciências Agrárias, UFPB. Two experiments were carried out: In the first experiment three isolates of *A. alternata* f. sp. *citri* (Massaranduba-Paraíba, Pratânia-São Paulo e Trás dos Montes-Portugal) were used. To verify the effect of the treatments on the isolates cultivated in vitro, the essential oils of grape seeds, sunflower, eucalyptus, ginger, copaiba, mint, fennel, citronella, cloves and flax seeds were added at a concentration of 1% diluted in BDA media culture with pH 6.0. In the plates center were putted a 5 mm diameter disk of the fungus colony for the *in vitro* experiment. The fruits were treated with the same essential oils used in vitro experiment, diluted in sterile distilled water and additional controls composed by Thiabendazole (400 mL / 100L) and ADE (untreated), immersed in the treatments for 5 min. The fruits were sprayed with the spore suspension at the concentration of 10^5 conidia / mL of *A. alternata* f. sp. *citri*. Mycelial growth rate index, colony diameter (for seven days), conidia and conidial size (*in vitro*) were evaluated; severity of disease in fruits (by scale of specific note) in vivo. The physical-chemical analyzes were composed by total soluble solids, titratable acidity, total soluble solids ratio and titratable acidity, pH, firmness, juice yield, ascorbic acid, totaling five evaluations and loss of mass and, enzymatic activity (peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonium lyase) in 'Dancy' tangerine fruits. The design was completely randomized with 12 treatments, consisting of four replicates of three plates (*in vitro*) and four replicates of three fruits (*in vivo*). According to the results, the essential oils of mint, eucalyptus, fennel and citronella were efficient in the in vitro control of the pathogen, totally inhibiting the fungus colonies growth. Eucalyptus oil was efficient in the management of *A. alternata* f. sp. *citri* in 'Dancy' in tangerine fruits compared with other treatments. The essential oils did not interfere on post-harvest quality of 'Dancy' tangerine. The enzymatic activity in fruits increased in the second evaluation period. In the second experiment, two isolates of *A. alternata* f. sp. *Citri* (Massaranduba-PB and Pratânia-SP). Tangerine 'Dancy' seedlings were treated with essential oils of ginger, copaiba, mint, fennel and citronella at a concentration of 1% added Tween 80 and ADE, fungicide Thiabendazole (400 mL / 100L) and ADE (untreated), sprayed to the point of drainage. For pathogen inoculation, the suspension was adjusted to 10^5 conidia/mL sprinkled to the point of drainage. The parameters evaluated were disease severity and gas exchange in 'Dancy' mandarin seedlings. Disease severity and gas exchange data were analyzed in a

completely randomized design, consisting of seven treatments and four replicates of two plants. The results showed that the essential oil of fennel was efficient in the management of *A. alternata* f. sp. *citri* in 'Dancy' tangerine seedlings and the essential oils of citronella, copaiba and ginger do not negatively affect the gas exchange on seedlings.

Keywords: *Alternaria alternata* f. sp. *citri*; *Citrus tangerina*; alternative control

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II: Manejo de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em tangerina ‘Dancy’ utilizando óleos essenciais

Figura 1. Escala diagramática descrita por Renaud et al. (2004) para avaliação da mancha marrom de alternária (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*). UFPB, Areia-PB, 2018.....37

Figura 2. Índice de Velocidade de Crescimento micelial (IVCM) dos isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. Isolados: I8-Paraíba, I28-São Paulo e I30-Portugal. Tratamentos: TES-Testemunha, Óleos de SUV- Sementes de Uva, CRA- Cravo, EUC- Eucalipto, LIN- Linhaça, GEG- Gengibre, CIT- Citronela, COP- Copaíba, EDC-Erva-Doce, MEN- Menta, diluídos à 1% em ADE, FUN- Fungicida Tiabendazol (400 mL/100L), Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....40

Figura 3. Diâmetro das colônias dos isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. Isolados: I8-Paraíba, I28-São Paulo e I30-Portugal. Tratamentos: TES-Testemunha, Óleos de SUV- Sementes de Uva, CRA- Cravo, EUC- Eucalipto, LIN- Linhaça, GEG- Gengibre, CIT- Citronela, COP- Copaíba, EDC-Erva-doce, MEN- Menta, diluídos à 1% em ADE, FUN- Fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....41

Figura 4. Produção de conídios dos isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. Isolados: I8-Paraíba, I28-São Paulo e I30-Portugal. Tratamentos: TES-Testemunha, Óleos de SUV- Sementes de Uva, CRA- Cravo, EUC- Eucalipto, LIN- Linhaça, GEG- Gengibre, CIT- Citronela, COP- Copaíba, EDC- Erva-doce, MEN- Menta, diluídos à 1% em ADE, FUN- Fungicida Tiabendazol (400 mL/100L), Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....43

Figura 5. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e porcentagem de proteção (%) em frutas de tangerineira cv ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) submetidos aos tratamentos* com óleos essenciais. Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....44

CAPÍTULO III: Trocas gasosas e severidade da Mancha Marrom de Alternária em mudas de tangerineira ‘Dancy’

Figura 1. Severidade da mancha marrom de Alternária causada por <i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>citri</i> (MARTELLI, 2011).....	66
Figura 2. Severidade da mancha marrom de alternária (<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>citri</i>) em folhas de tangerineira cv 'Dancy' (<i>Citrus tangerina</i>). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....	68
Figura 3. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e porcentagem de proteção (%) em mudas de tangerineira 'Dancy' submetidos aos tratamentos com óleos essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....	69
Figura 4. Trocas gasosas* em de tangerineira 'Dancy' (<i>Citrus tangerina</i> Hort. ex Tanaka) submetidos a tratamentos** com essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....	71
Figura 5. Análises de fluorescência em plantas de tangerineira 'Dancy' (<i>Citrus tangerina</i> Hort. Ex Tanaka) submetidos a tratamentos com óleos essenciais de GEN-gengibre, COP-copaíba, MEN- menta, VER- erva-doce, CIT- citronela, (1%), TEST-testemunha, FUN- fungicida Tiabendazol (400 mL/100L) e TDI- testemunha 2. Areia, Paraíba,UFPB,2018.....	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II: Manejo de *Alternaria alternata* f. sp. citri em tangerina ‘Dancy’ utilizando óleos essenciais

Tabela 1. Teores de sólidos solúveis (Brix), acidez titulável e relação sólidos solúveis totais e acidez titulável/g/L (SS/AT) em frutos de tangerina ‘Dancy’ tratados com óleos essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....47

Tabela 2. Firmeza (N), potencial hidrogeniônico (pH), rendimento de suco e ácido ascórbico em frutos de tangerina ‘Dancy’ tratados com óleos essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....50

Tabela 3. Perda de massa fresca (PMF) de frutos de tangerina ‘Dancy’ tratados com óleos essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.....52

Tabela 4. Atividade das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (FAL) em frutos de tangerina ‘Dancy’ tratados com óleos essenciais (1%) e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L), em diferentes períodos. UFPB, Areia-PB, 2018.....54

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	13
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. OBJETIVO.....	15
2.1. Geral	15
2.2. Específicos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1. Citricultura brasileira	15
3.2. Mancha Marrom de Alternária <i>A. alternata</i> (Fr:Fr) Keissler f. sp. <i>citri</i>	17
3.3. Óleos essenciais (EOs) no controle alternativo de doenças de plantas	19
3.4. Indução de resistência em plantas a patógenos	20
3.5. Trocas gasosas.....	22
4. REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO II.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. Local do experimento	34
2.2. Caracterização morfológica dos isolados in vitro	34
2.3. Inoculação de <i>A. alternata</i> f. sp. <i>citri</i> em frutos de tangerineira ‘Dancy’	35
2.4. Análises Físico-Químicas	37
2.5. Análises enzimáticas.....	38
2.6. Análise estatística	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4. CONCLUSÃO.....	55
5. REFERÊNCIAS.....	55
CAPÍTULO III.....	61
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1. Local e material do experimento	64
2.2. Aplicação dos tratamentos nas mudas de tangerineira ‘Dancy’ e Inoculação de <i>A.alternata</i> f. sp. <i>citri</i>	64
2.2.1. Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD).....	65

2.3. Trocas gasosas em mudas de tangerineira ‘Dancy’	66
2.4. Análise Estatística.....	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4. CONCLUSÃO	72
5. REFERÊNCIAS	72

CAPÍTULO I

ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO DE MANCHA MARROM DE ALTERNARIA EM TANGERINEIRA 'DANCY'

1. INTRODUÇÃO GERAL

A citricultura brasileira representa na estrutura socioeconômica um importante segmento, considerada uma das mais importantes atividades agroindustriais. O país é considerado o quinto maior produtor mundial de tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), segundo dados publicados em 2017 pela FAO, com 955 mil toneladas em 2016, distribuídas em 49,8 mil hectares, localizadas principalmente, nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste (FAO, 2017).

Os citricultores têm enfrentando sérios problemas na produção de citros. Merece destaque os problemas fitossanitários, com doenças que causam grandes prejuízos econômicos e sociais. A mancha marrom de alternária (MMA) causada pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, provoca lesões de cloração marrom preta em ramos, frutos e folhas, as quais se tornam circundadas por halos amarelos, que se expandem, formando áreas necrosadas circulares ou irregulares, evoluindo para a desfolhação ediminuindo a produtividade (BASTIANEL et al., 2014), sendo uma das principais doenças que acometem a cultura.

A principal estratégia de manejo para MMA utilizado pelos citricultores no Brasil é por meio de produtos químicos. O controle químico ainda é considerado o mais economicamente viável. No entanto, o uso excessivo oferece múltiplos riscos à saúde humana e ao equilíbrio sustentável do meio ambiente o que acarreta altas taxas residuais desses produtos, além de ocasionar a resistência de patógenos a esses produtos, promovendo a redução de 13% da área plantada de citros no Brasil nos últimos anos (AGRIANUAL, 2014; NOGUEIRA et al., 2014).

Nesse contexto, tem se buscado alternativas no manejo de doenças de plantas, visando reduzir os impactos causados pela aplicação de produtos químicos. O uso de óleos essenciais, que apresentam na sua composição substâncias com ação fungitóxica direta, ou capacidade de indução de fitoalexinas, tem se mostrado uma alternativa promissora, com pesquisas que confirmam a sua eficácia no manejo de fitopatógenos (NASCIMENTO et al., 2013; SOUZA et al., 2015; SALES et al., 2016).

Dessa forma, os óleos essenciais surgem como alternativa viável para os fungicidas com capacidade de controlar fitopatógenos, e possível utilização com segurança na agricultura orgânica, além de contribuir no desenvolvimento futuro de novos produtos (PERINI et al., 2013; FONSECA et al., 2015).

2. OBJETIVO

2.1. GERAL

Determinar o efeito de óleos essenciais sobre aspectos morfofisiológicos de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* bem como, sua eficiência no manejo da mancha marrom de alternária em frutos e em mudas de tangerineira ‘Dancy’, além de determinar seu efeito sobre trocas gasosas em mudas inoculadas.

2.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a eficiência de óleos essenciais sobre o crescimento micelial e esporulação in vitro de *A. alternata* f. sp. *citri* provenientes de diversas regiões produtoras de tangerineira ‘Dancy’;
- ✓ Avaliar o potencial de óleos essenciais como indutores em respostas de defesa em frutos de tangerineira ‘Dancy’ no manejo da mancha marrom de alternária e manutenção da qualidade pós-colheita;
- ✓ Definir o potencial de óleos essenciais, como indutores em respostas de defesa em mudas de tangerineira ‘Dancy’ tratadas no manejo da mancha marrom de alternária;
- ✓ Avaliar respostas fisiológicas de mudas de tangerineira ‘Dancy’ submetidas a inoculação por *A. alternata* f. sp. *citri*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Citricultura brasileira

O Brasil é o maior produtor de laranja e exportador de suco concentrado do mundo possuindo aproximadamente 165 milhões de árvores produtivas (FAO, 2014). Dessa forma a citricultura brasileira tem contribuído no desenvolvimento socioeconômico nacional, elevando assim a balança comercial e, sobretudo, com a geração de empregos nas áreas de produção (IBGE, 2016).

As tangerinas ocupam o segundo lugar na produção de citros, dentro do cenário da citricultura mundial. O Brasil possui área cultivada superior a 50 mil hectares e

produção de aproximadamente 950 mil toneladas por ano (FAO, 2015). O cultivo nacional de tangerineira e seus híbridos cresceram, e o Brasil ocupa a quinta posição na produção mundial, atrás da China, Espanha e Turquia (FAOSTAT, 2017), com aproximadamente 52 mil hectares plantados e produção de aproximadamente um milhão de toneladas, onde as regiões Sudeste e Sul são responsáveis por 86% da produção brasileira (FAO, 2015; IBGE, 2015).

Na produção nacional, destacam-se as variedades de tangerineira Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), o tangor Murcott [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck], e ‘Dancy’ (*C. tangerina* hort. ex Tanaka) representando mais de 80% da área plantada. Essas variedades se adaptam às condições climáticas do Brasil, apresentam frutos de boa qualidade e de maturação um pouco mais tardia, além de conter grande quantidade de fibras, de sais minerais como magnésio, potássio, cálcio e fósforo (PACHECO, 2015).

O grupo das tangerineiras e seus híbridos é bastante diversificado, sendo subdividido conforme as espécies (KOLLER, 1994). A tangerineira ‘Dancy’ originária da Flórida, EUA, é uma planta que apresenta porte alto, copa com crescimento ereto, tamanho de fruto médio, forma achatada e sabor doce, com 16 sementes em média. Sua casca é lisa e semiaderente (fácil de descascar), de cor alaranjada-intenso, uniforme, polpa alaranjada e maturação meia-estação tardia (BASTOS, 2014).

Na região Nordeste, a maior produção de tangerineiras se concentra nos Estados da Bahia, Sergipe e Paraíba. No estado da Paraíba os municípios produtores estão localizados na região metropolitana da Borborema e no Brejo, com destaque para o município de Matinhas com 4.500 toneladas, Alagoa Nova com 4.080 toneladas e Lagoa Seca com 1.820 toneladas na safra de 2016 (IBGE, 2016).

As tangerinas apresentam elevado valor nutricional e refrescante, são ricas em vitaminas, principalmente C e do complexo B, minerais, pectina e fibras que são de fácil absorção e auxiliam no funcionamento intestinal, além de apresentar baixíssimo valor calórico. Além disso, as cascas do fruto, ainda são utilizadas na produção de cosméticos, remédios e produção de óleos essenciais (BASTIANEL et al., 2014).

Mesmo com o constante crescimento desse setor, as doenças constituem hoje um dos principais problemas fitossanitários na cultura e possivelmente contribuiu para a erradicação de aproximadamente 40 milhões de árvores nos últimos anos (BASTIANEL et al., 2014). Assim, as doenças colaboram, em grande escala, para que a produção de frutas cítricas de boa qualidade seja um desafio para o agricultor brasileiro,

principalmente para àqueles que se localizam em áreas com condições climáticas que favorecem a ocorrência de certas doenças (BASSANEZI et al., 2014).

3.2. Mancha Marrom de Alternária *A. alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. citri

O gênero *Alternaria* spp. é amplamente disseminado no ambiente (vento, água, solo, sementes e produtos agrícolas), abrangendo numerosas espécies saprófitas, endofíticas e patogênicas, causando deterioração pré e pós-colheita de cereais, frutas e vegetais (GARGANESE et al., 2016). A mancha marrom de alternaria (MMA) tem como agente etiológico *Alternaria alternata* f. sp. *citri* seu primeiro relato foi em mandarina (*Citrus reticulata*) ‘Emperor’ na Austrália, em 1903 (KIELY, 1964), mais tarde se espalhando para várias regiões do mundo (TIMMER et al., 2003).

No Brasil, a MMA foi relatada pela primeira vez em 2001 (COLTURATO et al., 2009) no Rio de Janeiro e vem ganhando grande expressão devido aos danos provocados no cultivo de tangerineiras. Após 2003, esta doença ganhou espaço, causando grandes prejuízos aos citricultores dos estados de São Paulo e Minas Gerais. No estado da Paraíba, apenas em 2009, foi detectada a doença, se constituindo em fator limitante à produção de tangerinas (LOPES et al., 2009). O Brasil reduziu em cerca de 14 mil hectares de área colhida entre 2003 à 2013 (IBGE, 2014).

A MMA é uma doença extremamente destrutiva de tangerinas, tangelos e tangores (AKIMITSU et al., 2003). A *A. alternata* f. sp. *citri*, patótipo tangerina, produz uma toxina seletiva ao hospedeiro, cuja suscetibilidade está restrita às tangerinas, pomelos (*C. paradisi* Macf), tangores (híbridos de laranja x tangerina) e alguns de seus híbridos. Essa toxina é responsável pela morte celular vegetal, permitindo assim a infecção e a colonização dos tecidos pelo fungo, apresentando papel essencial na evolução dos sintomas e na ocorrência da doença na planta hospedeira (SPÓSITO et al., 2007). Os sintomas causados pela toxina caracterizam-se por lesões necróticas em ramos, frutos, tecidos verdes imaturos ou em fase de crescimento (COLTURATO et al., 2009).

O patógeno *A. alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri* produz conídios com formas e tamanhos variáveis (20-63 μm de comprimento x 9-18 μm de largura), a coloração varia de oliva a marrom-escuro, apresentando de 4 a 6 septos transversais e 1 ou mais septos longitudinais (ELLIS, 1993). É um fungo saprófito facultativo, desenvolvendo-se

em tecidos cítricos mortos ou em outros substratos, produzindo grande quantidade de conídios assexuais (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003).

Os conídios dispõem de uma parede espessa, resistente ao ressecamento e outras condições desfavoráveis (SPÓSITO et al. 2003), são facilmente disseminados pelo vento, pela ação da chuva ou do molhamento dos tecidos por orvalho até a superfície de frutos, folhas e outros órgãos suscetíveis. Sua liberação está relacionada com a ocorrência de condições ideais para a infecção do patógeno, que ocorre com temperaturas em torno de 20 a 27°C e 10 a 12 horas de molhamento foliar contínuo, aparecendo os sintomas de um a dois dias após a infecção (TIMMER et al., 2000).

O fungo causa lesões em folhas jovens, frutos e ramos. O período de suscetibilidade varia de acordo com o tecido. Em folhas, o tecido fica suscetível até a folha atingir sua expansão máxima. Após a infecção, os sintomas são observados em 48 horas na forma de pequenas manchas necróticas, marrons a negras, circundadas por um halo amarelado. Essas lesões se expandem, tomando um tamanho variável, capaz de ocupar grandes áreas da superfície foliar e atingir as nervuras (TIMMER et al., 2003).

Nos ramos jovens, os sintomas são semelhantes às folhas, com lesões de 1 a 10 mm de diâmetro. Nos frutos, o período de maior suscetibilidade é até quatro meses após a florada. A infecção pode ocorrer desde a queda das pétalas até o seu desenvolvimento. O tamanho das lesões varia conforme a idade do fruto, se apresentando como manchas necróticas escuras. Em alguns casos, podem ser observadas lesões cujo centro torna-se corticoso e saliente, formando uma pústula (GARGANESE et al., 2016).

De acordo com a intensidade da doença, as lesões podem acarretar em desfolha, morte de ramos e queda prematura de frutos. Os frutos que se mantêm fixos à planta, porém perdem seu valor de mercado *in natura* devido às lesões causadas pelo fungo (SPÓSITO et al., 2003). Portanto, em condições ambientais adequadas para o patógeno, podem ocorrer perdas expressivas em termos de rendimento e comercialização de frutos de cultivares suscetíveis (CAMARGOS et al., 2016).

No cenário nacional a espécie *A. alternata* f. sp. *citri* caracteriza-se principalmente por causar doença em tangerinas, pomelos, tangores e na maioria de seus híbridos (PACHECO et al., 2012), provocando o aumento no custo de produção, devido ao elevado número de aplicações de fungicidas químicos, sendo necessária a busca incessante de novas formas de controle, de baixo impacto ambiental e eficiente (BASTIANEL et al., 2014).

3.3. Óleos essenciais (EOs) no controle alternativo de doenças de plantas

Na agricultura atual propõe-se associar o manejo integrado de doenças, de maneira que atendam modelos ecologicamente corretos, além de procedimentos de acordo com as normas técnicas. Manejo este que reflete na redução significativa do uso de agrotóxicos, contribuindo para a proteção ambiental e diminuição dos custos de produção, sem afetar a produtividade e qualidade dos frutos (BELAN et al., 2013).

Recentemente estudos acerca de substâncias bioativas extraídas de plantas medicinais e nativas têm se expandido na agricultura, buscando o manejo sustentável de doenças em plantas. As plantas já apresentam mecanismos de defesa que podem ser ativadas a partir de indutores, que visam estimular a produção de fitoalexinas, substâncias envolvidas na defesa natural das plantas (MÉLO-FILHO; GUENTHER, 2015; CARDOSO et al., 2017).

Pesquisas têm comprovado a eficiência de óleos essenciais no controle de fitopatógenos. O efeito dos óleos essenciais de Citronela e Menta sob diferentes concentrações inibiram em 100% o crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*, em teste *in vitro* (PEIXINHO et al., 2017). Venturoso et al. (2011), observaram que os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cravo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e menta (*Mentha arvensis*) são eficientes no controle de *Alternaria solani*, agente causal da pinta-preta do tomateiro, em condições *in vitro* e em campo.

A utilização de óleos essenciais para o controle de fitopatógenos surge como uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente, com intuito de encontrar substâncias ativas contra fitopatógenos, isolar e identificar as substâncias responsáveis pelo controle, além de especificar e esclarecer o modo de ação envolvido no controle do patógeno (SILVA et al., 2017). Em trabalhos realizados por Lucas et al. (2012), demonstram alterações no citoplasma e danos na parede celular de bactérias, causado pelo óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

A ativação do metabolismo secundário ou indução de resistência em plantas contra patógenos representa um método alternativo no controle de doenças, que estão presentes na planta na forma latente. Os OEs são compostos secundários obtidos de plantas, utilizados principalmente no controle da deterioração pós-colheita, como foi comprovado em trabalhos realizados por Andrade e Vieira (2016), onde se observou

que os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*), reduziram o desenvolvimento fúngico. Além disso, foi observado que o óleo essencial de menta inibiu completamente o crescimento micelial por completo de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamoeiro (*Carica papaya*).

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis produzidos por organismos vivos e isolados por meios físicos (pressão e destilação) que pode ser da planta inteira ou parte da planta de origem taxonômica conhecida (FRANZ; NOVAK, 2010). Grande quantidade e diversidade de EOs são encontradas, em folhas de hortelã (*Mentha rotundifolia*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*); nas raízes, de calamus (*Acorus calamos*) e valeriana (*Valeriana officinalis*); na casca da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e, em flores como o jasmim (*Jasminum officinale*) e rosa (*Rosa* sp.). Também podem ser encontradas na casca de várias espécies de plantas, como limão (*Citrus aurantifolia*), tangerina (*C. tangerina*) e, em alguns frutos como o de anis (*Pimpinella anisum*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*) e erva-doce (*Foeniculum vulgare*) (RAMOS et al., 2010).

Os compostos fenólicos presentes na composição dos OEs são os principais responsáveis pela sua atividade antimicrobiana. A atividade fungicida causada pela aplicação dos óleos essenciais foi revelada em uma ampla gama de fungos pós-colheita, incluindo *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* sp. e várias espécies de *Penicillium* spp. entre outros podem ser efetivamente controlados com o uso de EOs (KUMAR et al., 2008; BOSQUEZ-MOLINA et al., 2010; DAFEREA et al., 2013; STEVIC et al., 2014). Em testes *in vitro*, os óleos essenciais de menta e alecrim inibiram o crescimento micelial e a produção de esporos de *C. gloeosporioides* (PHILLIPS et al., 2012; PEKMEZOVIC et al., 2015).

3.4. Indução de resistência em plantas a patógenos

A indução de resistência de plantas a patógenos é uma das alternativas utilizadas para contornar o problema que a agricultura atual vem enfrentando devido à alta ocorrência de doenças. Esse processo de indução envolve a ativação de mecanismos de resistência em latência, através de tratamentos com agentes eliciadores, que agem ativando diversos mecanismos de defesa vegetal, impedindo ou atrasando a entrada do patógeno, reduzindo assim a ação do patógeno sobre a planta hospedeira (SALES, 2016; BRITO et al., 2015; SOUZA et al., 2015).

Tais compostos são considerados como metabólitos secundários, compondo os produtos finais do metabolismo, por apresentarem características relevantes para as plantas que o sintetizam (PAES et al., 2013; SAROJ et al., 2015). O metabolismo secundário é composto por mecanismos de defesa bioquímicos pós-formados, isso implica dizer que a planta estabelecerá sua defesa exclusivamente após o ataque do patógeno (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Os mecanismos de resistência induzida podem ser ativados através de respostas bioquímicas, resultando em mudanças na atividade de enzimas ligadas a patogênese, como por exemplo, a peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase, onde acionam rotas de defesa possíveis de retardar ou eliminar a ação do patógeno (SAROJ et al., 2015).

A enzima peroxidase (POX), atua em vários processos fisiológicos essenciais a planta, ou seja, catalisa a oxirredução entre peróxido de hidrogênio e vários redutores, originando lignina e conferindo maior rigidez a parede celular. Essa enzima tanto pode atuar na defesa direta de plantas a patógenos, como também nas rotas de sinalização relacionadas a vários processos fisiológicos (PINTO et al., 2011). A peroxidase é uma das enzimas mais estudadas no processo de defesa, devido sua ação estar diretamente ligada à redução da severidade de doenças (KUHN, 2007).

A fenilalanina amônia-liase (PAL) é a principal enzima envolvida em todas as vias de síntese de compostos fenólicos, os quais estão relacionados com resistência a patógenos. Essa enzima é responsável por uma série de reações metabólicas, que resultam na formação de ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeco, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, certos pigmentos (flavonóides), produzem compostos que absorvem radiação UV e ligninas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Sua atividade aumenta em relação às respostas aos estresses bióticos e abióticos (KUHN, 2007; BORSATTI, 2014).

As enzimas polifenoloxidases (PFOs) também estão envolvidas na rota dos fenilpropanóides (TAIZ, 2017), compondo o grupo de enzimas oxidoredutases que oxidam fenóis a o-quinonas na presença de oxigênio molecular. A enzima polifenoloxidase aumenta sua concentração em tecidos atacados por patógenos. No local da lesão, as POF causam deteriorações oxidativas de compostos fenólicos resultando no escurecimento do local da lesão proveniente da polimerização oxidativa das quinonas.

As PFO são ativadas após a ocorrência da lesão pelo patógeno, onde iniciam o processo de oxidação de compostos fenólicos que apresentam atividade antimicrobiana. Além disso, as polifenoloxidasas participam diretamente da fotossíntese, onde duas quinonas (Plastoquinonas A e B) são fundamentais no transporte de elétrons no fotossistema II (TAIZ, 2017; PINTO et al., 2011; ALVARENGA et al., 2013).

Face ao exposto, é evidente a importância dos estudos sobre enzimas relacionadas à patogênese que permitam maior compreensão dos mecanismos de defesa vegetal. Considera-se que a planta ao sofrer um estresse causado por patógenos tende a aumentar sua atividade enzimática em relação aos tecidos não infectados (BORSATTI, 2014).

3.5. Trocas gasosas

Estudos das interações causadas pelo ataque de patógenos e ação de produtos naturais são de fundamental importância, sobre os mecanismos fisiológicos das plantas. Os patógenos atuam de maneira específica interferindo no funcionamento normal da planta dependendo do local de ataque, podendo variar de acordo com a severidade e a duração do estresse, os efeitos ainda podem se agravar em função da fase fenológica da planta (SOARES et al., 2015).

Nesse sentido, são vários os parâmetros fisiológicos que podem ser empregados na avaliação do estresse das plantas ao ataque de patógenos, por estarem relacionados aos mecanismos fisiológicos dos vegetais, os quais refletem ajustes de adaptação e de produção da cultura (GARCÍA-TEJERO et al., 2010; SOARES et al., 2015).

A taxa fotossintética das plantas é responsável pela acumulação direta de matéria seca do vegetal. Assim, os estudos de comparação em plantas, sob condições normais e sob ataque de pragas, admitem grande efeito, sob a respiração vegetal. Sabe-se que a transpiração é imprescindível ao crescimento e desenvolvimento da planta, pois nessa fase também ocorre a assimilação de CO₂. Além de que, a transpiração atua como mecanismo do resfriamento, diminuindo o calor absorvido pela radiação solar (PINTO et al., 2014).

A redução da área foliar causa efeitos diretos na capacidade fotossintética das plantas, afetando as reações bioquímicas e o funcionamento do mecanismo fotossintético devido ao fechamento estomático (TEIXEIRA FILHO, 2012). Estudos

relatam que a diminuição da abertura estomática se comporta como uma das respostas diretas ao estresse biótico e abiótico (LIMA et al., 2010; WARREN et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2013), como forma de diminuir a perda de água e possível morte por dessecação (SOARES et al., 2015).

Os patógenos foliares são responsáveis por causarem manchas e conseqüentemente reduzem a área foliar sadia e fotossintetizante, além de reduzir a radiação solar interceptada e a eficiência no uso da radiação interceptada (FERREIRA, 2012). Segundo Xavier et al. (2015), a severidade de manchas foliares nem sempre indica de forma correta o efeito da doença na atividade fotossintética da folha, podendo o decréscimo na atividade fotossintética ser menor, maior ou igual que a severidade da doença. A intensidade dos sintomas pode reduzir em até 50% os processos fisiológicos, além da interferência nas reações bioquímicas da planta (MACHADO et al., 2006).

De maneira geral, em plantas cítricas, o potencial de água de folha, a assimilação de CO₂, a transpiração e a condutância estomática diminuem em função dos sintomas de doenças (RIBEIRO et al., 2006). Essa diminuição da fotossíntese pode ser atribuída à diminuição na condutividade hidráulica nos vasos condutores, ocasionado pela morte da célula vegetal no local devido a colonização do patógeno e conseqüente fechamento estomático. Dessa forma, o estudo das trocas gasosas permite uma melhor compreensão das mudanças fisiológicas e metabólicas após o processo infeccioso de fitopatógenos, que limitam o crescimento de plantas (SILVA et al., 2018).

4. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p. 255-268, 2014.

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento** - MAPA. Disponível em: <http://http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. 2015
Acesso em: 30 Novembro 2017.

AKIMITSU, K., PEEVER, T. L., TIMMER, L., W. Abordagens moleculares, ecológicas e evolutivas para a compreensão das doenças da *Alternaria* de cítricos. *Patologia das Plantas Moleculares*. **Pmid**, v. 4, p. 435-446. 2003.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 16, n. 3, p. 273-85, 2013.

ALVARENGA, T. C.; NETO, H. F. S.; OGASSAVARA, F. O.; ARANTES, F. C.; MARQUES, M. O.; FRIGIERI, M. C. Polifenoloxidase: uma enzima intrigante. **Ciência & Tecnologia**, v. 3, p. 83-93, 2013.

BASSANEZI, R. B.; Ayres, A. J.; MASSARI, C. A.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BARBOSA, J. C. Progresso e distribuição espacial das principais pragas dos citros. In: Daniel Junior de Andrade; Marcelo da Costa Ferreira; Nilza Maria Martinelli. (Org.). Aspectos da Fitossanidade em Citros. 1ed. Jaboticabal: **Cultura Acadêmica**, v.1, p. 31-50, 2014.

BASTIANEL, M.; SIMONETTI, L. M.; Evandro Henrique SCHINOR, E. H.; GIORGI, R. O.; NEGRI, J. D.; GOMES, D. N.; AZEVEDO, F. A. Avaliação do banco de germoplasma de mexericas com relação às características físico-químicas e suscetibilidade à mancha marrom de alternaria. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 1, p.23-31, 2014.

BELAN, L. L.; PEREIRA, A. J.; OLIVEIRA, M. J. V.; BARBOSA, D. H. S. G.; DE JESUS JUNIOR, W. C.; ALVES, F. R. Manejo alternativo do oídio na cultura do pepino em ambiente protegido. **Revista Academica de Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 11, Supl. 2, p. 103-112, 2013.

BORSATTI, F. C. Ácido salicílico na qualidade póscolheita de frutos, hortaliças folhosas e flores. 81 f. Dissertação (Mestrado Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

BOSQUEZ-MOLINA, E.; RONQUILLO-DE JESÚS, E.; BAUTISTA-BANOS, S.; VERDE-CALVO, J.R.; MORALES-LOPEZ, J. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored *papaya* fruit and their possible application in coatings. **Postharvest Biologica e Tecnonologia** n. 57, p. 132-137, 2010.

BRITO, N. M; NASCIMENTO, L. C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer *in vitro*. **Revista brasileira de plantas medicinais** [online]. n. 17, ed. 2, p. 230-238, 2015.

CAMARGOS, R. B.; PERINA, F. J.; CARVALHO, D. D. C.; ALVES, E.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; OLIVEIRA, D. F. Chalcones to control *Alternaria alternata* in murcott tangor fruits. **Biosciencia Jornal**, Uberlândia, v. 32, n. 6, p. 1512-1521, 2016.

CARDOSO, M. R.; LOPES, A. P. M.; MIAMOTO, A.; PUERARI, H. H.; ARIEIRA, C. R. D. Indutores de resistência e estimuladores de crescimento vegetal no controle do nematoide das galhas em soja. **Rev. Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, v. 12, n. 1, p.45-51, 2017.

COLTURATO, A.B. Efeito do meio de cultura, temperatura, fotoperíodo e fungicidas no crescimento micelial e no controle de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, causador da

mancha marrom do tangor murcote. 53F. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências agrônômicas, São Paulo-SP. 2009.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal Agriculture Food Chemical**n. 48, p. 2576-2581, 2013.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Oxon: CAB International, 1993.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anco>>. Acesso em: 23 Dez. 2017.

FERREIRA FILHO, A. S. Caracterização morfológica e enzimática de isolados de *Corynespora cassiicola* e reação de cultivares de soja à mancha-alvo. 84 p. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 2012.

FONSECA, M. C. M.; LEHNER, M. S.; GONÇALVES, M. G.; PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, A. F.; BONFIM, F. P. G.; PRADO, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, v.17, n.1, p.45-50, 2015.

FRANZ, C.; NOVAK, J.; BASSOLÉ, I. H. N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; TIROGO, S.; NEBIÉ, R. C.; DICKO, M. H. Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. **Molecules**, n.15, p. 7825-7839, 2010.

GARCIA, D. B.; RAVANELI, G. C.; MADALENO, L. L.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Damages of spittlebug on sugarcane quality and fermentation process. **Scientia agrícola**, Piracicaba. v. 67, n. 5, p. 555-561, 2010.

GARGANESE, F.; SCHENA, L.; SICILIANO, I.; PRIGIGALLO, M. I.; SPADARO, D.; GRASSI, A.; IPPOLITO, A.; SANZANI, S. M. Characterization of Citrus-Associated *Alternaria* Species in Mediterranean Areas. **Plos one**: Italy, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam>>. Acesso em 01 de agosto de 2017.

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

KOLLER, O.C. **Citricultura**: laranja, limão e tangerina. Porto Alegre: Editora Rígel, p.446,1994.

KUMAR R.; DUBEY, N. K.; TIWARI, O. P.; TRIPATHI, Y.B.; SINHA, K.K. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored food commodities from infestation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 87, p. 1737–1742, 2008.

KUHN, A. L. I. C.; PORTIS JÚNIOR, A. R. *Arabidopsis thaliana* expressing a thermostable chimeric Rubisco activase exhibits enhanced growth and higher rates of photosynthesis at moderately high temperatures. **Photosynthesis Research**, v.100, p.143-153, 2007.

LIMA, C. B.; RENTSCHLER, L. L. A.; BUENO, J. T.; AC BOAVENTURA, A. C. Plant extracts and essential oils on the control of *Alternaria alternata*, *Alternariadauciand* on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 5, p.764-770, 2010.

LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e Curcumina - I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 310-314. 2009.

MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; RIBEIRO, R. V.; MEDINA, C. L.; STUCHI, E.S.; MARIN, F. R.; SILVA, J. A. B.; SILVA, S. R. Fluxo de seiva e fotossíntese em laranjeira ‘Natal’ com clorose variegada dos citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 911-918, 2006.

MÉLO-FILHO, L. R.; GUENTHER, M. A resistência sistêmica induzida como alternativa sustentável ao uso de agrotóxicos/induced systemic resistance as a sustainable alternative to agricultural pesticides. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, 8, 27, 2015.

NASCIMENTO, L. C., SILVA, H., PINTO, K., ARAÚJO, A. 14431-Efeitos de Extratos Vegetais Sobre a Germinação e Esporulação de *Fusarium gutiforme*. **Cadernos de Agroecologia**, 8, 2, 2013.

NOGUEIRA, S. R., LIMA, F.S., ROCHA, E. M., ARAÚJO, D. H. Fungicidas no controle de fusariose do abacaxi no estado de Tocantins, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 447-455, 2014.

PACHECO, C. A. Aspectos histológicos, físico-químicos, sensoriais e fitotécnicos da tangerina fremont. **Tese (Doutorado)**. Campinas, 99 f. 2015.

PACHECO, C. A.; MARTELLI, I. B.; POLYDORO, D. A.; SCHINOR, E. H.; PIO, R. M.; KUPPER, K. C., AZEVEDO, F. A. Resistance and susceptibility of mandarins and their hybrids to *Alternaria alternata*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.69, n.6, p.386-392, 2012.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; DE LIMA, C. R.; DE MELO BASTOS, P.; DE MEDEIROS NETO, P. N. Taninos condensados da casca de angico-vermelho

(*Anadenanthera colubrina* var. cebil) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 22-27, 2013.

PEIXINHO, G. S.; RIBEIRO, V. G.; AMORIM, E. P. R. Controle da Podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos de videira cv. Itália por óleos essenciais e quitosana. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 1, p.26-31, 2017.

PEKMEZOVIC, M.; RAJKOVIC, K.; BARAC, A.; SENEROVIC, L.; ARSIC, A. V. Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. **Biochemical Eng. Journal** n. 99, p. 131–137, 2015.

PERINI, V. B. M.; CASTO, H. G.; SANTOS, G. R. Effect of vegetal extract in the inhibition of mycelial growth of *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v.4, n.1, p.70-77, 2013.

PHILLIPS, C.A.; LAIRD, K.; ALLEN, S.C. The use of Citri-V™® — an antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* *in vitro* and on food. **Food Research International**, n. 47, p. 310–314, 2012.

PINTO, C. M. Relações hídricas, trocas gasosas em amendoim, gergelim e mamona submetidos a ciclos de deficiência hídrica. **Agropecuária Técnica**, Fortaleza, CE, v. 35, n. 1, p.35-40, ago. 2014.

PINTO, K. M. S. Substâncias bioativas de extratos vegetais no manejo da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f.sp. *citri*). Areia: CCA/UFPB, 119p. (Tese de Doutorado em Agronomia). 2011.

RAMOS, B. L. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, n. 4, v. 12, p. 195-215, 2011.

RIBEIRO, R. V; MACHADO, E. C.; BRUNINI, O. Ocorrência de condições ambientais para a indução do florescimento em laranjeiras no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, p. 247-253, 2006.

SALES, M. D. C.; COSTA, H. B.; FERNANDES, P. M. B.; VENTURA, J. A.; MEIRA, D. D. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in *pineapple*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 1, p. 26-31, 2016.

SAROJ, A.; PRAGADHEESH, V. S.; YADAV, A.; SINGH, S. C.; SAMAD, A.; NEGI, A. S.; CHANOTIYA, C. S. Anti-phytopathogenic activity of *Syzygium cumini* essential oil, hydrocarbon fractions and its novel constituents. **Crops and Products**, v. 74, p. 327-335, 2015.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248, 2008.

SILVA, A. C.; SILVA, F. M. O.; MILAGRE, J. C.; GARCIA, R. P.; ABREU, M. C.; MAFIA, R. G. NESI, A. N. Eucalypt plants are physiologically and metabolically affected by infection with *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, p. 170-179, 2018.

SILVA, E. O.; ALVES, E.; FERREIRA, T. C.; ALBUQUERQUE, C. A. C. Óleos essenciais no controle da pinta bacteriana e na ativação de respostas bioquímicas em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.3, p.212-217, 2017.

SOARES, L. A. A.; BRITO, M. E. B.; FERNANDES, P. D.; LIMA, G. S.; SOARES FILHO, W. S.; OLIVEIRA, E. S. Crescimento de combinações copa - porta-enxerto de citros sob estresse hídrico em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.3, p.211–217, 2015.

SOUZA, W. C. O.; DO NASCIMENTO, L. C.; VIEIRA, D. L.; DOS SANTOS, T. S.; DE ASSIS FILHO, F. M. Alternative control of *Chalara paradoxa*, causal agent of black rot of *pineapple* by plant extract of *Mormodica charantia*. **European Journal of Plant Pathology**, v.142, n. 3, p. 481-488, 2015.

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-DF, v.28, p.231, 2007.

STEVIC, T.; BERIC, T.; SAVIKIN, K.; SOKOVIC, M.; GODEVAC, D.; DIMKIC, I.; STANKOVIC, S.; Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plants. *Ind. Crops Production*, n. 55, p. 116–122, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p. 2017.

TEIXEIRA, R.N.V.; SILVA, L.J.; Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agroambiente**, Boa Vista-RR, v.6, n.1, p.47-52, 2012.

TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HUANG, B.; HE, J.; WANG, Y. In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. **Food Control**, v. 22, p. 1992-1999, 2011.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. Minnesota: APS Press, 2.ed. 128p. 2000.

TIMMER L. W.; PEEVER T. L.; SOLEL Z. V. I.; AKIMITSU K. *Alternaria*, doenças do sistema de plantio de citrus-novel. **Phytopathologia Mediterranea**. v. 42, p. 99-112. 2003.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.1, p.18-23, 2011.

WARREN, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H.W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds). The Citrus Industry. **Berkeley**, University of California Press, v.1, p.1-39.1967.

XAVIER, S. A.; MELLO, F. E.; CANTERI, M. G. Fotossíntese de folhas de soja infectadas por *Corynespora cassiicola* e *Erysiphe diffusa*. **Summa Phytopathologica**, Londrina, Pr, v. 41, n. 2, p.156-159, 2015.

CAPÍTULO II

MANEJO DE *Alternaria alternata* f. sp. *citri* EM FRUTOS DE TANGERINEIRA 'DANCY' UTILIZANDO ÓLEOS ESSENCIAIS

**Manejo de *Alternaria alternata* f. sp. citri em frutos de tangerineira ‘Dancy’
utilizando óleos essenciais**

**Management of *Alternaria alternata* f. sp. Citri 'Dancy' in tangerine fruits
using essential oils**

Resumo: A doença mais importante das tangerineiras e seus híbridos é a mancha marrom de *Alternaria*, cujo agente causal é a *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, capaz de provocar grandes perdas econômicas. Esse trabalho teve como objetivo determinar o efeito de diferentes óleos essenciais sobre *A. alternata* f. sp. *citri in vitro* e em frutos de tangerineira ‘Dancy’. Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita, do Centro de Ciências Agrárias, UFPB. Foram utilizados três isolados de *A. alternata* f. sp. *citri* (Massaranduba-Paraíba, Pratânia-São Paulo e Trás dos Montes-Portugal). Para verificar o efeito dos tratamentos nos isolados *in vitro*, adicionaram-se os óleos essenciais de sementes de uva, girassol, eucalipto, gengibre, copaíba, menta, erva-doce, citronela, cravo e linhaça na concentração de 1 v/v diluídos em meio de cultura BDA com pH 6,0, vertidos em placas de Petri, e no centro das placas foi adicionado um disco de 5 mm de diâmetro da colônia fúngica pura, para o experimento *in vitro*. Os frutos foram tratados com os mesmo óleos essenciais utilizados no experimento *in vitro* diluídos em água destilada esterilizada e os controles adicionais compostos pelo fungicida Tiabendazol 400 mL/100L e ADE (sem tratamento), imersos nos tratamentos por 5 min. Os frutos foram aspergidos com a suspensão de esporos na concentração 10^5 conídios/mL de *A. alternata* f. sp. *citri*. Foram avaliados índice de velocidade de crescimento micelial, diâmetro de colônia (durante sete dias), produção de conídios e dimensões de conídios, (*in vitro*); severidade da doença em frutos (segundo escala de nota específica) *in vivo*. As análises Físico-Químicas: foram realizadas por cinco períodos, as avaliações de sólidos solúveis totais, acidez titulável, relação sólidos solúveis totais e acidez titulável, pH, firmeza, rendimento de suco, ácido ascórbico, totalizando cinco avaliações e perda de massa; e atividade enzimática (peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônio-liase) em frutos de tangerineira ‘Dancy’. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos, composto de quatro repetições de três placas (*in vitro*) e quatro repetições de três frutos (*in vivo*). De acordo com os resultados obtidos, os óleos essenciais de menta, eucalipto, erva-doce e citronela foram eficientes no controle *in vitro* do patógeno, inibindo totalmente o crescimento *in vitro* das colônias fungicas. O óleo de eucalipto foi eficiente no manejo de *A. alternata* f. sp. *citri* em frutos de tangerineira ‘Dancy’ em relação aos demais tratamentos. Os óleos essenciais não interferiram na qualidade pós-colheita de frutos de tangerineira ‘Dancy’. A atividade enzimática aumentou no segundo período de avaliação dos frutos.

Palavras-chave: atividade fungistática, *C. tangerina* hort. ex Tanaka, controle alternativo

Abstract: The most important disease of tangerine and their hybrids is the brown spot of *Alternaria*, whose causal agent is *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, that causes great economic losses. This work aimed to determine the effect of different essential oils on *A. alternata* f. sp. *citri* *in vitro* and in mandarin fruits. The experiments were conducted at the Phytopathology and Biology and Post-Harvest Technology Laboratories of the Centro de Ciências Agrárias, UFPB. Three isolates of *A. alternata* f. sp. *citri* (Massaranduba, PB, Pratânia-SP and Trás dos Montes-PT) were used. To verify the effect of the treatments on the *in vitro* isolates, the essential oils of grape, sunflower, eucalyptus, ginger, copaiba, mint, fennel, citronella, cloves and flax seeds were added at a concentration of 1% diluted in BDA media, with pH 6.0. A disk of 5 mm diameter of the fungus colony was added in plate center, for the *in vitro* experiment. The fruits were treated with the same essential oils used in the *in vitro* experiment diluted in sterile distilled water (ADE) and controls composed of the fungicide Thiabendazole 400 mL / 100L and ADE (untreated), immersed in the treatments for 5 min. The fruits were sprayed with the spore suspension at the concentration 105 conidia/mL of *A. alternata* f. sp. *citri*. Mycelial growth rate index, colony diameter (for seven days), conidia and conidia size (*in vitro*) were evaluated, severity of disease in fruits (by scale of specific note) *in vivo*. The physical-chemical analyzes were total soluble solids, titratable acidity, total soluble solids ratio and titratable acidity, pH, firmness, juice yield, ascorbic acid, totaling five evaluations and loss of mass; and enzymatic activity (peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonium lyase) in 'Dancy' tangerine. The design was completely randomized with 12 treatments, consisting of four replicates of three plates (*in vitro*) and four replicates of three fruits (*in vivo*). According to the results, the essential oils of peppermint, eucalyptus, fennel and citronella were efficient in the *in vitro* control of the pathogen, totally inhibiting the *in vitro* growth of the fungal colonies. Eucalyptus oil was efficient in the management of *A. alternata* f. sp. *Citri* in 'Dancy' tangerine fruits compared with other treatments. The essential oils did not interfere in the post-harvest quality of 'Dancy' tangerine fruits. The enzymatic activity increased in the second evaluation period of fruits.

Keywords: *C. tangerina* hort. ex Tanaka, alternative control, fungistatic activity

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros e lidera o ranking tanto na exportação do suco concentrado de laranja como de frutos para consumo in natura. Ocupa o quinto lugar na produção de tangerinas e o Estado de São Paulo é considerado o maior produtor com 308.966 mil toneladas. Nesse cenário o estado da Paraíba se configura como 3º maior produtor da região Nordeste, ocupando o 7º lugar a nível nacional com produção de 11.945 mil toneladas em 2016 (IBGE, 2016).

Na região Nordeste, a citricultura enfrenta problemas no que se refere a ocorrência de doenças. A produção de citros vem diminuindo principalmente pela ação de patógenos nas fases de produção e pós-colheita (IBGE, 2016). A doença mais importante das tangerineiras e seus híbridos é a mancha marrom de *Alternaria* (MMA), devido a sua fácil disseminação, sendo encontrada em todos os estados produtores do país, acarretando na limitação da expansão da cultura (CHEN et al., 2014).

O agente causal da MMA é a *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, fungo saprófita facultativo, que ao colonizar o tecido vegetal das plantas, libera uma toxina específica para o patótipo tangerina, causando a morte celular no local do ataque. O fungo é encontrado praticamente em todas as áreas produtoras de tangerineiro no Brasil. Os sintomas e a severidade da doença estão relacionados ao grau de colonização do tecido vegetal, observando-se manchas de coloração marrom circundadas por um halo amarelo. Todos os órgãos da planta podem ser atacados (PORCINO et al., 2017).

O controle da MMA é realizado principalmente por meio de produtos químicos. No entanto, essa prática tem sido alvo de preocupação, devido aos diversos riscos oferecidos ao homem e ao ambiente (NOGUEIRA et al., 2014). Como fonte alternativa para o controle de doenças tem sido adotados nos últimos anos, o uso de óleos essenciais de plantas, com resultados promissores em pesquisas que comprovam a sua eficácia (SOUZA et al., 2015).

Dessa forma, existe grande demanda por métodos de controle alternativo, que sejam eficientes e de baixo custo no manejo da MMA. Várias pesquisas com controle de doenças pelo uso de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais se mostraram eficientes tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*, no manejo pós-colheita de patógenos (NASCIMENTO et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

Dentro desse contexto a pesquisa objetivou determinar o efeito de diferentes óleos essenciais sobre aspectos morfofisiológicos de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* in

vitro e in vivo em frutos de tangerineira ‘Dancy’, além de verificar a indução de resistência dos frutos ao patógeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratório de Fitopatologia (LAFIT) e de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita (LBTPC) do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, Paraíba.

Foram utilizados três isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* coletados em pomares de tangerineira localizados nos municípios de Massaranduba-Paraíba (I-8) (7° 10' 15" S e 35° 51' 14" W), Pratânia-São Paulo (I-28) (22° 48' 35" S e 48° 39' 57" W) e Trás dos Montes-Portugal (I-30) (41° 83' 56" S e 41° 50' 8" W). Estes isolados estavam preservados no LAFIT/CCA/UFPB, pelo método de Castellani (1939).

2.2. Caracterização morfológica dos isolados in vitro

Os isolados foram repicados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), pH 6,0, incubados durante cinco dias sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas em estufa tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.) Após esse período foi realizada a caracterização morfofisiológica dos isolados.

Para avaliar o efeito *in vitro* dos tratamentos sobre isolados do patógeno, adicionaram-se os óleos essenciais na concentração de 1% diluídos em meio de cultura BDA com pH 6,0, vertidos em placas de Petri.

Foram utilizados óleos de sementes de uva (*Vitis Vinifera*), girassol (*Helianthus annuus*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) gengibre (*Zingiber officinale*), copaíba (*Copaifera* sp.), menta (*Mentha arvensis*), erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* Rendle), cravo (*Syzygium aromaticum*) e linhaça (*Linum usitatissimum* L), obtidos comercialmente, acrescidos de duas gotas de Tween 80 (dispersante). Como controles foram utilizados o fungicida Tiabendazol (400 mL/100L) e meio de cultura BDA (sem tratamento). Os três isolados de *A. alternata* f. sp. *citri* foram cultivados em BDA sob temperatura de 25 ± 2 °C.

Os tratamentos foram dispostos em quatro repetições de três placas. No centro das placas de Petri foi adicionado um disco de 5 mm de diâmetro da colônia fungica. Foram avaliados:

2.2.1. Diâmetro micelial (DM): O diâmetro final das colônias dos isolados foi mensurado com régua graduada em milímetros, aos sete dias de idade. Foram avaliadas, para cada isolado, quatro placas com colônias puras do fungo, onde cada placa de Petri foi considerada como uma repetição.

2.2.2. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM): As avaliações foram diárias, até o sétimo dia, com uso de uma régua graduada em milímetros, em dois eixos ortogonais da placa. O IVCM foi estimado utilizando a fórmula de Oliveira (1991), $IVCM = (D - D_a) / N$, sendo:

IVCM=índice de velocidade de crescimento micelial;

D=diâmetro médio atual da colônia;

D_a=diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N=número de dias após a inoculação na placa de Petri.

2.2.3. Capacidade de esporulação de conídios: A avaliação da esporulação foi realizada no período de 10-15 dias de idade da colônia fúngica cultivada em BDA. A contagem de esporos foi realizada em suspensão aquosa, obtida pela adição de 10 mL de ADE às placas de Petri contendo as colônias puras dos isolados. Com o auxílio de um pincel de cerdas macias, os esporos foram liberados, a suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze esterilizada, quantificados em câmara de Neubauer (ALFENAS; MAFIA, 2016).

2.2.4. Tamanho dos conídios: Foram mensurados o comprimento e a largura de 25 conídios de cada tratamento, em lâminas de microscopia que foram coradas com azul de metileno. Cada conídio mensurado foi considerado uma repetição. As médias do comprimento e largura e a relação comprimento pela largura dos conídios foram mensuradas utilizando microscópio estereoscópio.

2.3. Inoculação de *Alternaria alternata* f. sp. citri em frutos de tangerineira ‘Dancy’

Os frutos de tangerineira cv ‘Dancy’ foram colhidos em pomar comercial na cidade de Remígio-PB (6° 54' 10" S e 35° 50' 2" W), sem tratamento químico, no estágio de maturação C2.

Os frutos foram sanitizados com hipoclorito de sódio a 1v/v por 5 min, secos a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e tratados com os seguintes óleos essenciais (OEs):

sementes de uva (*Vitis Vinifera*), girassol (*Helianthus annuus*), eucalipto (*Eucaliptus* spp.), gengibre (*Zingiber officinale*), copaíba (*Copaifera* sp.), menta (*Mentha arvensis*), erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* Rendle), cravo (*Syzygium aromaticum*) e linhaça (*Linum usitatissimum* L), na concentração de 1%, acrescidas de duas gotas de Tween 80 (dispersante) diluídos em água destilada esterilizada (ADE) e os controles adicionais compostos pelo fungicida Tiabendazol 400 mL/100 L e ADE (sem tratamento). Os frutos foram imersos durante 5 minutos em cada tratamento. Foram utilizadas quatro repetições de três frutos para cada tratamento.

Após o tratamento os frutos foram dispostos em bandejas de polipropileno e submetidos à temperatura 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas durante dois dias. Após esse período, foram realizados pequenos ferimentos na região equatorial em lados opostos e equidistantes na casca do fruto pelo método de picada, através de um alfinete esterilizado com perfuração de 1 mm de profundidade.

Sobre os frutos tratados foi borrifada, com borrifador manual, até o ponto de escorrimento, a suspensão de esporos obtida através da adição de 10 mL de ADE nas placas de Petri contendo colônias puras do fungo e, com o auxílio de uma espátula estéril, os conídios foram removidos, filtrados em camada de gaze esterilizada e quantificados em hemacitômetro, para composição de uma suspensão de 10^5 conídios/mL de *A. alternata* f. sp. *citri*.

Os frutos inoculados foram incubados em câmara úmida, composta por sacos de polietileno previamente umedecidos com ADE, durante 48 horas, com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Foram avaliados:

2.3.1. Severidade dos isolados: Após retirada da câmara úmida, os sintomas foram quantificados a cada dois dias, durante 15 dias, de acordo com a escala de notas proposta por Renaud et al. (2004), (Figura 1).

Figura 1. Escala diagramática descrita por Renaud et al. (2004) para avaliação da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*). UFPB, Areia-PB, 2018.



Com os dados da severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença, conforme a fórmula descrita por Shaner; Finney (1977), $AACPD = \Sigma [(y1 + y2) / 2 * (t2 - t1)]$, onde $y1$ e $y2$ são as porcentagens de área lesionada nos frutos observada nas avaliações e $t_{i+1} - t_i$, são os intervalos entre as avaliações. O ponto de máxima eficiência técnica para AACPD foi encontrada de acordo com Storck et al. (2011).

A proteção das plantas foi calculada através da AACPD de cada tratamento, onde a % Proteção = $(AACPD \text{ Tratamentos} \times 100 / AACPD \text{ Testemunha})$ (DEL ROVERE, 2013).

2.4. Análises Físico-Químicas

Os frutos foram acondicionados em bandejas de polipropileno sob temperatura ambiente 25 ± 2 °C, onde foram realizadas por períodos, as avaliações de sólidos solúveis totais (Brix) (IAC, 2005), acidez titulável (INSTITUTO ADOLF LUTZ (IAC, 2008), relação sólidos solúveis totais e acidez titulável (IAC, 2005), pH (IAC, 2005), firmeza (IAC, 2005), rendimento de suco (IAC, 2005), ácido ascórbico (STROHECKER e HENNING, 1967), totalizando cinco avaliações (intervalos de três dias), com exceção da perda de massa na qual foram realizadas avaliações diárias durante 15 dias.

2.5. Análises enzimáticas

Para a extração das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (FAL) foram utilizados 3,0 g de casca do fruto homogeneizados em 10 mL de tampão de extração fosfato 0,1M, pH 6,0. A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 12000 g coletando-se o sobrenadante.

As reações para determinação da atividade enzimática da POX foram preparadas com a adição de 0,25 mL do sobrenadante ao meio de reação contendo 0,25 mL de guaiacol a 1,7%, 0,75 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 e 0,25 mL de H₂O₂ a 1,8%. As reações foram monitoradas com auxílio de espectrofotômetro, observando-se a variação da absorbância no comprimento de onda de 470 nm, a 25 °C, imediatamente após a mistura e a atividade expressa em unidades de absorbância (UA) min⁻¹mg⁻¹ de proteína.

Para a determinação da atividade da PPO, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado ao meio de reação contendo 0,25 mL de S-metil-catecol 0,6 M e 0,75 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,8. A solução foi incubada por 15 minutos a 40 °C e a reação paralisada com adição de 800 µL de ácido perclórico 2N. As reações foram monitoradas com auxílio de espectrofotômetro, observando-se a variação da absorbância, no comprimento de onda de 395 nm, a 25 °C, imediatamente após a retirada da incubadora e a atividade da PPO expressa em unidades de absorbância (UA). min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

Para a determinação da atividade da FAL 0,5 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos de ensaio e alíquotas de 1,5 mL de solução tampão TRIS-EDTA 0,01M, pH 8,8, 0,5 mL de solução de fenilalanina (30 µM) e 0,5 mL de água destilada foram adicionados. Após a incubação em banho-maria a 40 °C, por uma hora, a reação foi paralisada com 2 mL de ácido clorídrico 5M e as leituras espectrofotométricas realizadas a 290 nm 25°C. Os resultados foram expressos em Unidades de Absorbância (UA) min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

A prova em branco II foi preparada usando 1,5 mL de solução tampão TRIS 0,01M. pH 8,8, 0,5 mL de extrato enzimático e 1,0 mL de água destilada, para cada tratamento testado. As análises foram realizadas em triplicata. As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram realizadas pelo método de Bradford (1976).

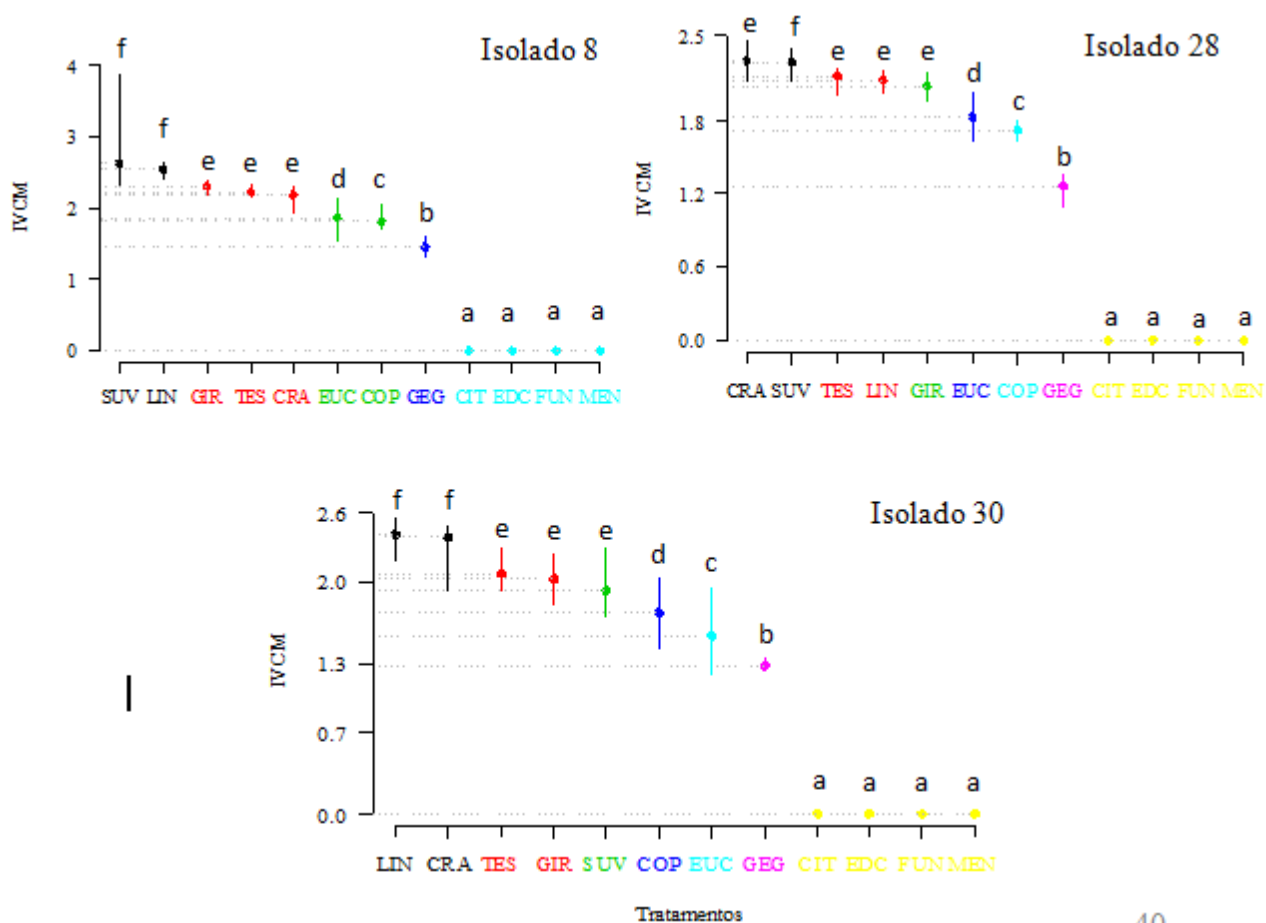
2.6. Análise estatística

Foram realizadas análises de variância para os parâmetros: diâmetro micelial, índice de velocidade de crescimento micelial e capacidade de esporulação. As médias foram comparadas pelo teste Tukey até 5% de probabilidade, no programa R[®] versão 2017, e para o parâmetro agressividade dos isolado as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott até 5% de probabilidade utilizado o programa ASISTAT[®].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste *in vitro*, os isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* apresentaram diferença significativa entre si e entre os tratamentos. O isolado I8 (Paraíba) apresentou

Figura 2. Índice de Velocidade de Crescimento micelial (IVCM) dos isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. Isolados: I8-Paraíba, I28-São Paulo e I30-Portugal. Tratamentos: TES-Testemunha, Óleos de SUV- Sementes de Uva, CRA- Cravo, EUC-Eucalipto, LIN- Linhaça, GEG- Gengibre, CIT- Citronela, COP- Copaíba, EDC-Erva-Doce, MEN- Menta, diluídos à 1% em ADE, FUN- Fungicida Tiabendazol (400 mL/100L), Areia, Paraíba,UFPB,2018.



maior índice de crescimento micelial (IVCM) em relação aos isolados 28 e 30 suas médias variaram de 0 a 2,63 cm (Figura 2). O maior crescimento do isolado 8 pode estar relacionado ao fato de ter sido cultivado em condições ambientais muito próximas da realidade do campo, uma vez que este isolado foi obtido de áreas de produção da Paraíba.

Os óleos de citronela, erva-doce e menta, contiveram completamente a expansão do patógeno ao longo dos dias de avaliação, se mostrando eficientes para os três isolados. O resultado fungistático dos óleos supracitados se equipararam ao efeito do fungicida, confirmando sua atividade direta na supressão desse patógeno nas condições experimentais testadas.

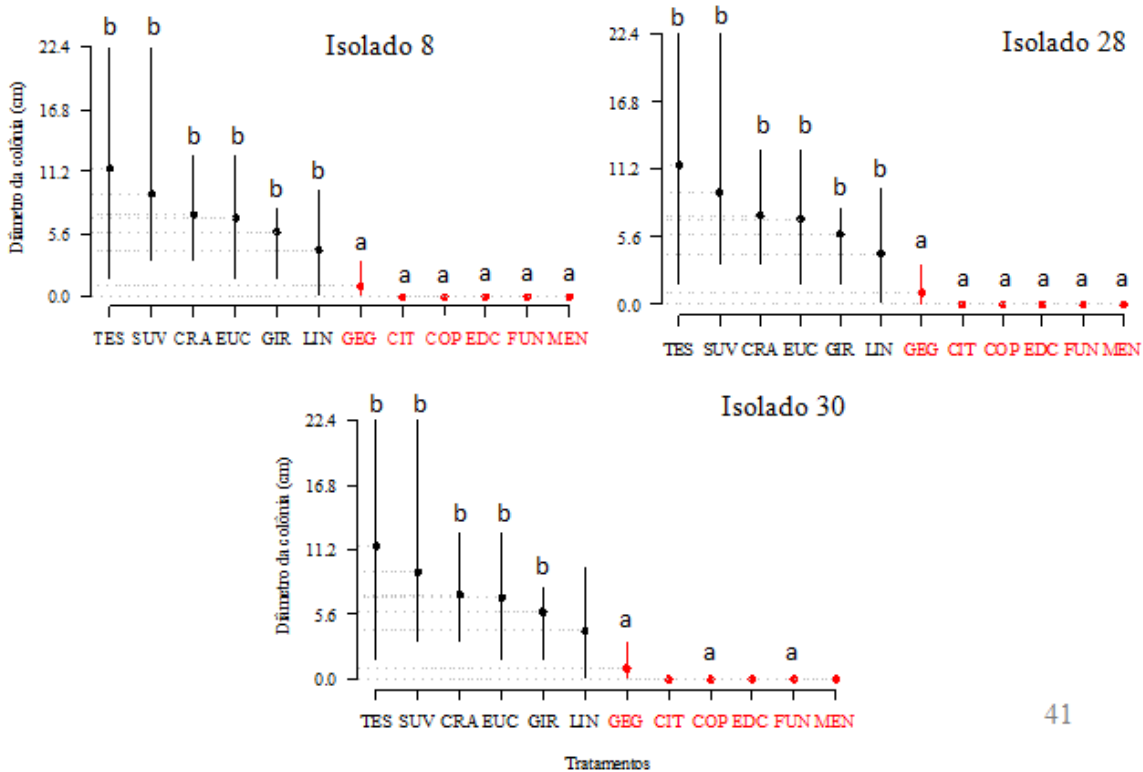
Avaliando o efeito dos óleos essenciais utilizados, foi observado que o óleo de sementes de uva induziu maior IVCM nos isolados 8 (PB) e 28 (SP), ultrapassando os valores apresentados pela testemunha. Já o IVCM do isolado 30 foi induzido pelos óleos de linhaça e cravo (Figura 2). Dessa forma pode-se dizer que, considerando esse parâmetro, estes óleos não foram controlaram o patógeno.

Todos os isolados apresentaram diferenças estatísticas em relação ao diâmetro das colônias de *A. alternata* f. sp. *citri*. Verificou-se que os isolados 28 e 30, apresentaram os maiores crescimentos miceliais com 8,30 e 8,09 cm respectivamente. O isolado 8 (PB) apresentou médias inferiores quando comparado aos demais isolados até o sétimo dia de avaliação (Figura 3).

O OE de gengibre apresentou resultado satisfatório na redução do crescimento micelial das colônias fungicas para os três isolados. No entanto, os OEs de copaíba, menta, erva-doce e citronela, foram altamente eficientes na inibição do crescimento micelial dos três isolados avaliados no teste *in vitro*, se equiparando ao efeito inibitório do fungicida (Figura 3).

Alguns OEs induziram o crescimento micelial de *A. alternata* f. sp. *citri*. O crescimento das colônias dos isolados 28 e 30 foram induzidos pelos OEs de cravo, linhaça e sementes de uva, quando comparados a testemunha (Figura 3). Já o óleo de eucalipto promoveu maior crescimento das colônias do isolado 8, ultrapassando o crescimento micelial da testemunha (Figura 3).

Figura 3. Diâmetro das colônias dos isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. Isolados: I8-Paraíba, I28-São Paulo e I30-Portugal. Tratamentos: TES-Testemunha, Óleos de SUV- Sementes de Uva, CRA- Cravo, EUC- Eucalipto, LIN- Linhaça, GEG- Gengibre, CIT- Citronela, COP- Copaíba, EDC- Erva-doce, MEN- Menta, diluídos à 1% em ADE, FUN- Fungicida Tiabendazol (400 mL/100L).Areia, Paraíba, UFPB, 2018.



41

Os óleos essenciais apresentam compostos químicos caracterizados pela presença de dois ou três componentes principais. Como por exemplo, o óleo essencial de citronela apresenta na sua composição, citronelol, geraniol, linalol e formiato de citronelila, entre outros componentes, foram descritas com ação efetiva contra fitopatogenos e para diversos insetos (AGARWAL et al., 2005).

Esses compostos são considerados majoritários, apresentando-se em elevadas concentrações e podendo ser responsável pelo efeito fungistático/fungicida dos óleos essenciais. No entanto alguns óleos essenciais não apresentam composto majoritário, e sim outros compostos em pequenas quantidades, chamados de componentes-traço (LORENZETTI, 2012; BAPTISTA et al., 2015).

A inibição do crescimento de fungos é um método padrão para reduzir a multiplicação de dos mesmos. Os componentes químicos como o citronelal (presente no óleo de citronela) e mentol (composto majoritário do óleo de menta) são os principais

metabólitos com ação antimicrobiana. Estudos mostraram que a atividade antifúngica contra *A. alternata* poderia ser principalmente atribuída ao eugenol e acetato de eugenol, o que mostrou excelente resultado (JINGA et al., 2018; SHARMA et al., 2017).

Perina et al. (2014) observaram que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* apresentou atividade contra o fungo *A. alternata*. Esse óleo demonstrou uma alta porcentagem no controle de doenças em frutas e atividade contra crescimento e viabilidade de *A. alternata*, sua aplicação resultou em um atraso no início do processo de infecção, prevenindo a penetração de fungos. Os óleos essenciais atuam na parede celular causando a ruptura da membrana plasmática com subseqüentes distúrbios do citoplasma que pode atacar organelas específicas no citoplasma do patógeno (JINGA et al., 2018).

Em relação à produção de conídios do I8 de *A. alternata* f. sp. *citri* sobre ação de óleos essenciais não houve diferenças significativas uma vez que todos os óleos inibiram completamente a esporulação do fungo (Figura 4) sem diferenciar da testemunha.

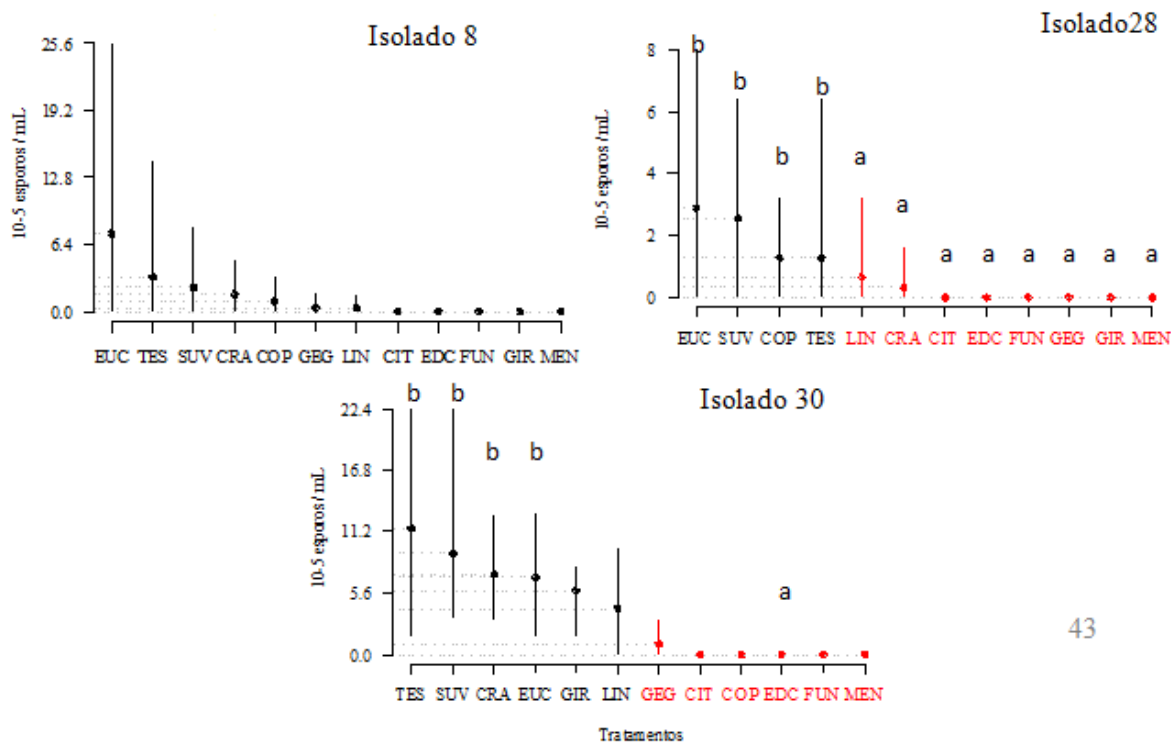
Os óleos de eucalipto, sementes de uva e copaíba estimularam a esporulação do isolado 28. O óleo de eucalipto induziu maior esporulação em relação à testemunha, enquanto que os demais óleos utilizados inibiram significativamente a produção de conídios. A inibição da esporulação demonstrada por esses óleos corroboram sobre seu efeito fungicida, inferindo que são apropriados em estratégias de manejo do patógeno, considerando os isolados 28 e 30 (Figura 4).

Para o isolado 30, os óleos de eucalipto, sementes de uva e cravo, girassol e linhaça, induziram maior esporulação das colônias, não diferindo estatisticamente da testemunha. Os óleos de gengibre, erva-doce, citronela, copaíba e menta inibiram completamente o crescimento micelial e a produção de esporos do isolado 30, apresentando efeito similar ao fungicida (Figura 4).

Os óleos de sementes de uva, cravo, eucalipto e linhaça estimularam o crescimento micelial e a produção de conídios de todos os isolados avaliados, destacando-se o óleo de sementes de uva. É importante salientar que, mesmo que a colônia fúngica apresente crescimento micelial considerável, a esporulação pode ser baixa, devido a fatores intrínsecos ao patógeno. Esses resultados comprovam que esses compostos não apresentam potencial como biocontroladores para *A. alternata* f. sp. *citri* *in vitro*.

É importante ressaltar que o resultado do IVCM não necessariamente irá influenciar a produção de conídios. Essas variáveis não são diretamente proporcionais, ou seja, um isolado que apresenta menor IVCM pode apresentar maior número de conídios. Em trabalhos realizados por Colturato (2006), foi observado que o crescimento micelial de *A. alternata* f. sp. *citri* não diferiu estatisticamente entre os óleos essenciais utilizados no presente estudo, no entanto ocorreu maior produção de conídios do patógeno. Tais resultados corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho.

Figura 4. Produção de conídios dos isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. Isolados: I8-Paraíba, I28-São Paulo e I30-Portugal. Tratamentos: TES-Testemunha, Óleos de SUV- Sementes de Uva, CRA- Cravo, EUC- Eucalipto, LIN- Linhaça, GEG- Gengibre, CIT- Citronela, COP- Copaíba, EDC- Erva-doce, MEN- Menta, diluídos à 1% em ADE, FUN- Fungicida Tiabendazol (400 mL/100L), Areia, Paraíba, UFPB, 2018.



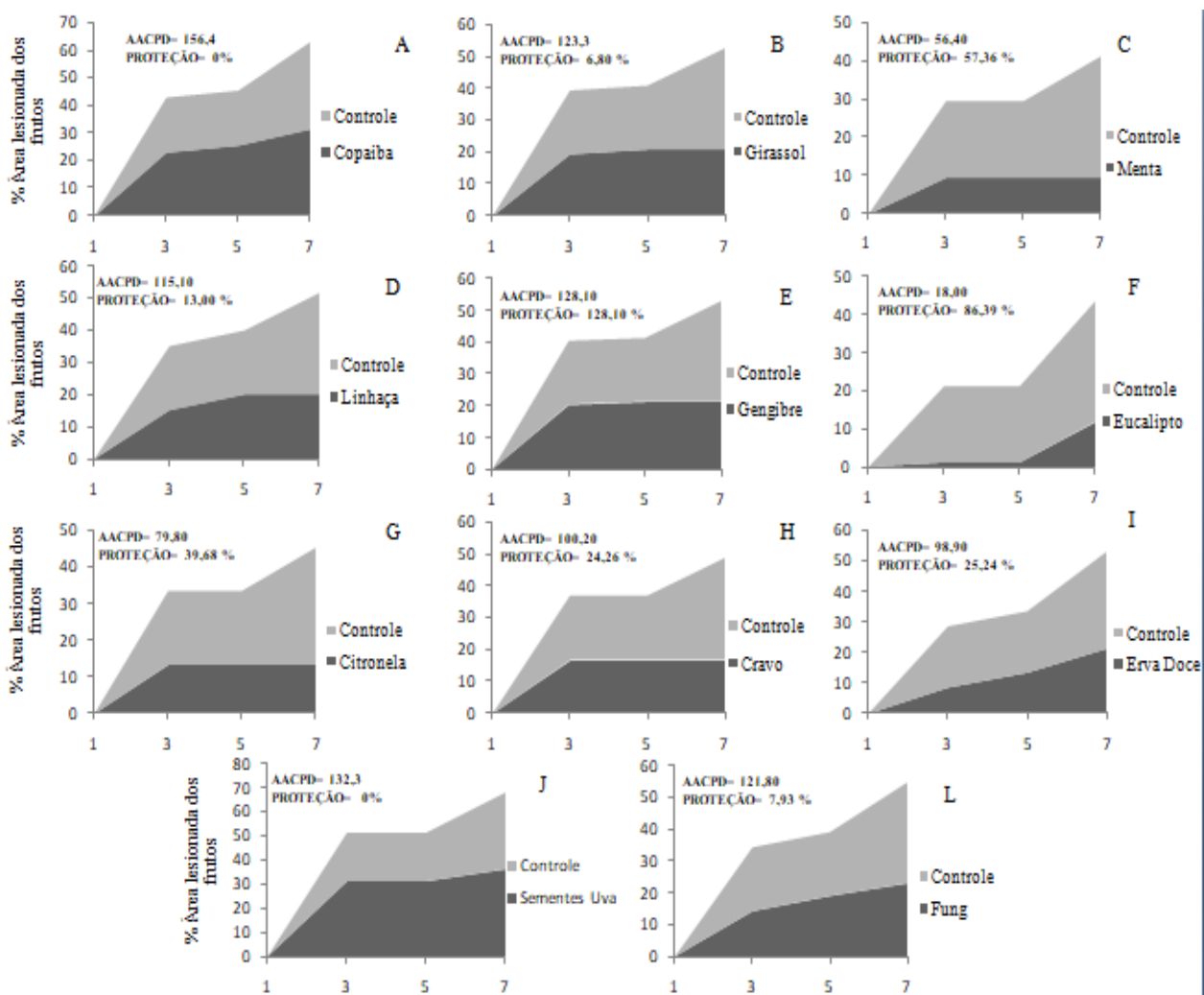
Pesquisas que descrevem a ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de patógenos, foi verificada por Castro et al. (2017), onde os óleos de *Cinnamomum zeylanicum* e *Eugenia caryophyllus*, foram eficazes, tanto *in vitro* como *in vivo*, inibindo o crescimento das hifas fúngicas, e o desenvolvimento de *A. alternata* na epiderme de frutos de *Hylocereus undatus*. Segundo Lorenzetti (2012) em trabalho

realizado com o manejo da cercosporiose do cafeeiro (*Coffea* sp.), a utilização do óleo de citronela inibiu o crescimento micelial e produção de conídios em 95 % em relação à testemunha.

O diâmetro dos conídios de *A. alternata* f. sp. *citri* não mostraram diferenças entre tratamentos e isolados utilizados. Esses resultados implicam que, os óleos essenciais e a concentração utilizada neste ensaio não interferiram nas dimensões dos conídios.

Após a análise dos dados da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos de tangerineira cv 'Dancy' inoculados com *A. alternata* f. sp. *citri* (Figura 5) verificou-se diferença estatística nos tratamentos avaliados.

Figura 5. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e porcentagem de proteção (%) em frutas de tangerineira cv 'Dancy' (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) submetidos aos tratamentos* com óleos essenciais. Areia, Paraíba, UFPB, 2018.



Os óleos de eucalipto, erva-doce, menta, cravo e citronela diminuíram a severidade da MMA. Ação oposta foi verificada em relação aos óleos de sementes de uva e copaíba, que não manifestaram qualquer efeito de retardamento sobre o desenvolvimento da doença, indiferentemente da testemunha (Figura 5).

Os óleos essenciais constituem-se numa alternativa ecológica de grande potencial, no controle de fitopatógenos, podendo ser associada às demais práticas de manejo integrado de doenças, colaborando para suprir à crescente demanda mundial por produtos orgânicos (XU et al., 2014).

Os óleos essenciais de sementes de uva e copaíba não apresentaram proteção às plantas, refletindo maiores valores de AACPD (Figura 5). Já o óleo essencial de eucalipto apresentou a maior percentagem de proteção 86,39% e a menor AACPD para MMA quando comparada com a testemunha, até o décimo sexto dia de avaliação (Figuras 5H). De acordo com os resultados da AACPD, para os isolados 28 e 30, não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha, sem nenhuma proteção.

A proteção oferecida pelo óleo de *Eucalyptus* spp. sobressaiu ao resultado do tratamento com o fungicida. Assim, esse óleo apresentou-se como potencial viável no manejo integrado da mancha marrom de alternaria, por agregar um aceitável nível de proteção, reduzir os efeitos negativos dos fungicidas relacionados ao desenvolvimento de resistência microbiana, risco à saúde humana e ambiental e, sobretudo atender à demanda por produtos orgânicos e livres de resíduos de agrotóxicos (KACEM et al., 2016; SAID et al., 2016).

De acordo com Xu et al. (2014), ao realizarem ensaio *in vivo*, o óleo de *Laurus nobilis* ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi eficaz na proteção de tomate cereja (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme) por infecção de *A. alternata*, com uma taxa de inibição de 33,9%. Chen et al. (2014) verificaram que o óleo de citronela apresentou forte atividade de inibição sobre *A. Alternata* na concentração $1,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ em frutos de tomate (*S. lycopersicum*), com redução de 52% na severidade da doença e o óleo não apresentou qualquer efeito negativo sobre a qualidade dos frutos, corroborando com os resultados da presente pesquisa.

A ação antimicrobiana exercida pelos óleos essenciais se deve às substâncias presentes na sua composição, que uma vez em contato com os microrganismos, a capacidade lipofílica de substâncias presentes no óleo e podem permitir a sua penetração em estruturas de membrana dos fungos, provocando danos à mesma, como o

vazamento de íons e outros componentes celulares, afetando a integridade das membranas celulares (JING et al., 2018).

Resultados que comprovam a eficiência dos óleos sobre fitopatógenos, foram encontrados por Tian et al. (2015), e por Jing et al. (2018), na atividade antifúngica de eugenol presente no óleo essencial de *Syringa oblata* Lindl. Sobre *A. Alternata* causador da mancha marrom do tabaco (*Nicotiana tabacum*), pode ser atribuída ao dano à membrana celular e a ruptura do citoplasma.

Os resultados obtidos no teste *in vitro* corroboram com os resultados do teste *in vivo* com frutos de tangerineira ‘Dancy’, permitindo correlacionar os resultados da AACPD com as características morfológicas dos isolados, onde os óleos que foram eficientes na redução do crescimento micelial e produção de conídios, também apresentaram menor AACPD e conferiram maior proteção aos frutos inoculados com o patógeno. Estes resultados confirmam o potencial dos óleos essenciais no manejo de *A. alternata* f. sp. *citri* em frutos e em campos sob produção orgânica, combinado com outras estratégias para reduzir o uso de produtos químicos.

Com os resultados obtidos, é possível aludir que o manejo da mancha marrom de alternaria em frutos de tangerineira ‘Dancy’ foi induzido pelo efeito direto dos óleos essenciais sobre o patógeno. Salientando que, estudos complementares devem ser realizados, como por exemplo, diferentes doses dos óleos e diferentes aplicações. Neste ensaio, verificou-se que os óleos essenciais de citronela, eucalipto e menta foram os mais promissores para o controle da mancha marrom de alternaria (MMA).

Na Tabela 1, estão dispostos os teores de sólidos solúveis totais (Brix), acidez titulável e relação sólidos solúveis totais e acidez titulável/g/L (SS/AT) em frutos de tangerineira ‘Dancy’. Para o teor de sólidos solúveis totais (°Brix), pode-se observar que houve um aumento significativo durante os dias de armazenamento para os tratamentos analisados. No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha (Tabela 1).

O aumento do teor de sólidos solúveis totais é um processo natural decorrente do avanço do amadurecimento dos frutos, já que, quando imaturos, os mesmos apresentam alto teor de amido que é convertido em glicose. À medida que amadurecem, os teores de açúcares solúveis elevam-se através do aumento respiratório (SILVA et al., 2016).

Tabela 1. Teores de sólidos solúveis (Brix), acidez titulável e relação sólidos solúveis totais e acidez titulável/L (SS/AT) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ tratados com óleos essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.

Tratamentos	Análises físico-químicas/Períodos*				
	Teores de sólidos solúveis em frutos (Brix)				
	1	2	3	4	5
Testemunha	8.28 aA	8.27aA	8.75 bA	8.58 aA	9.45 aA
Óleo de Copaíba	8.46 aA	8.81 aA	9.14 aA	8.72 aA	9.05 aA
Óleo de Gengibre	8.10 aA	8.69 aA	8.90 aA	8.63 aA	8.95 aA
Óleo de Menta	8.19 aA	8.56 aA	8.85 aA	8.23 bB	9.02 aA
Óleo de Citronela	7.95 aA	8.53 aA	9.00 aA	9.18 aA	9.22 aA
Óleo de Erva-Doce	8.22 aA	8.55 aA	9.09 aA	8.87 aA	9.19 aA
Fungicida	8.25 aA	8.62 aA	9.08 aA	8.28 bB	9.10 aA
CV= 8.19 %					
Acidez titulável					
Testemunha	2.06 bA	1.78 aA	1.75 bB	1.78 bB	2.49 aA
Óleo de Copaíba	2.33 aA	2.14 aA	2.07 bB	2.20 aA	2.51 aA
Óleo de Gengibre	2.40 aA	2.30 aA	2.08 bB	2.29 aA	2.13 bB
Óleo de Menta	2.65 aA	2.08 aA	2.38 aA	2.15 bA	2.10 bB
Óleo de Citronela	2.35 aA	2.08 aA	2.11 bB	2.36 aA	2.35 aA
Óleo de Erva-Doce	2.40 aA	1.88 aA	2.35 aA	2.41 aA	2.04 bB
Fungicida	2.57 aA	2.05 aA	2.03 bB	2.13 bA	2.52 aA
CV= 23.56%					
Sólidos solúveis totais e acidez titulável/L (SS/AT)					
Testemunha	4.05 bA	4.78 aA	5.20 aA	4.89 aA	3.85 bB
Óleo de Copaíba	3.75 aA	4.22 aA	4.54 aA	4.01 aB	3.82 aB
Óleo de Gengibre	3.55 aA	3.95 aA	4.41 aA	3.95 aB	4.26 aA
Óleo de Menta	3.19 bA	4.37 aA	3.87 aA	4.01 aB	4.68 aA
Óleo de Citronela	3.49 aA	4.33 aA	4.47 aA	3.94 aB	4.13 aB
Óleo de Erva-Doce	3.50 bA	4.85 aA	4.11 bA	3.76 bA	4.60 aA
Fungicida	3.36 bA	4.29 aA	4.67 aA	3.99 bB	3.76 bB
CV= 22,15 %					

*Avaliação realizada em intervalos de três dias. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott até 5% de significância.

De acordo com os padrões de CEAGESP (2011) o conteúdo mínimo de sólidos solúveis para tangerina é de 9,0%. Os frutos deste trabalho apresentam valores acima deste. Silva et al. (2014), avaliando frutos de tangerineiras cv ‘Ponkan’ encontraram valores médios de SS de 9,5%, corroborando com os resultados obtidos na presente pesquisa. O teor de sólidos solúveis é considerado importante fator de qualidade, pois à medida que os teores de açúcares vão se acumulando na fruta, os teores sólidos solúveis também aumentam (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Para o teor de acidez titulável, foi observado efeito significativo ($p < 0,01$) entre tratamentos e período de armazenamento (Tabela 1). A acidez titulável, apresentou em média valor de 1,75% de ácido cítrico, oscilando entre 1,75 e 2,65%. A testemunha apresentou os menores valores de acidez titulável, com diferença significativa apenas no último período de armazenamento, onde ocorreu aumento (Tabela 1).

De acordo com Belo (2017), foram encontrados teores de acidez titulável que variaram de 0,46 a 2,19, em tangerina ‘Ponkan’. O ácido cítrico é o principal ácido orgânico das tangerinas, que são consumidas quando ocorre redução do teor de acidez até o ponto em que seu suco se torne agradável ao paladar dos consumidores (COUTO, CANNIATTI-BRAZACA, 2010). Deve-se salientar que, os valores do pH estão relacionados ao valores de acidez titulável, mas os mesmos não se alteram na mesma proporção (AGOSTINI et al., 2014).

Para a relação SS/AT, verificou-se que houve interação significativa entre os tratamentos em função dos períodos de armazenamento ($p < 0,05$). No entanto, entre os períodos avaliados, pode-se verificar que os períodos 2 e 3 diferiram ($p < 0,01$) estatisticamente em relação aos demais, com valor máximo de 4,40 e 4,47 g/L (Tabela 1). A elevada relação SS/AT é um parâmetro importante de qualidade e sabor dos frutos, dando uma noção de estabilização entre a acidez e os açúcares (CHITARRA; CHITARRA, 2005; MELO et al., 2013).

A testemunha apresentou o maior valor de sólidos solúveis e acidez titulável, também conhecida como *ratio* de 4,56 g/L. Os valores apresentados no presente trabalho estão abaixo da faixa de 6 a 20g/L, classificada como ideal para tangerineira (CEAGESP, 2011), uma vez que, a relação SST/AT acima de 7 é considerada adequada para serem consumidos os frutos *in natura* (SALVADOR et al., 2002). É importante que os teores de *ratio*, correlacionam-se ao sabor dos frutos, que aumenta de acordo com o período de maturação dos mesmos (PACHECO et al., 2014). Dessa forma o resultado encontrado indica que os frutos sem tratamentos apresentaram maturação mais avançada.

Silva et al. (2014), avaliaram a relação SS/AT em frutos de tangerineira ‘Ponkan’, e observaram que apresentou uma média de 7,8g/L, ou seja, valores próximos aos encontrados no presente trabalho. Rodrigues (2013), avaliando a qualidade de frutos da tangerineira ‘Dancy’ encontrou valores superiores de SS/AT na faixa de 8,99 a 10,43 g/L.

De acordo com os resultados encontrados, os óleos essenciais utilizados não interferem nas características pós-colheita, mantendo a qualidade dos frutos de tangerineira ‘Dancy’. O sucesso na utilização de um produto natural está relacionado ao seu efeito sobre ação de patógenos principalmente na manutenção das características físico-químicas dos frutos.

Na Tabela 2, estão expressos os resultados de firmeza (N), potencial hidrogeniônico (pH), rendimento de suco e ácido ascórbico em frutos de tangerineira ‘Dancy’. Para a variável firmeza da polpa, observou-se efeito significativo ($p < 0,01$) na interação tratamentos *versus* período de avaliação.

A maioria dos tratamentos apresentou decréscimo na firmeza quando comparados com o valor inicial, ao longo do período de armazenamento (Tabela 2). A firmeza não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e entre os cinco períodos de avaliação.

Os frutos apresentaram-se moderadamente firmes (Tabela 2) com um intervalo de 4,13 a 7,63 N. A perda de firmeza dos frutos, embora seja um parâmetro físico, está relacionada à solubilização das substâncias pécicas, e também à perda de água, que ocorrem ao longo do amadurecimento ou senescência dos frutos, podendo conferir textura macia aos mesmos (CHITARRA, 2005; SILVA et al., 2006). Resultados superiores foram encontrados em trabalhos realizados com frutos de tangerineira cv ‘Ponkan’, apresentando firmeza de 9,81 a 12,75 (SILVA et al., 2014).

Em relação ao pH, observou-se diferença significativa ($p < 0,01$) na interação entre óleos essenciais e período de estocagem (Tabela 2). De modo geral, foi observada uma variação do potencial hidrogeniônico dos frutos com valores médios de 3,85 a 4,40, sendo verificado que, no último dia de avaliação, os tratamentos apresentaram diferença significativa entre si. De acordo com Chitarra e Chitarra (2005), o aumento do pH está diretamente relacionado com diminuição da acidez dos frutos ocorrendo com o avanço da maturação.

De acordo com Silva et al. (2014), os valores médios de pH observados em frutos de tangerineira ‘Ponkan’ foram de 4,41, apresentando um intervalo de 4,39 a 4,42 dentre as repetições analisadas. Normalmente, o valor de pH situa-se em torno de 2 para limões e limas e cerca de 4- 4,5 em tangerinas maduras (AGOSTINI et al., 2014).

Tabela 2. Firmeza (N), potencial hidrogeniônico (pH), rendimento de suco ácido ascórbico em frutos de tangerina ‘Dancy’ tratados com óleos essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.

Tratamentos	Análises físico-químicas/ Períodos*				
	1	2	3	4	5
Firmeza (N)					
Testemunha	4.85 aA	4.44aB	4.75 aA	4.81 aA	4.13aB
Óleo de Copaíba	4.58 aB	5.49aA	5.93aA	5.45aB	4.40aB
Óleo de Gengibre	6.05 aA	5.74aA	5.96aA	6.59aA	3.98aB
Óleo de Menta	6.11bA	5.31bB	7.63aA	4.29bB	5.19 bB
Óleo de Citronela	4.78aB	6.23 aA	5.35 bB	6.18 aA	5.45 bB
Óleo de Erva-Doce	4.71 bC	6.31 bA	5.80 bB	5.03aB	4.25 bC
Fungicida	4.66bB	3.88bB	6.10aA	6.78 aA	4.96 bB
CV= 44.72 %					
Potencial hidrogeniônico (pH)					
Testemunha	4.04 aB	4.45 aA	4.19 aB	4.03 aB	4.01 bB
Óleo de Copaíba	3.92 bC	4.34 aA	4.14 aA	3.93 aB	4.03 bB
Óleo de Gengibre	3.85 bA	4.33 aA	4.19 aA	3.95 aA	4.17 aB
Óleo de Menta	3.88 bA	4.40 aA	4.11 aA	3.98 aA	4.13 aA
Óleo de Citronela	3.99 aA	4.36 aA	4.13 aB	3.92 aB	4.07 bB
Óleo de Erva-Doce	3.92 bB	4.38 aA	4.08 aA	3.92 aB	4.10 aA
Fungicida	3.89 bA	4.36 aA	4.14 aB	3.99 aB	4.03 bB
CV= 2.64 %					
Rendimento de suco					
Testemunha	46.16 aA	33.33 bB	35.75 aB	34.50 aB	29.41 bB
Óleo de Copaíba	42.08 aA	37.33 bB	27.91 bB	10.16 cC	33.50 aB
Óleo de Gengibre	35.33 bB	40.38 aA	23.16 bC	36.00 aB	34.91 aB
Óleo de Menta	35.00 bB	37.91 bA	24.75 bB	26.66 bB	37.16 aA
Óleo de Citronela	35.83 bB	42.25 aA	35.25 aB	36.08 aB	36.00 aB
Óleo de Erva-Doce	45.36 aA	42.00 aA	23.75 bC	36.50 aB	34.25 aB
Fungicida	39.16 bA	39.16 aA	31.75 aB	34.29 aB	29.66 bC
CV= 22.26 %					
Ácido ascórbico em frutos					
Testemunha	15.41 bB	14.30 bC	17.01 aA	17.03 bA	15.98 cB
Óleo de Copaíba	15.01 cC	14.81 aC	15.66 cC	17.81 bA	16.99 bB
Óleo de Gengibre	15.55 bC	14.79 aC	17.53 aB	18.62 aB	21.61 aA
Óleo de Menta	15.87 bB	14.81 aC	15.77 cB	17.35 bA	15.42 cB
Óleo de Citronela	15.58 bC	14.72 aD	16.14 bB	18.15 aA	15.50 cC
Óleo de Erva-Doce	16.13 aB	14.74 aC	17.53 aA	18.04 aA	16.85 bB
Fungicida	15.46 bC	14.15 bD	16.92 bB	18.40 aA	16.58 bB
CV=9.61%					

*Avaliação realizada em intervalos de três dias. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott até 5% de significância.

Agostini (2014), trabalhando com conservação pós-colheita de laranja relatou que os valores médios do suco variaram de 3,32, 3,46 e 3,40, não diferindo quanto ao

tempo de armazenamento ou às embalagens. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues (2013) em trabalho realizado com tangerina ‘Dancy’ com valores médios de pH entre 3,71- 3,75. Esses dados corroboram com os encontrados neste trabalho.

Os frutos de tangerineira ‘Dancy’ apresentaram rendimento de suco médio de 46,16% (Tabela 2). Houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0.01$) em todos os períodos, exceto no 1º período de estocagem. Todos os tratamentos apresentaram maior rendimento de suco no 2º período de avaliação.

Segundo IAC/CEAGESP (2011) os valores padrão para o rendimento em suco para as tangerinas “Cravo”, “Mexerica”, “Ponkan” e Murcote são, respectivamente, 40, 35, 35 e 42%. Desta forma a tangerina ‘Dancy’ apresenta um rendimento de suco considerado padrão, com valores semelhantes. Rodrigues (2013), avaliando características de qualidade dos frutos de tangerineira ‘Dancy’ de diferentes locais no estado da Paraíba reportou valores de rendimento de suco que variaram de 48,83 e 53,89% nas condições de produção do município de Esperança – PB.

A quantidade de ácido ascórbico aumentou com a maturação dos frutos, apresentando maior quantidade no 4º dia de avaliação. Foi observada diferença significativa entre os tratamentos *versus* períodos ($p < 0.01$). Os tratamentos que apresentaram as maiores médias de ácido ascórbico foram gengibre, erva-doce e fungicida com 17,62; 16,66 e 16,30, respectivamente (Tabela 2).

Pode-se afirmar que houve correlação do aumento da quantidade de ácido ascórbico e efeito do óleo essencial de gengibre e erva-doce sobre a qualidade de frutos de tangerineira ‘Dancy’ apresentando as maiores médias em todos os períodos avaliados (Tabela 2). A vitamina C está presente nos frutos principalmente na forma de ácido ascórbico, que tende a diminuir quando expostos a altas temperaturas em reações oxidativas (AGOSTINI et al., 2014). Segundo Detoni et al. (2009) a faixa de concentração de ácido ascórbico aceitável para as tangerineiras, varia entre 20 a 50 mg 100 mL⁻¹. Constatou-se que as taxas de ácido ascórbico obtidas no presente trabalho estão dentro da faixa aceitável para as tangerineiras.

Pereira et al., (2012) relataram que, o ácido ascórbico possui características antioxidantes e proteção dos frutos, corroborando na produção de compostos como a vitamina C que consegue interceptar radicais livres, preservando a sua qualidade e mantendo a integridade das células. Silva et al. (2014), realizando trabalhos com tangerineira ‘Pokan’ observaram que os teores de ácido ascórbico variaram entre 27,15 e 26,89 mg.100⁻¹g. Demartelaere et al. (2017), trabalhando com indutores de resistência

em tangerineira ‘Dancy’ encontrou valores de ácido entre 22,51 e 23,96 mg100⁻¹g. No entanto, os resultados encontrados nesse trabalho foram bem inferiores.

Em relação à perda de massa fresca (PMF), observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre o tempo de armazenamento e os tratamentos, como também na interação tratamentos *versus* tempo de armazenamento ($p < 0,05$). Conforme Tabela 3, onde verifica-se um aumento gradual na PMF dos frutos no decorrer do armazenamento.

O tratamento com óleo de menta apresentou maior perda de massa fresca 94,44%, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ao final do período de armazenamento (Tabela 3). Esse óleo pode ter induzido maior respiração dos frutos, provocando maior perda de água e conseqüente maior perda de massa fresca.

Tabela 3. Perda de massa fresca (PMF) de frutos de tangerineira ‘Dancy’ tratados com óleos essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.

Períodos de armazenamento (dias)	Tratamentos*						
	TES	COP	GEN	MEN	CIT	EDC	FUN
1	91,58aA	96,08 aA	91,08aA	105,00 aA	99,50aA	100,42 aA	94,17 bA
2	89,83aA	94,75 aA	89,67aA	103,33 aA	98,00aA	98,50 aA	90,08 bA
3	87,42aA	93,08 aA	87,67aA	100,33 aA	96,00aA	96,08 aA	88,08 bA
4	86,00aA	91,75 aA	85,92aA	98,92 aA	94,00aA	94,08 aA	86,25 bA
5	83,67aA	90,50 aA	84,92aA	97,58 aA	92,50aA	92,67 aA	80,75 bA
6	82,17aA	89,17 aA	83,25aA	95,67 aA	91,17aA	91,00 aA	79,75 bA
7	80,50aA	88,00 aA	82,08aA	94,33 aA	89,00aA	88,58 aA	77,42 bA
8	77,00aB	87,75 aB	81,25aB	93,42 aB	86,17aB	85,42 aB	77,33 bA
9	75,00aA	86,83 aA	80,58aA	92,75 aA	83,17bA	84,67 aA	71,42 cA
10	71,33aA	86,33 aA	79,92aA	90,75 aA	79,92bA	83,25 aA	67,42 cA
11	70,67aA	85,00 aA	77,42aA	89,00 aA	76,00bA	80,00 aA	66,00 cA
12	70,17aA	85,00 aA	77,42aA	88,83 aA	74,83bA	79,92 aA	64,33 cA
13	68,50aA	83,83 aA	75,08aA	86,58 aA	72,75bA	79,08 aA	59,67 cA
14	68,08aA	83,83 aA	75,08aA	85,75 aA	72,25bA	79,08 aA	62,50 cA
CV(%)	28.90%						

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott até 5% de significância.

A perda de massa está relacionada ao processo respiratório dos frutos, que ocorre em decorrência da água eliminada no processo transpiratório, ocasionada pela diferença de pressão de vapor entre o fruto e o ar no ambiente (25 °C); ou ainda devido a síntese de complexos enzimáticos que degradam a celulose presente nos frutos, resultando na perda de integridade e na diminuição na coesão das células vegetais (SOUSA et al., 2000; MARTINS et al., 2014; DEMARTELAERE et al., 2017).

Os óleos essenciais de copaíba, gengibre, citronela e erva-doce não aceleraram o metabolismo do fruto, que por sua vez não acelerou o processo de perda de massa. Contudo, a intensidade da perda de massa tem grande importância durante a comercialização, pois elevadas perdas de massa podem resultar no enrugamento e murchamento, comprometendo as qualidades organolépticas e nutricionais, acarretando prejuízos na qualidade pós-colheita (PARSONS, 2012).

Não foram observadas diferenças significativas na atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em frutos de tangerineira ‘Dancy’ nos tratamentos aplicados (Tabela 4). Foi verificada diferença significativa ($p < 0.01$) entre os períodos de avaliação, sendo observado o aumento na atividade enzimática no 2º período, entre todos os tratamentos (Tabela 4).

As enzimas relacionadas à defesa da planta como a peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia liase, β -1,3-glucanase e quitinase, são ativadas a partir de mecanismos bioquímicos responsáveis pela biossíntese e atividade dessas enzimas, que se encontram presentes nas plantas na forma inativa (MARTINS et al., 2014).

Vale salientar que não foram observadas alterações nas atividades enzimáticas em relação à concentração de óleo utilizada. Isso pode ter ocorrido devido à concentração dos óleos essenciais ter sido insuficiente para desencadear a atividade enzimática, como pode ser observada na Tabela 4.

O aumento da atividade enzimática no 2º período pode estar relacionado ao aumento da respiração dos frutos devido a senescência e a degradação de amido, causando alterações fisiológicas, aumentando a capacidade respiratória dos frutos e proporcionando maior ação enzimática (MENEGASSI et al., 2017).

Tabela 4. Atividade das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (FAL) em de frutos de tangerineira ‘Dancy’ tratados com óleos essenciais (1%) e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L), em diferentes períodos. UFPB, Areia-PB, 2018.

Tratamentos	Atividade enzimática		
	Períodos*		
	1	2	3
Peroxidase (POX)			
Testemunha	4.83 bB	8.57 cA	8.53 aA
Óleo de Copaíba	4.91 bC	8.84 cA	6.41 bB
Óleo de Gengibre	4.72 bA	9.30 bB	5.33 cB
Óleo de Menta	4.06 bC	9.39 bA	5.35 cB
Óleo de Citronela	6.19 aC	7.90 dA	4.63 dB
Óleo de Erva-Doce	4.41 bB	7.86 dA	4.35 dB
Fungicida	4.92 bB	11.92aA	4.31 dB
CV= 19.95%			
Polifenoloxidase(PPO)			
Testemunha	1.50 bB	2.40 aA	2.18 aA
Óleo de Copaíba	1.55 bB	2.41 aA	1.86 aB
Óleo de Gengibre	1.59 bB	2.81 aA	1.63 aB
Óleo de Menta	1.49 bB	2.76 aA	1.58 aB
Óleo de Citronela	1.82 bB	2.58 aA	1.54 aB
Óleo de Erva-Doce	1.42 aA	1.94 bA	1.49 aA
Fungicida	1.63 bB	2.90 aA	1.40 aB
CV= 20.62%			
Fenilalanina amônia-liase (FAL)			
Testemunha	1.21 aB	8.57 aA	1.64 aB
Óleo de Copaíba	1.20 aA	1.66 cA	1.43 aA
Óleo de Gengibre	1.24 aA	1.87 cA	1.30 aB
Óleo de Menta	1.18 aB	1.73 cB	1.28 aB
Óleo de Citronela	1.38 aB	1.68 cB	1.25 aB
Óleo de Erva-Doce	1.19 aA	1.54 cA	1.21 aA
Fungicida	1.29 aB	2.04 bA	1.19 aB
CV= 13.32%			

*Avaliação realizada em intervalos de cinco dias. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott até 5% de significância.

Mudanças que envolvem complexas transformações no metabolismo dos frutos, as quais são decorrentes do aumento da atividade enzimática, estão associadas a mudanças da atividade respiratória e biossíntese do etileno. Quando iniciado o amadurecimento têm seguimento os processos de senescência, período dodesenvolvimento do fruto, durante o qual o passará pelos processos de síntese, resultando na morte dos tecidos (ROCHA et al., 2010; DEMARTELAERE et al., 2017).

O aumento da atividade de algumas enzimas pode estar associado à biossíntese de lignina (NASCIMENTO, 2014). A enzima fenilalanina amônia-liase é extremamente

importante para o desenvolvimento normal da planta, pois está associada a regulação do alongamento e ligação entre os polissacarídeos de parede celular (DEMARTELAERE et al., 2017). Além disso, é precursora de pigmentos (antocianinas) e atua na proteção contra os estresses abióticos e bióticos pela ação de fitopatógenos (MARIANGEL et al., 2013).

Alguns óleos não apresentam efeito sistêmico sobre plantas. Muitas vezes esse efeito pode estar relacionado às características morfológicas das plantas, como por exemplo, a presença de cera na superfície de folhas que dificulta a penetração e ação de óleos essenciais sobre o tecido. Óleos essenciais são altamente voláteis, principalmente sobre altas temperaturas. Esses fatores podem estar relacionados à baixa ativação enzimática (GUIMARÃES et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de menta, citronela e erva-doce à 1% são eficientes no controle *in vitro* de *A.alternata* f. sp. *citri*;

Os óleos de eucalipto, menta, citronela e gengibre a 1% são eficientes na redução da severidade de *A. alternata* f. sp. *citri* em frutos de tangerineira ‘Dancy’;

Os óleos essenciais testados não afetam negativamente a qualidade pós-colheita de frutos de tangerineira ‘Dancy’;

Os óleos testados não induziram maior atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em frutos de tangerineira ‘Dancy’.

5. REFERÊNCIAS

AGARWAL, M.; WALIA, S.; DRINGRA, S.; KHAMBAY, B. P. S.; Pest Manag. Sci. Stored Prod. Res. 2005, 41, 91.

AGOSTINI, J. S.; SCALON, S. P. Q.; LESCOANO, C. H.; SILVA, K. E.; GARCETE, G. J. Conservação pós-colheita de laranjas Champagne (*Citrus reticulata* × *Citrus sinensis*). **Campinas**, v. 17, n. 2, p. 177-184, 2014.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em fitopatologia. 2 ed. Minas Gerais:Viçosa, 2016. 516 p.

BAPTISTA, E. B.; ZIMMERMANN-FRANCO, D. C.; LATALIZA, A. A.; RAPOSO, N. R. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus smithii* against dermatophytes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 48, p. 746–752, 2015.

BELO, A. P. M. Caracterização sensorial e físico-química de tangerinas produzidas em Goiás. 2017. 107 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248- 254, 1976.

CARVALHO, D. D. C.; ALVES, E.; BATISTA, T. R. S.; CAMARGOS, R. B.; LOPES, E. A. G. L. Comparison of methodologies for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 792-798, 2008.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n.42, 225p. 1939.

CASTRO, J. C.; ENDO, E. H.; SOUZA, M. R.; ZANQUETA, E. B.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A.; UEDA-NAKAMURA, D.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; ABREU FILHO, B. A. Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 101–109, 2017.

CEAGESP, Normas de classificação de citros de mesas. São Paulo:CEAGESP; **Programa Brasileiro para a Modernização da Horticultura**, 2011.

CHEN, Q., XU, S., WU, T., GUO, J., SHA, S., ZHENG, X., YU, T. Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 94, 2441–2447. 2014.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2005.

COLTURATO, A.B. **Efeito do meio de cultura, temperatura, fotoperíodo e fungicidas no crescimento micelial e no controle de *Alternaria alternata* f. sp. citri, causador da mancha marrom do tangor murcote**. 2006. 53F. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências agrônômicas, São Paulo-SP. 2006.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, supl. 1, p. 15-19. 2010.

DEL ROVERE, N.S. Programas de pulverização com fungicidas sistêmicos e cúpricos em diferentes combinações no controle da mancha preta dos citros. 2013. 42f. **Dissertação** (Mestrado). Fundo de Defesa da Citricultura, São Paulo-SP. 2013.

DEMARTELAERE, A. C. F.; NASCIMENTO, L. C.; ALMEIDA, L. C.; VARGAS, C. S.; PORCINO, M. M.; CLEMENTE, P. A. Manejo da mancha marrom de alternaria em tangerineira ‘Dancy’ com extrato de *Caesalpinia ferrea* Benth (Ducke). **Revista brasileira de plantas medicinais** (IMPRESSO), v. 19, p. 59-66, 2017.

DEMARTELAERE, A. C. F.; NASCIMENTO, L. C.; GUIMARÃES, G. H. C.; SILVA, J. A.; LUNA, R. G. Elicitors on the control of anthracnose and post-harvest quality in papaya fruits. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 47, n. 2, p. 211-217, 2017.

DETONI, M.A.; HERZOG, N.F.M.; OHLAND, T.; KOTZ, T.; CLEMENTE, E. Influência do sol nas características físicas e químicas da tangerina ‘Ponkan’ cultivada no Oeste do Paraná. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v.33, n.2, p. 624-628, 2009.

GUIMARÃES, F.C.M.; ABDELNOOR, R.F.; PEREIRA, P. R. G.; PEREIRA, M. C. B. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.47, n.2, p.163-172. 2015.

IBGE - **Instituto brasileiro de geografia e estatística**: Comentários. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2011/pam20_11_comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2011/pam20_11_comentarios.pdf)>. Acesso em: 23 dez. 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2ª Edição. São Paulo, v.1, 371p. 2005.

JINGA, C.; ZHAOB, J.; HANB, X.; HUANGA, R.; CAIC, D.; ZHANGA, C. Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Crop Protection**, v. 104, p. 41–46, 2018.

KACEM, N.; ROUMY, V.; DUHAL, N.; MEROUANE, F.; NEUT, C.; CHRISTEN, P.; HOSTETTMANN, K.; RHOUATI, S. Chemical composition of the essential oil from Algerian *Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities. **Crop production**, v. 90, p. 87–93, 2016.

LORENZETTI, E. R. **Controle de doenças do morangueiro com óleos essenciais e *Trichoderma* spp.** Lavras : UFLA, 112p. (Tese de doutorado em Agronomia), 2012.

MARIANGEL, E.; REYES-DIAZ, M.; LOBOS, W.; BENSCH, E.; SCHALCHLI, H.; IBARRA, P. The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. **Ciência e Investigación Agraria**, Assunção, v.40, n.1, p.161-170, 2013.

MARTINS, J. J. A.; LEITE FILHO, M. T.; PEREIRA, E. M.; SANTOS, Y. M. G.; MARTINS, A. N. A.; SILVA, L. A.; ROCHA, A. P. T. Características físico-químicas de tangerina "cravo" cultivadas organicamente no brejo paraibano. **1º Simpósio Nordeste de Química**. 1p. 2014.

MELO, A. P. C.; SELEGUINI, A.; VELOSO, V. R. S. Caracterização física e química de frutos de araçá (*Psidium guineense* Swartz). **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 4, n. 1, p. 91-95, 2013.

MENEGASSI, T.; RIBAS, B. A. M.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R.; MAIA, A. J. Extrato de *Lentinula edodes* no controle da antracnose do feijoeiro. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, Guarapuava-PR, v.10, n.3 p.75-81, 2017.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2014.

NASCIMENTO, L. M.; SANTOS, P.C. Controle de doenças fúngicas e de danos por frio em pós-colheita de lima ácida Tahiti. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.2, p.193-205, 2013.

NOGUEIRA, S. R.; LIMA, F. S.; ROCHA, E. M.; ARAÚJO, D. H. Fungicidas no controle de fusariose do abacaxi no estado de Tocantins. Brasil. **Revista de ciências agrárias**, v.37, n. 4, p. 447-455. 2014.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 1991.

PACHECO, C. A.; SCHINOR, E. H.; AZEVEDO, F. A.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, V. Caracterização de frutos do tangor TMxLP 290 para mercado de fruta fresca. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 805-812, 2014.

PARSONS, E. P.; POPOVSKY, S.; LOHREY, G. T. Fruit cuticle lipid composition and fruit post harvest water loss in an advanced backcross generation of pepper (*Capsicum* sp.). **Physiologia plantarum**, v. 146, n. 1, p. 15-25, 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERINA, F. J.; AMARAL, D. C.; FERNANDES, B. F. S.; LABORY, C. C. R. G. B.; TEIXEIRA, G. A.; C ALVES, E. C. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. **Pest Management Science**, v. 71, n. 10, p. 1371-1378, 2014.

PORCINO, M.M.; NASCIMENTO, L.C.; SOUZA, J.O.; SOUZA, B.O.; NUNES, M.C. Caracterização morfofenética e reação de resistência de genótipos de tangerineira a *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.2, p.118-123, 2017.

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <URL <https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 5 Jan. 2018.

RENAUD, M.S.A.; AMORIN, L.; LOURENÇO, S.A.; SPÓSITO, M.B. Escala Diagramática para avaliação da Mancha Marrom de *Alternaria* de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.29, 2004.

ROCHA, R. H. C.; SILVA, E. O.; SALOMÃO, L. C. C.; VENTRELLA, M.C. Caracterização morfoanatômica do melão gália no ponto de colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.32, n.2, p. 375-385, 2010.

RODRIGUES, A. A. M. Qualidade de frutos da tangerineira ‘Dancy’ colhidos de plantas de diferentes municípios do território da Borborema. **Dissertação** (Mestrado). Areia, 2013.

SAID, B. O. S.; HADDADI-GUEMGHAR, H.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; RIGOU, P.; REMINI, H.; ADJAUD, A.; KHOUDJA, N. K.; MADANI, K. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. **Ind. Crop production**, v. 89, p. 167–175, 2016.

SALVADOR, A.; MONTEVERDE, A.; VÁZQUEZ, D.; CUQUERELLA, J.; NAVARRO, P. Desverdozación de frutos cítricos con destino a países de ultramar. **Levante Agrícola**, Valência, n.361, p.238-244, 2002.

SHARMA, A.; RAJENDRAN, S.; SRIVASTAVA, A.; SHARMA, S.; KUNDU, B. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, p. 308–313, 2017.

SILVA, A.P.G. DA; SILVA, S. de M.; SCHUNEMANN, A.P.P.; DANTAS, A.L.; DANTAS, R.L.; SILVA, J. A.; MENDONÇA, R.M.N. Índices de identidade e qualidade de tangerina ‘Ponkan’ produzida no estado da Paraíba. **Agropecuária Técnica**, Areia-PB v.35, p.143-149, 2014.

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M.L.V.; SOUZA, R.M.; CAMPOS, J.R. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-S-methyl na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersic* e *Septoria lycopersici* em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 3, p. 244- 248, 2006.

SILVA, R. S. S. Qualidade de uva “Isabel” tratada com cloreto de cálcio em pós-colheita e armazenada sob atmosfera modificada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.115-121, 2016.

SOUSA, R.F.; FILGUEIRAS, H.A.C.; COSTA, J.T.A.; ALVES, R.E.; OLIVEIRA, A.C. Armazenamento de ciriguela (*Spondia purpurea* L.) sob atmosfera modificada e refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 334-338, 2000.

SOUZA, W. C. O., DO NASCIMENTO, L. C., VIEIRA, D. L., DOS SANTOS, T. S., & DE ASSIS FILHO, F. M. Alternative control of *Chalara paradoxa*, causal agent of black rot of pineapple by plant extract of *Mormodica charantia*. **European Journal of Plant Pathology**, 142, 3, 481-488. 2015.

STROHECKER, R.; HENINING, H. M. **Análisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 42 p. 1967.

SUKORINI, HENIK. Plant crude extracts and yeast as alternative to synthetic fungicide for controlling postharvest green mould on citrus fruit. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 61, n. 3, p. 795-801, 2013.

TIAN, J.; WANG, Y.; ZENG, H.; LI, Z.; ZHANG, P.; TESSEMA, A.; PENG, X. Efficacy and possible mechanisms of perillaldehyde in control of *Aspergillus Niger* causing grape decay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 202, p. 27–34, 2015.

VAN DER WAALS, J. E.; KORSTEN, L.; AVELING, T. A. S. First report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of potatoes in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 3, p. 363, 2011.

Xu, S.; Yan, F.; Ni, Z.; Chen, Q.; Zhanga, H.; Zhenga, X. *In vitro* and *in vivo* control of *Alternaria alternata* in cherry tomato by essential oil from *Laurus nobilis* of Chinese origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 94, p. 1403–1408, 2014.

CAPÍTULO III

SEVERIDADE DA MANCHA MARROM DE ALTERNÁRIA EM MUDAS DE TANGERINEIRA ‘DANCY’ E TROCAS GASOSAS

Trocas gasosas e severidade da mancha marrom de alternaria em mudas de tangerineira 'Dancy'

Gas exchanges and severity of alternaria brown stain in tangerine 'Dancy'

Resumo: A citricultura no Brasil é uma das atividades mais exploradas, sendo cultivada em todas as regiões do país. No entanto esse cultivo tem diminuído devida ocorrência de doenças. O objetivo do trabalho foi verificar o efeito fungistático de óleos essenciais no manejo de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em mudas de tangerineira 'Dancy', e sua influência sobre suas trocas gasosas. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias, UFPB. Foram utilizados dois isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* dos municípios de Massaranduba-PB e Pratânia-SP. Foram utilizadas mudas de tangerineira 'Dancy' (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka), tratadas com óleos essenciais de gengibre, copaíba, menta, erva-doce e citronelana concentração de 1 %, acrescidos de Tween 80 e diluídos em água destilada esterilizada (ADE), além dos controles adicionais, fungicida Tiabendazol (400 mL/100L) e ADE (sem tratamento), aspergidos até o ponto de escoamento. Para a inoculação do patógeno a suspensão foi ajustada para 10^5 conídios/mL, pelo método de aspersão. Os parâmetros avaliados foram severidade da doença e trocas gasosas em mudas de tangerineira 'Dancy'. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado e os dados foram submetidos ao teste de Tukey pelo programa R[®]. Os resultados mostraram que o óleo essencial de erva-doce é eficiente no manejo de *A. alternata* f. sp. *citri* em mudas de tangerineira 'Dancy' e os óleos essenciais de citronela, copaíba e gengibre não afetam negativamente as trocas gasosas em mudas.

Palavras-chave: *Citrus tangerina*; *Alternaria alternata*; óleos essenciais.

Abstract: The Brazilian citriculture in one of the most exploited activities, being cultivated in all regions of the country. However this cultivation has decreased due to the occurrence of diseases. The objective of this work was to verify the fungistatic effect of essential oils in the management of *Alternaria alternata* f. sp. on 'Dancy' tangerine seedlings, and their influence on gaseous exchanges. The experiments were conducted in a greenhouse and at the Phytopathology Laboratory of the Centro de Ciências Agrárias, UFPB. Two isolates of *A. alternata* f. sp. Citri (Massaranduba-PB and Pratânia-SP) were used. Tangerine 'Dancy' (*Citrus tangerina* Hort. Ex Tanaka), treated with essential oils of ginger, copaiba, mint, fennel and 1% citronella, added of Tween 80 and diluted in sterile distilled water (ADE), fungicide Thiabendazole (400 mL/100L) and ADE (untreated), sprayed to the point of drainage. For inoculation of the pathogen the suspension was adjusted to 10^5 conidia/mL sprinkled to the point of drainage. The parameters evaluated were disease severity and gas exchange in tangerine 'Dancy' seedlings. Disease severity and gas exchange data were analyzed in a completely randomized design (DIC), consisting of seven treatments and four replicates of two plants. The results showed that the essential oil of fennel was efficient in the management of *A. alternata* f. sp. *citri* in tangerine 'Dancy' seedlings and the essential oils of citronella, copaiba and ginger do not negatively affect the gas exchange on seedlings.

Palavras-chave: *Citrus tangerina*; *Alternaria alternata* f. sp. *citri*; essential oils.

1. INTRODUÇÃO

A citriculturabrasileira é uma das culturas mais exploradas comercialmente, sendo cultivada em todas as regiões do país e tem como uma das principais ameaças infecção por patógenos. Nos últimos anos, os maiores responsáveis pela erradicação de milhões de plantas foram a tristeza dos citros (*Citrus tristeza vírus- CTV*), o cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*), a clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*), a morte súbita e o huanglongbing (HLB). Além disso, os gastos excessivos com defensivos agrícolas, especialmente inseticidas e fungicidas, ocasionaram a redução de 13% da área plantada de citros no Brasil nos últimos três anos, correspondendo atualmente a 735.742 hectares (AGRIANUAL, 2014).

O cultivo de tangerineiras e seus híbridos têm sido afetado devido à ocorrência de algumas doenças de importância econômica, como a mancha marrom de *Alternaria* (MMA), capaz de causar grandes perdas econômicas. Essa doença, causada pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri* tem principal ocorrência em regiões semiáridas, úmidas ou locais com períodos de chuvas frequentes (PORCINO et al., 2017). Algumas cultivares apresentam maior suscetibilidade e os sintomas podem se expressar de várias formas, dependendo da idade da planta, do órgão atacado e das condições do ambiente (TSUGE et al., 2013; BASSIMBA et al., 2014).

Os sintomas se apresentam na forma de manchas necróticas de coloração marrom, circundadas por um halo amarelo; quando estes evoluem nas folhas mais jovens prejudicam a capacidade fotossintética da planta acarretando em uma série de disfunções fisiológicas. À medida que a área fotossintética diminui, a absorção de CO₂ também diminui, uma vez que ocorre basicamente através dos estômatos, sendo o movimento estomático o principal mecanismo de controle das trocas gasosas nas plantas superiores (SILVA et al., 2010).

Diante disso, formas alternativas de manejo, como o emprego de óleos essenciais têm aumentado consideravelmente nos últimos anos e revelado seu potencial, no controle de doenças, principalmente daquelas que provocam danos econômicos à agricultura. Algumas plantas apresentam substâncias químicas, com ação fungicida ou fungistática, as quais devem ser estudadas como matéria prima na formulação de novos produtos e utilização direta pelo produtor rural (PRAKASH et al, 2015).

Os óleos essenciais apresentam compostos majoritários na sua composição, no óleo essencial de *Zingiber officinale* o composto majoritário é o geraniol. Sua ação

antimicrobiana foi constatada por Sa-Nguanpuag et al. (2011), no controle de *Salmonella* na concentração de 2,5 a 10 mg.L⁻¹. Além deste, outros óleos essenciais de *Copaifera* sp., *Mentha arvensis*, *Pimpinella anisum* L., *Cymbopogon nardus*, já tem sua atividade antimicrobiana comprovada (TRONGTOKIT et al., 2005; WONG et al., 2005; REIS et al., 2006).

Desse modo, objetivou-se com esse trabalho verificar a ação dos óleos essenciais de gengibre, menta, erva-doce, citronela e copaíba no manejo de *A. alternata* f. sp. *citri* em mudas de tangerineira ‘Dancy’ inoculadas e tratadas bem como modificações nas trocas gasosas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e material do experimento

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Fitopatologia (LAFIT) do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, Paraíba.

Foram utilizados dois isolados de *A. alternata* f. sp. *citri* coletados em pomares de tangerineira localizados nos municípios de Massaranduba, PB(I-8) (7° 10' 15" S e 35° 51' 14" W) e Pratânia-SP (I-28). Estes isolados estavam preservados no Laboratório de Fitopatologia (LAFIT/CCA/UFPB), segundo Castellani, (1939).

As mudas utilizadas no experimento foram resultado da enxertia de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) com o porta-enxerto limão cravo (nome científico) e foram produzidas do Sítio Caiana, município de Remígio, PB (6° 54' 10" S, 35° 50' 2" W), onde foram adubadas com esterco bovino na proporção de 2:1, regadas a cada dois dias.

Os óleos utilizados como tratamento foram, gengibre (*Zingiber officinale*), copaíba (*Copaifera* sp.), menta (*Mentha arvensis*), erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* Rendle), obtidos comercialmente.

2.2. Aplicação dos tratamentos nas mudas de tangerineira ‘Dancy’ e Inoculação de *A. alternata* f. sp. *citri*

As mudas de tangerineira ‘Dancy’ com 40 dias de idade foram pulverizadas com diferentes óleos essenciais, na concentração de 1,0 v/v, acrescidos de Tween 80 e

diluídos em água destilada esterilizada (ADE), e os controles adicionais compostos por fungicida Tiabendazol (400 mL/100 L) e ADE (sem tratamento), borrifados com pulverizador manual, até o ponto de escorrimento.

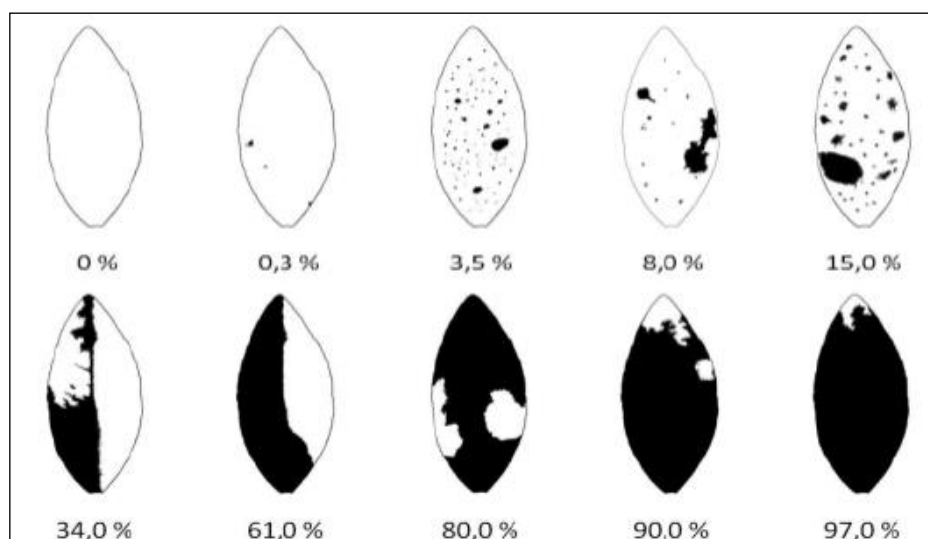
Após a aplicação dos tratamentos, as mudas foram submetidas a câmara úmida formada com sacos plásticos transparentes umedecidos, durante 24 horas, mantidas em casa de vegetação. Após esse período a câmara úmida foi retirada e realizados pequenos ferimentos, na parte abaxial, em quatro folhas pré-selecionadas de cada planta, através do método de picada utilizando um alfinete, os ferimentos eram de aproximadamente 1 mm de profundidade.

A suspensão de esporos obtida através da adição de 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) em placas contendo as colônias do fungo cultivadas em meio de cultura BDA (25 ± 2 °C) foi pulverizada sobre as mudas. A suspensão foi obtida com a remoção dos conídios com o auxílio de uma espátula estéril, sendo os mesmos filtrados em dupla camada de gaze esterilizada e quantificados em hemocitômetro, para a composição de uma suspensão (10^5 conídios/mL) de *A. alternata* f. sp. *citri*.

2.2.1. Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD)

A partir do terceiro dia após a inoculação (DAI) nas mudas, foram realizadas diariamente, avaliações da severidade em mudas de tangerineira ‘Dancy’, até atingir 34% de área lesionada, verificada no vigésimo oitavo dia, mediante emprego de escala diagramática descrita por Martelli (2011).

Figura 1. Severidade da mancha marrom de *Alternaria* causada por *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (MARTELLI, 2011).



Com os dados da severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), conforme a fórmula descrita por Shaner; Finney (1977), $AACPD = \Sigma [(y_1 + y_2) / 2 * (t_2 - t_1)]$, onde y_1 e y_2 são as percentagens de área lesionada nos frutos observada nas avaliações e $t_{i+1} - t_i$, são os intervalos entre as avaliações. O ponto de máxima eficiência técnica para AACPD foi encontrada de acordo com Storck et al. (2011).

A proteção das plantas foi calculada através da área abaixo da curva do progresso da doença de cada tratamento, onde a % Proteção = $(AACPD \text{ Tratamentos} \times 100 / AACPD \text{ Testemunha})$ (DEL ROVERE, 2013).

2.3. Trocas gasosas em mudas de tangerineira ‘Dancy’

Após as análises de incidência e severidade da doença nas mudas de tangerineira ‘Dancy’, foram determinadas: Taxa de assimilação de CO₂ (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E) ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (gs) ($\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração interna de CO₂ (C_i) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em duas folhas que apresentavam sintomas da doença. De posse desses dados, foram quantificadas a eficiência no uso da água (EUA) (A/E) [$(\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}) / (\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}) - 1$] e a eficiência instantânea da carboxilação Φ_c (A/C_i) (BRITO et al., 2012). Foi utilizado Analisador de Gases Infravermelho (IRGA) modelo “LCPro+” da ADC BioScientific Ltda (KONRAD et al., 2005; BRITO et al., 2012).

As determinações do índice de clorofila a, b e total foram realizados pelo método não destrutivo, utilizando-se clorofilômetro portátil (Clorofi LOG[®], modelo CFL 1030, Porto Alegre, RS), tendo os valores dimensionados em índice de clorofila Falker (FCI). Durante a realização dessas avaliações as médias de temperatura mínima, média e máxima no interior do ambiente durante o período de condução da pesquisa foram de 30,95 °C, 36,64 °C e 40,60 °C. As leituras foram realizadas no intervalo compreendido entre 12h30min às 14h30min horas da tarde.

2.4. Análise Estatística

Os dados de trocas gasosas foram analisados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo sete tratamentos e quatro repetições de duas plantas. Foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de

probabilidade, no programa R[®] versão 2017. Para agressividade dos isolados as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott até 5% de no programa ASISTAT[®] versão 7.6.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sintomas típicos de mancha marrom de alternaria (MMA) foram observados após 48 horas de inoculação com o fungo *A. alternata* f. sp. *citri* em folhas de mudas de tangerineira ‘Dancy’. Estes sintomas se caracterizaram por pequenas manchas, de coloração marrom a preta, de tamanho variado nas folhas, possivelmente pela ação da toxina ACT, assim descrito por alguns autores (KOHMOTO et al., 1993; AKIMITSU et al., 2003). Na Figura 2, pode-se observar a evolução dos sintomas da MMA, ao longo do experimento, para a testemunha.

Foi observada variabilidade dos sintomas em resposta à inoculação de *A. alternata* f. sp. *citri* entre os tratamentos com óleos essenciais, quando comparados à testemunha (Figura 2). A porcentagem de área foliar com sintomas variou de 0 a 34% nas mudas de tangerineira cv ‘Dancy’ inoculadas com o isolado 8. Valores menores de porcentagem de área lesionada foram observados em resposta à inoculação do fungo nas mudas submetidas ao isolado 28, sendo observada variação de 0 a 3,5%, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos.

Figura 2. Severidade da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em folhas de tangerineira cv ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.



Fonte: Porcino, M. M.(2018).

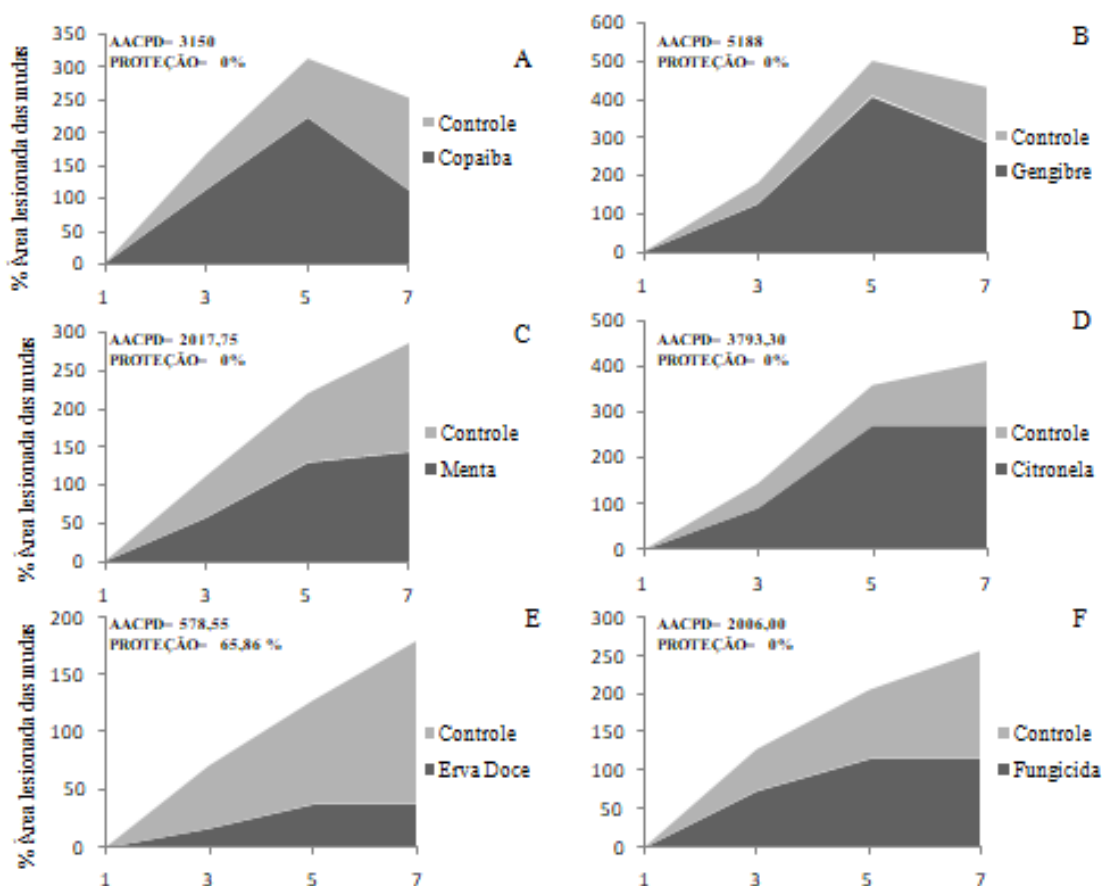
Os óleos essenciais de copaíba (*Copaifera* sp.), gengibre (*Zingiber officinale*), menta (*Mentha arvensis*) e citronela (*Cymbopogon nardus* Rendle), apresentaram baixa eficiência no controle da MMA em mudas de tangerineira cv ‘Dancy’, com maiores

AACPD quando comparadas ao controle (Figura 3A, B, C e D). O óleo de erva-doce se mostrou mais eficiente, com porcentagem de proteção de 65,86% e baixa AACPD, sendo superior ao fungicida (Figura 3E) e que demonstrou o potencial deste óleo no controle de MMA nas condições testadas.

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais podem sofrer influência de fatores intrínsecos às plantas, dependendo do órgão utilizado, idade, estágio vegetativo, e época de colheita (BRITO et al., 2012). Fatores ambientais, como o pH do solo, a estação do ano e temperatura relativa. Também podem exercer influência sobre a ação dos mesmos. Além disso, a eficiência do produto também dependerá do patossistema envolvido e dos processos de obtenção e manipulação (PRAKASH et al., 2015).

Uma das principais características dos óleos essenciais é sua alta volatilização, e essa característica pode se tornar um entrave quando se busca o manejo de fitopatógenos em plantas. Em testes *in vitro* os óleos apresentam menor taxa de volatilização, devido ao controle das condições do ambiente, resultando em efeitos satisfatórios na inibição da ação de fitopatógenos.

Figura 3. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e porcentagem de proteção (%) em mudas de tangerineira 'Dancy' submetidos aos tratamentos com óleos essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.



Esse efeito foi observado por Santos et al. (2010) onde relataram o efeito fungistático do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*), sobre o fungo *Helminthosporium* sp. em testes *in vitro*, mas quando o mesmo óleo foi utilizado em testes *in vivo* apresentou resultados pouco satisfatórios. Diante disso, a baixa eficiência desses óleos na presente pesquisa pode ser atribuída à elevada capacidade de volatilização, o que colabora para eventuais perdas nas suas propriedades fungitóxicas (PRAKASH et al., 2015).

O óleo essencial de erva-doce apresenta grande potencial no manejo da MMA, pois, nas condições do presente trabalho esse óleo apresentou efeito sistêmico nas plantas, além disso, apresenta baixo risco ao ambiente, produtores e consumidores, não favorecerem o desenvolvimento de resistência do patógeno por ser um produto biodegradável (DERBALAH et al., 2012).

Ao avaliar as trocas gasosas em plantas tangerineira ‘Dancy’ inoculadas e tratadas com óleos essenciais observou-se variações significativas em todas as variáveis estudadas, exceto para concentração interna de carbono (Ci) e eficiência intrínseca de carboxilação (EiC) (Figura 4), ou seja, ocorrendo diferentes capacidades de transporte de elétrons e trocas gasosas, em detrimento aos óleos essenciais utilizados como tratamentos.

As plantas apresentaram respostas semelhantes nas avaliações de fotossíntese (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E) (Figura 4A, B e C). O desempenho de cada tratamento utilizado reflete a influência dos óleos sobre os mecanismos específicos de trocas gasosas entre a planta e o meio externo, uma vez que, quando gs é limitada para diminuir a perda de água (E), o influxo de CO₂ para o interior da célula também diminui, comprometendo assim a taxa de fotossíntese líquida (A) (SHIMAZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; BRITO et al., 2012; TAIZ; ZEIGER, 2017).

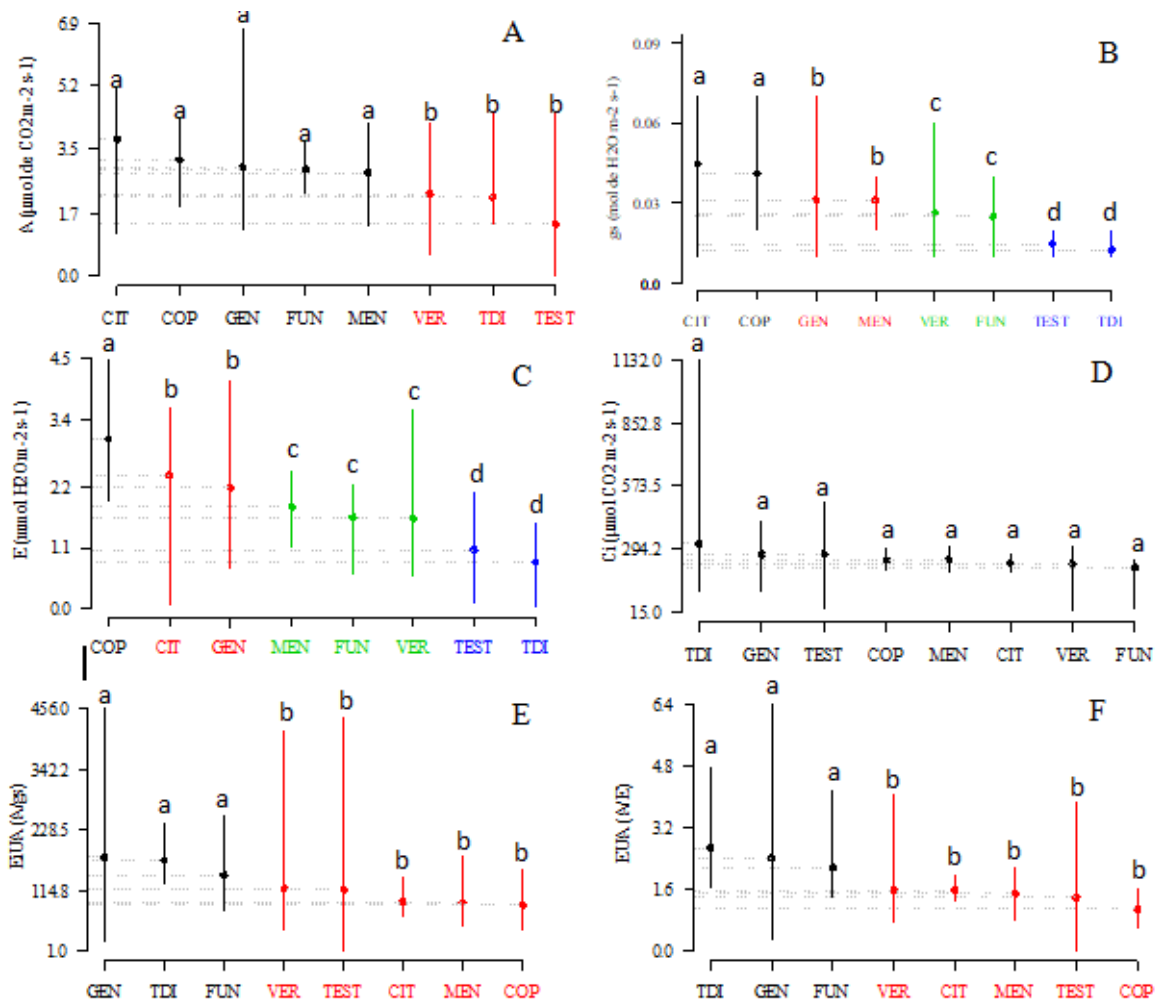
Foi verificado, que, as plantas tratadas com óleos de citronela e copaíba apresentaram os maiores índices de condutância estomática, com valores de 0,04 e 0,05 mol H₂O m⁻²s⁻¹, respectivamente (Figura 1B). Brito et al. (2012), trabalhando com combinações de copa/porta-enxertos de citros sob lâminas de água, relataram valores de 0,06 a 0,24 mol H₂O m⁻²s⁻¹. Tais resultados indicam que, os óleos de citronela e copaíba não interferiram na captação de radiação solar nas plantas.

Na transpiração (E), assim como observado para gs, registrou-se diferença significativa (p<0,05) entre os tratamentos avaliados, com maiores valores nas plantas

submetidas ao óleo de copaíba (Figura 4C). As plantas de tangerineira, sob o efeito desse óleo essencial, transpiraram mais, quando comparado à testemunha, com valor aproximado de $3 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Esse aumento na transpiração pode estar relacionado ao efeito direto exercido pelo patógeno sobre a planta.

Em trabalhos realizados por Santos et al. (2017); foi verificado o efeito fungistático de óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) e *Syzygium aromaticum* (cravo) no controle de *Lecanicillium fungicola* em folhas de videira, no campo, se mostraram promissores para o controle alternativo de doenças.

Figura 4. Trocas gasosas* em mudas de tangerineira 'Dancy' (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) submetidas a tratamentos** com essenciais a 1% e fungicida Tiabendazol (400 mL/100L). Areia, Paraíba, UFPB, 2018.



*Trocas gasosas: A- Fotossíntese ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)(A); gs- Condutância estomática ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)(B); E- Transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)(C); Ci- Concentração interna de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$)(D); EiUA- Eficiência intrínseca do uso da água(E); EUA- Eficiência do uso da água ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ (mmol H}_2\text{O)}^{-1}$)(F) e EiC-eficiência intrínseca de carboxilação [$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$](G). **Tratamentos: GEN- gengibre, COP- copaíba, MEN- menta, VER- erva-doce, CIT- citrônella, (1%), TEST- testemunha, FUN- fungicida Tiabendazol (400 mL/100L) e TDI- testemunha 2.

Os tratamentos com óleos de citronela, copaíba e gengibre aumentaram a taxa fotossintética em mudas de tangerineira ‘Dancy’ (4,0; 2,8 e 2,6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Esse resultado confirma a ação do patógeno sobre as plantas, uma vez que, esses óleos não promoveram proteção às mesmas (Figura 3). Dessa forma, quanto maior o ataque do patógeno maior será a resposta de estresse das plantas, refletindo assim em maior taxa de transpiração (E).

O aumento da fotossíntese pode ser uma resposta à indução de resistência nas plantas de tangerineira, mesmo que estes óleos não tenham tido efeito na proteção das plantas, ou seja, na redução dos sintomas da mancha marrom de alternaria (MMA). Os agentes patogênicos desencadeiam defesas físicas e bioquímicas em plantas infectadas, desviando recursos do crescimento da planta para a defesa, e reduzir as áreas foliares vivas e a capacidade fotossintética (YAN et al., 2013).

De acordo com Suassuna (2014), o aumento da fotossíntese é um sinal da presença de mecanismo de ajuste fisiológico favorável em citros, em condições adversas. É importante citar que, em citros, o limite desse parâmetro está entre 4,0 e 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (MACHADO et al., 2010). Assim, as plantas sob efeito dos óleos de citronela, copaíba e gengibre em condições de casa de vegetação apresentaram taxa de fotossíntese em torno de 4,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e, com isso, pode ter expressado condição de estresse devido a alta severidade da MMA.

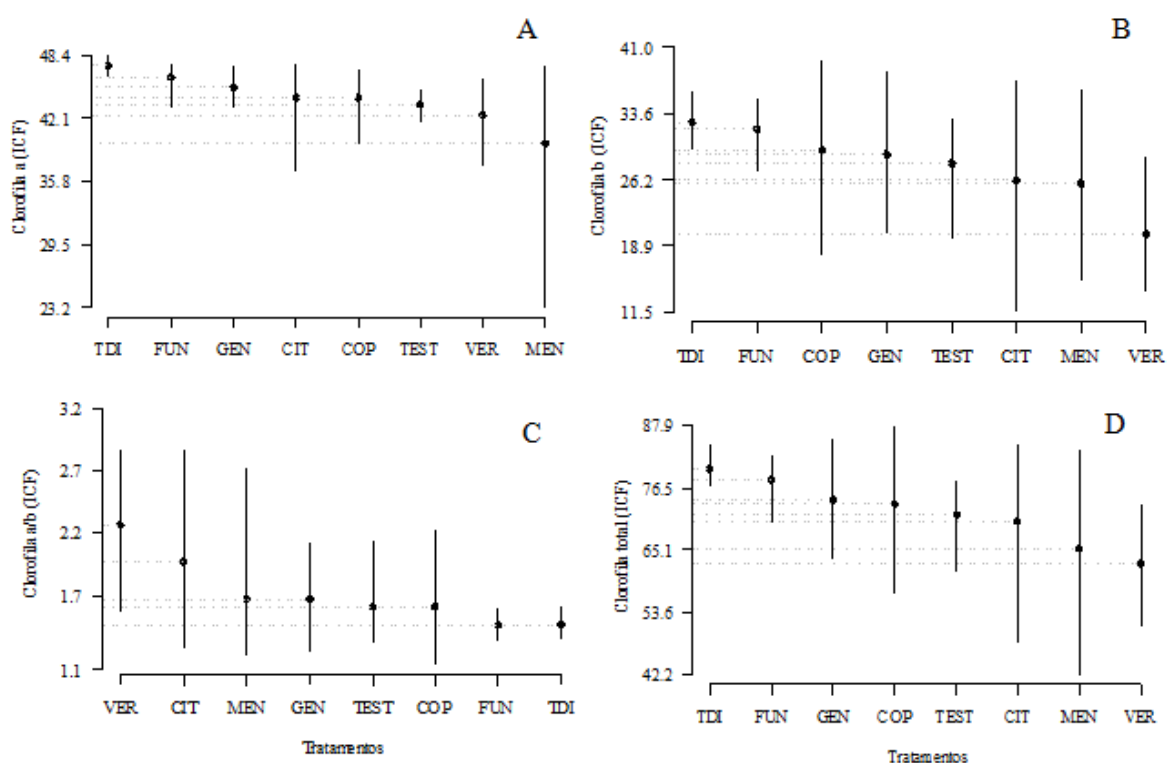
Os tratamentos testemunha, gengibre e fungicida, apresentaram os melhores resultados quanto à eficiência no uso da água (EUA) e da eficiência intrínseca de carboxilação (EiC) (Figura 4A e B). Segundo Barcelos (2015), a eficiência da água reflete o aumento da resistência estomática causado pela interferência de vários fatores ambientais como temperatura do ar, déficit de pressão do vapor e concentração de CO_2 . Os resultados obtidos nesse experimento estão em concordância com os resultados obtidos por Brito et al. (2016).

Os índices relacionados à Clorofila a, clorofila b, relação a/b e clorofila total, não apresentaram diferença significativa (Figura 5). Dessa forma é possível dizer que, os tratamentos com óleos essenciais não interferiram nas reações fotoquímicas das plantas de tangerineira nas condições desse experimento.

Deve-se ressaltar o potencial da utilização de óleos essenciais no manejo de doenças de plantas, além dos efeitos favoráveis exercidos sobre as trocas gasosas em plantas de citros. Além disso, esses produtos ainda podem ser utilizados juntamente com outras práticas de manejo integrado de doenças, possibilitando maior eficiência,

redução de custos de produção e menores danos causados ao meio ambiente (PRAKASH et al., 2015).

Figura 5. Análises de Clorofila em plantas de tangerineira cv 'Dancy' (*Citrus tangerina* Hort. Ex Tanaka) submetidos a tratamentos com óleos essenciais de GEN- gengibre, COP-copaíba, MEN- menta, VER- erva-doce, CIT- citronela, (1%), TEST- testemunha, FUN- fungicida Tiabendazol (400 mL/100L) e TDI- testemunha 2. Areia, Paraíba, UFPB, 2018.



4. CONCLUSÃO

O óleo essencial de erva-doce é eficiente no manejo de *A. alternata* f. sp. *citri* em mudas de tangerineira ‘Dancy’, reduzindo a severidade da doença;

Os óleos essenciais de gengibre, copaíba, menta, erva-doce, citronela, não interferem negativamente nas trocas gasosas em mudas de tangerineira ‘Dancy’.

5. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. 2012., São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p. 255-268, 2014.

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

BARCELOS, R. A. Óleos essenciais na indução de resistência e no manejo do oídio da soja. **Dissertação** (Mestrado). 62f. Guarapuava-PR, 2015.

BASSIMBA, D. D. M.; MIRA, J. L.; VICENT, A. Inoculum Sources, Infection Periods, and Effects of Environmental Factors on *Alternaria* Brown Spot of Mandarin in Mediterranean Climate Conditions. **Plant Disease**, v. 98, n. 3, p. 409-417, 2014.

BRITO, M. E. B.; SÁ, F. V. S.; SILVA, L. A.; LUCENA, R. C.; PEREIRA, F. H. F. P.; SOARES FILHO, W. S. Crescimento e trocas gasosas de porta-enxertos de citros em sistema hidropônico alternativo. **Irriga**, Botucatu, Grandes Culturas, p. 166-180, 2016.

BRITO, M. E. B.; SOARES, L. A. A.; FERNANDES, P. D.; LIMA, G. S.; SÁ, F. V. S.; MELO, A. S. Comportamento fisiológico de combinações copa/porta-enxerto de citros sob estresse hídrico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 27, supl., p. 857-865, 2012.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n.42, 225p. 1939.

DEL ROVERE, N.S. Programas de pulverização com fungicidas sistêmicos e cúpricos em diferentes combinações no controle da mancha preta dos citros. 2013. 42f. **Dissertação** (Mestrado). Fundo de Defesa da Citricultura, São Paulo-SP. 2013.

DERBALAH, A.S. et al. Antifungal activity of some plant extracts against sugar beet damping-off caused by *Sclerotium rolfsii*. **Annals of Microbiology**. v.62, p.1021-1029, 2012.

KOHMOTO, K.; OTANI, H.; TUSGE, T. *Alternaria alternata* pathogens. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R. P. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. Oxford: Pergamon, v.2, p.3-22, 1995.

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v.64, p.339- 347, 2005.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.S.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, A.W.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cafeeiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1. 2008.

MACHADO, D. F. S. P; MACHADO, E. C; MACHADO, R. S; RIBEIRO, R. V. Efeito da baixa temperatura noturna e do porta-enxerto na variação diurna das trocas gasosas e

na atividade fotoquímica de laranja 'valência'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 351-359, 2010.

MARTELLI, I.B. **Manejo da mancha marrom de alternária em citros: poda de limpeza e correlação com a lagarta minadora**. 2011. 41f. Dissertação (Mestrado). Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP. 2011.

MENDONÇA, V. Poda de recuperação em tangerineira 'Ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco). 2005. 61f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação da Universidade de Lavras, Lavras-MG. 2010.

PORCINO, M. M.; NASCIMENTO, L. C.; SOUZA, J. O.; SOUZA, B. O.; NUNES, M. C. Caracterização morfo genética e reação de resistência de genótipos de tangerineira a *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.2, p.118-123, 2017.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities e Potentials and challenges. **Food Control**, n. 47, p. 381-391, 2015.

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <URL <https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 5 Jan. 2018.

REIS, G.G.; PEISINO, A.L.; ALBERTO, D.L.; MENDES, M.F.; CALÇADA, L.A. Estudo do efeito da secagem em convecção natural e forçada na composição do óleo essencial da citronela (*Cymbopogon nardus*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.8, p.47-55, 2006.

SANTOS, A.C.A. et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Anacardiaceae*, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.20, n. 02, p. 154- 159, 2010.

SANTOS, A.P.G.; VIANA, T.V.A.; SOUSA, G.G.; Ó L.M.G.; AZEVEDO, B.M.; SANTOS, A.M. Produtividade e qualidade de frutos do meloeiro em função de tipos e doses de biofertilizantes. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista-BA, v.32, p.409-416, 2017.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow mild wing in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, p.1051-1055, 1977.

SHINOZAKI, K; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

SILVA, C. D. S.; SANTOS, P. A. A.; LIRA, J. M. S.; SANTANA, M. C.; SILVA JUNIOR, C. D. Curso diário das trocas gasosas em plantas de feijão-caupi submetidas à deficiência hídrica. **Revista Caatinga**, v.23, p.7-13, 2010.

STORCK, L.; GARCIA, D.C.; LOPES, S.J.; ESTEFANEL, V. **Experimentação vegetal**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 200p.2011.

SUASSUNA, J. F.; FERNANDES, P. D.; BRITO, K. S. A.; NASCIMENTO, R.; MELO, A. S. Trocas gasosas e componentes de crescimento em porta-Enxertos de citros submetidos à restrição hídrica. **Irriga**, Botucatu, v. 19, n. 3, p. 464-477, 2014.

TAIZ, T.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4. ed. Porto Alegre: ArtMed, 828p. 2017.

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research*, v.19, p.303-309, 2005. WONG, K.K.Y.; SIGNAL, F.A.; CAMPION, S.H.; MOTION, R.L. Citronella as an insect repellent in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.4633-4636, 2005.

TSUGE,T.; HARIMOTO, Y.; AKIMITSU, K.; OHTANI, K.; KODAMA, M.; AKAGI, Y.; EGUSA, M.; YAMAMOTO, M.; OTANI, H. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. **FEMS Microbiologia, Rev** 37, p. 44-66, 2013.

YAN, Q. N.; WANG, X. Q.; XU, X. F.; GUO, D. P.; WANG, Z. D.; ZHANG, J. Z.; HYDE, K. D.; LIU, H. L. Plant growth and photosynthetic performance of *Zizania latifolia* are altered by endophytic *Ustilago esculenta* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 75-83, 2013.