Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Mancha-marrom (*Alternaria alternata* f. sp. *citri* patótipo "tangerina"): processo infeccioso nas cultivares Ponkan, Murcott e Fremont

Ricardo Barbosa Felipini

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2019

Ricardo Barbosa Felipini
Engenheiro Agrônomo

Mancha-marrom (*Alternaria alternata* f. sp. *citri* patótipo "tangerina"): processo infeccioso nas cultivares Ponkan, Murcott e Fremont

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Felipini, Ricardo Barbosa

Mancha-marrom (*Alternaria alternata* f.sp. *citri* patótipo tangerina): processo infeccioso nas cultivares Ponkan, Murcott e Fremont / Ricardo Barbosa Felipini. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

77 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Mancha-marrom 2. *Alternaria alternata* 3. Esporulação 4. Respostas de defesa I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família. À minha mãe, Vera Lúcia, por todo seu esforço em proporcionar minha criação e estudo. Às minhas irmãs, Débora, Eliza, Fernanda e Soraia, mulheres da minha vida À minha sobrinha Vitória, que veio demonstrar que a esperança e o amor sempre se renovam. Ao meu cunhado, Sandro Peixoto.

À

Anayr Rodrigues Barbosa

(in memoriam)

(1922-2017)

A quem dedico especialmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), na pessoa do Prof. Dr. José Carlos Fiad Padilha, então diretor do Centro de Ciências Agrárias (CCA). Além de seus ensinamentos durante a graduação (momento no qual fui aluno), demonstrou-se como gestor do CCA altamente compreensivo quanto ao aperfeiçoamento do corpo técnico (momento no qual fui servidor público no mesmo local);

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" por disponibilizar o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia e seu ambiente para desenvolvimento intelectual e profissional;

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior, por aceitar me orientar, mesmo sem me conhecer *a priori*¸ junto ao Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e não medir esforços para que o trabalho transcorresse com tranquilidade;

Ao Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" (IAC), nas pessoas dos pesquisadores Dr. Fernando Alves Azevedo e Dra. Marinês Bastianel, os quais compartilharam conhecimentos, material vegetal e o isolado fúngico do estudo;

Ao Prof. Sérgio Florentino Pascholati (ESALQ/USP) pelo esclarecimento de dúvidas e permissão para utilização irrestrita de equipamentos e reagentes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica;

Ao Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero (CCA/UFSC) pela primeira oportunidade para desenvolvimento de pesquisas na área de fitopatologia, a qual me trouxe até aqui, além dos ensinamentos, conselhos e amizade;

Aos professores com os quais cursei disciplinas onde pude obter amplo conhecimento na área da fitopatologia: Dr. Armando Bergamim Filho, Dr. Francisco André Ossamu Tanaka, Dr. José Belasque Júnior, Dr. José Otávio Machado Menten, Dra. Lilian Amorim, Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo;

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima (NAP/ESALQ) por possibilitar o uso de equipamentos e reagentes do Laboratório de Microscopia Eletrônica, e ao técnico Renato, do mesmo laboratório, por todo o auxílio durante as análises;

À pesquisadora Dra. Luana Aparecida Castilho Maro da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (EPAGRI/SC) pelo envio de material vegetal sintomático para isolamentos e início dos estudos;

À Dra. Dayse Zamira Delgado, a qual sempre esteve pronta a me aconselhar e apresentar ideias;

À minha amiga Renata Aparecida Brito, pessoa que tive a sorte de conhecer durante este curso, pelo companheirismo, amizade e paciência;

À Sthefaní Stoianovi Bonissoni “Repét”, estagiária durante o meu percurso no laboratório a qual me ajudou muito nos experimentos sobre esporulação;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, em especial Fabiana, Heloísa, Pedro, Rodolfo e Iraídes;

Aos colegas de laboratório Cláudio “X-pada”, Paulo “Mo(R)^2a”, Renata “Xis” e Thaís Boufleur; E a todos que de alguma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, quer seja pela ajuda física, intelectual ou somente por uma convivência harmoniosa.

SUMÁRIO

RESUMO.....8

ABSTRACT.....9

1. ESPORULAÇÃO DE *ALTERNARIA ALTERNATA* F.SP. *CITRI* PATÓTIPO "TANGERINA" *IN VITRO* 11

1.1. INTRODUÇÃO 12
1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....15
1.2.1. Planta e patógeno 15
1.2.2. Identificação molecular..... 15
1.2.3. Esporulação em meios de cultura e patogenicidade 16
1.2.3.1. Esporulação..... 16
1.2.3.2. Pigmentação de esporos produzidos *in vitro*..... 17
1.2.3.3. Patogenicidade..... 18
1.2.4. Germinação de esporos e formação de apressórios *in vitro*..... 18
1.2.5. Velocidade de crescimento micelial *in vitro*..... 19
1.2.6. Avaliação do desenvolvimento fúngico *in vitro* por microscopia eletrônica de varredura 19
1.2.7. Análise estatística..... 20
1.3. RESULTADOS 21
1.3.1. Identificação molecular..... 21
1.3.2. Esporulação em meios de cultura e patogenicidade 22
1.3.2.1. Esporulação..... 22
1.3.2.2. Pigmentação de esporos produzidos *in vitro*..... 23
1.3.2.3. Patogenicidade..... 24
1.3.3. Germinação de esporos e formação de apressórios *in vitro*..... 25
1.3.4. Velocidade de crescimento micelial *in vitro*..... 25
1.3.5. Avaliação do desenvolvimento fúngico *in vitro* por microscopia eletrônica de varredura 27
1.4. DISCUSSÃO 28

2. INTERAÇÕES ENTRE *ALTERNARIA ALTERNATA* F.SP. *CITRI* PATÓTIPO "TANGERINA" COM AS CULTIVARES PONKAN, MURCOTT E FREMONT..... 41

2.1. INTRODUÇÃO 42
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....44
2.2.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 44
2.2.2. Atividades enzimáticas em folhas..... 45
2.2.2.1. Quantificação de proteínas totais 46
2.2.2.2. Peroxidases (POX EC 1.11.1.7)..... 46
2.2.2.3. Catalases (CAT EC 1.11.1.6)..... 47
2.2.2.4. Superóxido dismutase (SOD EC 1.15.1.1)..... 47
2.2.3. Peróxido de hidrogênio 48

2.2.3.1. Quantificação de peróxido de hidrogênio nas folhas 48
2.2.3.2. Acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas 48
2.2.3.3. Sensibilidade de *Alternaria alternata* ao peróxido de hidrogênio *in vitro* 49
2.2.3.4. Quantificação de malondialdeído 49
2.2.4. Microscopia de luz (ML) 50
2.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 51
2.3. RESULTADOS 52
2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 52
2.3.2. Atividades enzimáticas em folhas 56
2.3.2.1. Peroxidases (POX EC 1.11.1.7) 56
2.3.2.2. Catalases (CAT EC 1.11.1.6) 56
2.3.2.3. Superóxido dismutase (SOD 1.15.1.1) 57
2.3.3. Peróxido de hidrogênio 58
2.3.3.1. Quantificação de peróxido de hidrogênio nas folhas 58
2.3.3.2. Acúmulo de peróxido de hidrogênio nas folhas 59
2.3.3.3. Sensibilidade de *Alternaria alternata* ao peróxido de hidrogênio *in vitro* 61
2.3.3.4. Quantificação de melondialdeído 62
2.3.4. Microscopia de luz (ML) 63
2.3.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 65
2.4. DISCUSSÃO 67

RESUMO

Mancha-marrom (*Alternaria alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina"): processo infeccioso nas cultivares Ponkan, Murcott e Fremont

A mancha-marrom de Alternaria causada pelo fungo *Alternaria alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina" é uma das principais doenças que acometem a cultivo de tangerinas (*Citrus reticulata*) e alguns de seus híbridos. A infecção ocorre principalmente em folhas e frutos jovens que senescem prematuramente. Para realização de estudos com a finalideade de obtenção de cultivares resistentes, ou para a compreensão dos processos de interação planta-patógeno, é necessária a produção massal de esporos *in vitro*. Este trabalho, no primeiro momento, buscou desenvolver um método eficaz de obtenção de esporos do fungo em meio de cultura. Para isso, comparou os efeitos de diferentes meios de cultura (BDA e $CaCO_3$-A) e tipos de iluminação (LED e NUV). Além do número de esporos, características como germinação, pigmentação, formação de apressórios e patogenicidade foram avaliadas. Descobriu-se que o melhor método de produção de esporos consistiu da manutenção de colônias em meio $CaCO_3$-A por 3 dias sob LED e em seguida por 4 dias sob NUV, com fotoperíodo de 12 h. A partir de então, no segundo momento, realizaram-se testes com técnicas de microscopia e bioquímica fitopatológica para analisar a interação entre o patógeno e folhas das cultivares suscetíveis Ponkan e Murcott e da resistente Fremont. Notou-se por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que, independentemente da cultivar, o fungo germinou sobre as folhas, formou apressórios e entrou em cavidades estomáticas. Não foi observada, porém, a colonização de tecidos por meio de microscopia de luz. As cultivares suscetíveis responderam à inoculação com acúmulo de peróxido de hidrogênio e reação de hipersensibilidade. A cultivar resistente, por sua vez, não apresentou reação de hipersensibilidade e aumentou a síntese de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (SOD e CAT) e eliminação de espécies reativas de oxigênio. Como se trata de um fungo necrotrófico capaz de detoxificar espécies reativas de oxigênio, presumiu-se que a reação de hipersensibilidade e a morte celular nas cultivares suscetíveis favorecem a infecção e colonização do patógeno, enquanto que na cultivar resistente a ausência de morte celular e detoxificação de espécies reativas de oxigênio podem estar envolvidas na sua capacidade de defesa. Nas cultivares suscetíveis, verificou-se, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), plasmólise e fragmentação de membranas plasmáticas, local indicado como sítio de ação da toxina ACT produzida pelo patógeno. As células da cultivar resistente não apresentaram plasmólise ou alterações nas membranas plasmáticas em decorrência da inoculação do patógeno.

Palavras-chave: Esporulação; Patogenicidade; Peróxido de hidrogênio; MEV; MET; SOD; CAT; Microscopia

ABSTRACT

Alternaria brown spot (*Alternaria alternata* f.sp. *citri* "tangerine" pathotype): infectious process in the cultivars Ponkan, Murcott e Fremont

Alternaria brown spot caused by *Alternaria alternata* f.sp. *citri* pathotype "tangerine" is a important disease that affects tangerine (*Citrus reticulata*), and some of its hybrids. The infection happens mainly in young leaves and fruits and may cause premature senescence of tissues. To carry out studies in order to obtain resistant cultivars, or to understand the processes of plant-pathogen interaction, it is necessary abundant *in vitro* spores production. This work, in the first moment, aimed to develop an efficient method for *in vitro* spore production of the fungus. It was compared the effects of different culture media (BDA and $CaCO_3$-A) and light (LED and NUV). Besides the number of spores, characteristics such as germination, pigmentation, apressoria formation and pathogenicity were investigated. It was found that the best method of spore production consisted of maintaining colonies on $CaCO_3$-A medium for 3 days under LED and then for 4 days under NUV, with photoperiod of 12 h. Thus, in the second moment, assays were carried out using microscopy and phytopathological biochemistry techniques to analyze the interaction between the pathogen and leaves of the susceptible cultivars Ponkan and Murcott, and the resistant Fremont. It was noted by scanning electron microscopy (SEM) that independently of the cultivar, the fungus germinated on the leaves, formed apressoria and grew into stomatal cavities. However, colonization of tissues was not observed by light microscopy. Susceptible cultivars responded to inoculation with accumulation of hydrogen peroxide and hypersensitivity reaction. The resistant cultivar did not show hypersensitivity reaction, but increased the synthesis of enzymes (CAT and SOD) related to oxidative stress and elimination of reactive oxygen species. As a necrotrophic pathogen able to detoxify reactive oxygen species, it was assumed that the hypersensitivity reaction and cell death in the susceptible cultivars contribute to infection and colonization of the pathogen. On the other hand, the absence of cell death and detoxification of reactive oxygen species verified in the resistant cultivar may be involved on its capacity of defense. Cell plamolysis and plasma membranes fragmentation, indicated as the site of action of the ACT toxin produced by the pathogen, were verified in the susceptible cultivars by transmission electron microscopy (TEM). , The cells of the resistant cultivar did not show plasmolysis or alterations in the plasma membranes due to pathogen inoculation.

Keywords: Sporulation; Pathogenicity; Hydrogen peroxide; SEM; TEM; SOD; CAT; Microscopy

1. ESPORULAÇÃO DE *Alternaria alternata* f.sp. *citri* PATÓTIPO "TANGERINA" *IN VITRO*

Resumo

A mancha-marrom de Alternaria causada pelo fungo *Alternaria alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina" é umas das principais doenças dessa cultura. O patógeno ataca folhas e frutos jovens, causando queda precoce. Para estudos dos seus mecanismos de patogenicidade ou de resistência das plantas, pode-se realizar a produção de esporos e inoculação *in vitro*. Contudo, muitos isolados de *Alternaria spp.* não esporulam bem nessas condições. Sabe-se que, fatores como luz e nutrição podem afetar tanto a fase de crescimento quanto a reprodução. Neste estudo, verificou-se a produção de esporos *in vitro* combinando-se diferentes tipos de iluminação (luz emitida por diodos – LED ou luz próxima ao ultravioleta – NUV) e dois tipos de meio de cultura (batata-dextrose-ágar – BDA ou carbonato de cálcio-sacarose-ágar – $CaCO_3$-A). Foram quantificados o número de esporos produzidos por unidade de área de colônia e as porcentagens de germinação de esporos, de formação de apressórios e de esporos pigmentados. Ainda, observou-se o aspecto de colônias e a esporulação por meio de microscopia eletrônica de varredura. Por fim, a agressividade do patógeno foi quantificada após a inoculação de folhas destacadas da cultivar de tangerina Ponkan. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento completamente casualizado. Maior quantidade de esporos foi obtida em colônias cultivadas em meio de cultura $CaCO_3$-A por três dias sob LED, e posterior transferência para luz NUV, por quatro dias. Esses esporos, apresentaram maior porcentagem de germinação, de pigmentação e características semelhantes da espécie. Os esporos produzidos em meio de cultura BDA, apresentaram menor porcentagem de germinação, pigmentação, porém, formaram maior porcentagem de apressórios *in vitro*, resultando em maior severidade da doença quando inoculados em folhas de tangerina. Contudo, suas características morfológicas foram diferentes das descritas para a espécie. Desta forma, foi possível desenvolver um método capaz de produzir esporos do fungo em grande quantidade *in vitro* e com capacidade de causar infecção quando inoculados no hospedeiro.

Palavras chave: Esporulação; Meio de cultura; LED; NUV; Patogenicidade

Abstract

Brown spot caused by the fungus *Alternaria alternata* f.sp. *citri* tangerine pathotype is one of the main diseases of tangerines. The pathogen infects young leaves and fruits causing early fruit drop and plant decline. Studies for understand pathogenicity's mechanisms of the fungus or resistance of the host can be carried out through *in vitro* production of spores followed by host inoculation. However, many strains of *Alternaria spp.* do not produce enough spores in these situations. It is known that light and nutrition can affect fungus growth and reproduction. In this study, it was verified the *in vitro* production of spores combining two types of illumination (Light-Emitting Diode – LED, and Near of Ultraviolet – NUV) and two culture medium (potato-dextrose-agar – PDA, and calcium carbonate agar – $CaCO_3$-A). It was quantified the number of spores per mm^2 of colony, germination (%), appressorium formation (%), and spores pigmentation. Additionally, it was observed the appearance of the

colonies and the sporulation by scanning electron microscopy. Lastly, the disease severity was quantified after inoculation on detached leaves of Ponkan tangerine. All experiments were carried out in completely randomized design. The highest number of spores was obtained from colonies grown for three days on $CaCO_3$-A medium under LED, and posteriorly kept for four days under NUV. These spores showed highest germination, pigmentation, and their morphology matched with the species description. The spores produced on PDA showed highest number of apressorium *in vitro,* and highest disease severity when inoculated on host leaves. However, spores produced on PDA showed different morphological characteristics from those described for the species. Thus, it was possible to develop a method for *in vitro* mass spores production with capacity of infecting the host.

Keywords: Sporulation; Culture medium; LED; NUV; Severity

1.1. Introdução

O Brasil é um dos principais produtores citrícolas do mundo. O desenvolvimento acentuado do setor principalmente a partir da segunda metade do século XX, porém, a partir no início século XXI, com o aparecimento de novos agentes patogênicos no país, a área de produção destinada à citricultura tem sido reduzida gradativamente. Entre 2000 e 2014, somente no estado de São Paulo, o cultivo de tangerineiras foi reduzido em mais de 58 %, conforme os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014).

Essa redução coincide com o período de detecção em território brasileiro do *Greening*, doença causada pela bactéria “Candidatus Liberibacter” e transmitida pelo psilídio *Diaphorina citri* (Coletta-Filho *et al.*, 2004). Essa doença veio somar a outros problemas fitossanitários que acometem cultivares de tangerinas Murcott e Fremont como o cancro-cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (Schwarz, 2009). Ainda nos primeiros anos do século XXI, registrou-se a presença do fungo *Alternaria alternata* f.sp. *citri* patótipo “tangerina” no estado do Rio de Janeiro, sendo que as duas principais cultivares (Ponkan e Murcott) (*Citrus reticulata*) cultivadas no Brasil são suscetíveis à doença (Goes *et al.*, 2001; Bassanezi *et al.*, 2016). A identificação de *A. alternata* a nível de patótipo leva em consideração aspectos morfolóficos, moleculares e de patogenicidade sobre hospedeiros específicos.

Fungos do gênero *Alternaria* apresentam conidióforos pigmentados com crescimento determinado ou simpodial e comprimento variável. Os conídios são pigmentados com septos horizontais e longitudinais, com crescimento acropetal, ou seja, produzidos sucessivamente em cadeias, sendo o do ápice mais jovem (Barnett & Hunter, 1986). Atualmente, além das características morfológicas utilizadas classicamente na taxonomia de fungos imperfeitos, estão sendo empregadas técnicas de biologia molecular principalmente para a separação em

nível de espécies (Woudenberg *et al.*, 2013, 2015b,a). Assim, sabe-se que o gênero é composto por um conjunto de espécies saprofíticas e patogênicas, as quais foram divididas em 26 seções. *Alternaria* seção *Alternaria* é onde se classificam importantes patógenos de plantas. Nesta seção, há 35 espécies que não são distinguíveis morfologicamente ou por técnicas de biologia molecular, e todas essas são denominadas *Alternaria alternata* (Woudenberg *et al.*, 2015b).

A classificação atual também reconhece algumas f.sp. como *A. alternata* f.sp. *mali* (mancha-de-alternaria em maçã), *A. alternata* f.sp. *fragariae* (mancha-de-alternaria em morangueiro) e *A. alternata* f.sp. *citri*, nesse último caso dividido em patótipo "tangerina" e patótipo "limão-rugoso", cuja separação baseia-se na síntese de fitotoxinas. Enquanto *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo "limão-rugoso" produz a toxina ACLR, que causa mancha-marrom em *C. jambhiri*, o patótipo "tangerina" (Figura 1) produz a toxina ACT, que causa mancha-marrom de Alternaria em *C. reticulata*. Essa divisão em patótipos inicialmente sugerida por NISHIMURA (1978) tem sido mantida em recentes estudos que abordam a taxonomia do gênero (Woudenberg *et al.*, 2015b).

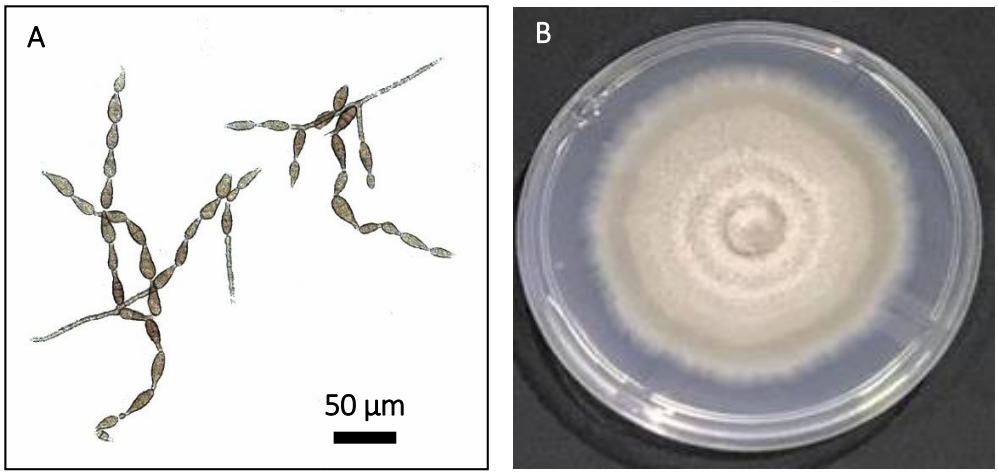

Figura 1. Em (A) conidióforos e conídios de *Alternataria alternata* patótipo tangerina, produzidos *in vitro* em meio $CaCO_3$-A. Observam-se a pigmentação de conídios formados em cadeia acropetal e conidióforos com crescimento simpodial. Em (B) colônia de *A. alternata* em meio de cultura BDA 7 dias após a repicagem (Fonte: Ricardo Felipini).

Independentemente do gênero, a partir de uma fonte de nutrientes contínua, o desenvolvimento fúngico tende a ocorrer de forma balanceada entre o crescimento e multiplicação celular. Sugere-se que sob condições *in vitro*, meios sólidos apresentam maior similaridade para microrganismos que parasitam folhas, frutos e ramos. Para obtenção desse crescimento *in vitro* de modo satisfatório, faz-se então necessário o fornecimento de

nutrientes e preferencialmente a adição de um agente solidificante que em muitos casos é o ágar (Griffin, 1994).

Em seguida ao crescimento vegetativo, alguns fatores ambientais podem desencadear alterações no metabolismo fúngico resultando na diferenciação celular para reprodução. Esse processo pode iniciar a partir da percepção de sinais ambientais que estimulam a esporulação, como nutrição, temperatura, luz, dióxido de carbono e umidade. Essa percepção por parte do microrganismo desencadeia a ativação de genes relacionados à esporulação. A influência de fatores nutricionais foi descrita inicialmente por Klebs (1899), o qual observou que: a exaustão de nutrientes cessava o crescimento vegetativo fúngico; células anteriormente bem nutridas, a partir da interrupção da nutrição entravam em fase de reprodução; a possibilidade de alteração na composição e proporção de nutrientes poderiam estimular a esporulação; condições nutricionais antes da transferência de um meio para outro influenciavam na esporulação; e que sais inorgânicos podem influenciar a reprodução e o vigor geral do fungo. Esses ficaram conhecidos como os Princípios de Klebs.

Fungos do gênero *Alternaria* são conhecidos como fungos de "luz/escuro" por apresentarem a característica da produção de conidióforos nos períodos nos quais estão submetidos à luz, enquanto os conídios são produzidos no escuro (Rotem, 1994). Uma das explicações para isso é a presença de pigmentos no fungo. Trione & Leach (1969) detectaram um pigmento que apresenta pico de absorção de ondas no comprimento de 310 nm, o qual denominaram de P310. Esse pigmento é produzido na presença da luz e estimula a esporulação de *A. chrysanthemi* e *A. dauci*, sugerindo-se, assim, que atue como um fotorreceptor. A utilização de luz com comprimentos de onda próximos ao ultravioleta (NUV) é algo constantemente utilizado para produção de esporos de fungos do gênero *Alternaria* (Aragaki, 1961; Leach, 1962, 1967; Pulz, 2007; Rodrigues *et al.*, 2010).

As lâmpadas fluorescentes do tipo tubular são frequentemente utilizadas para iluminação de salas de crescimento fúngico e câmaras de incubação do tipo BOD. Pulz (2007) avaliando a distribuição espectral de lâmpadas fluorescentes para esporulação de *A. solani* notou grande esporulação nos intervalos de 310-440 nm e 620-670 nm (Pulz & Massola, 2009), sendo que a primeira faixa abrange o comprimento de onda de absorção do pigmento "P_{310}" descrito por Trione & Leach (1969). Contudo, em alguns laboratórios as lâmpadas fluorescentes estão sendo substituídas por diodos emissores de luz (LED). Os LEDs podem apresentar comprimentos de onda variáveis em função da sua composição. Em relação às lâmpadas convencionais apresentam vantagens como maior durabilidade, tamanho reduzido e não aquecimento do ambiente (Massa *et al.*, 2008).

Porém, no caso de *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina" se observou a dificuldade de produção massal de esporos quando as colônias foram mantidas sob LED emissores de luz branca. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para produção massal de esporos do patógeno combinando o desenvolvimento fúngico sob LED e NUV sobre os meios de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e carbonato de cálcio-sacarose-ágar ($CaCO_3$-A).

1.2. Material e Métodos

1.2.1. Planta e patógeno

Mudas de tangerineiras das cultivares Ponkan foram gentilmente cedidas pelo Dr. Fernando Alves de Azevedo do Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" (Instituto Agronômico de Campinas), Cordeirópolis, SP. As mudas foram transplantadas para vasos contendo 20 L de solo autoclavado e mantidas em estufa na área experimental da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (Universidade de São Paulo), Piracicaba, SP. O manejo consistiu em irrigação, controle de ácaros, adubações periódicas e realização de podas.

O fungo *Alternaria alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina", isolado de plantas da cv. Murcott no município de Araras, SP, foi gentilmente cedido pela Drª Marinês Bastianel, do Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" (Instituto Agronômico de Campinas), Cordeirópolis, SP e foi aqui denominado de "CCSM – Araras, SP". O isolado foi inoculado em folhas das cultivares Ponkan e Murcott, a fim de confirmar a manutenção da sua patogenicidade, re-isolado por método indireto (Azevedo *et al.*, 2010) e conservado pelo método do papel filtro armazenados a -20 ºC (Gonçalves *et al.*, 2016). A patogenicidade do isolado foi mantida pela inoculação e re-isolamento periódicos.

1.2.2. Identificação molecular

Para extração de DNA, micélio de uma colônia de 10 dias de idade crescida em meio BDA foi macerado em areia autoclavada com pistilo e almofariz de porcelana. O DNA genômico isolado foi extraído com o kit "Wizard® Genomic DNA Purification" (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade de DNA foi estimada em espectrofotômetro (Nanodrop 2000®). A relação A260/A280 ($\geq$ 1,8) foi utilizada para avaliar

a pureza do DNA. A integridade do DNA foi verificada visualizando-se o perfil eletroforético de 1 µL de cada amostra em gel de agarose 1 % em tampão TBE 1X sob radiação ultravioleta em sistema de fotodocumentação. Ajustou-se a concentração de DNA para 25 ng.µL^{-1}. As amostras foram armazenadas a -20 ºC.

A confirmação da identidade do isolado de *A. alternata* utilizado nos experimentos (cedido pelo Centro de Citricultura, isolado de folha da cv. Tangelo Nova, município de Bebedouro, SP) foi realizada de acordo com Woudenberg *et al.* (2015b) e (Garganese *et al.*, 2016). Para isso, realizou-se amplificação e sequenciamento de regiões genômicas do gene ITS (540 pb) e parte do gene endo-PG (500 pb). Para a amplificação, usaram-se oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (de Hoog & Gerrits van den Ende, 1998) e EPG-specific e EPG-3b (Peever *et al.*, 2004) (Guerber *et al*., 2003), respectivamente.

Processou-se cada reação de amplificação com 12,5 µL de "Master Mix" (Promega); 8,5 µL de água livre de nucleases; 2 µL de cada *primer* (10 mM); 2 µL de DNA (±25 ng.µL^{-1}), totalizando 25 µL. O DNA dos isolados foi amplificado no termociclador T100 (Bio-Rad®). As condições para amplificação da região ITS (94 ºC por 1 min seguido de 40 ciclos de 94 ºC por 1 min; 58 ºC por 1 min; 72 ºC por 2 min) foram realizadas conforme descrito por De Hoog & Gerrits Van Den Ende (1998) e para endoPG (95 ºC por 2 min seguido de 35 ciclos de 95 ºC por 1 min; 50 ºC por 1 min; 72 ºC por 1 min) conforme Peever et al. (2004).

O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1 %, juntamente com o marcador de massa molecular DNA Ladder de 1Kb (Invitrogen®) e visualizado sob radiação ultravioleta em sistema de fotodocumentação. O produto da reação foi purificado com o kit "Wizard@ SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega®), seguindo-se as recomendações do fabricante e enviado para sequenciamento na empresa Macrogen®. A partir desses resultados, analisaram-se as fitas consenso através do software DNA Baser Assembler, e as mesmas foram comparadas inicialmente com 157 sequências depositadas no GenBank por (Woudenberg *et al.*, 2015b) e, posteriormente, a árvore filogenética foi construída a partir de 32 dessas sequências.

1.2.3. Esporulação em meios de cultura e patogenicidade

1.2.3.1. Esporulação

Nestes experimentos, buscou-se avaliar a esporulação do patógeno nos meios de cultura $CaCO_3$-A (30 g carbonato de cálcio, 20 g sacarose e 20 g de ágar. L^{-1}) (Azevedo *et al.*,

2010) ou BDA (Merck®) e submetido a diferentes condições de iluminação (luz emitida por diodos – LED ou luz próxima ao ultravioleta – NUV).

Primeiramente, o fungo preservado em pelo método do "papel filtro" (Gonçalves *et al.*, 2016) foi repicado para placas de Petri (9 cm Ø) contendo o meio BDA e cultivado pelo período de 10 dias em câmara de crescimento do tipo BOD. Essa fase foi denominada de "pré-desenvolvimento" vegetativo.

O fungo foi mantido em BOD com capacidade para 500 L. A temperatura foi ajustada para 27 ºC e fotoperíodo de 12 horas. A iluminação foi proporcionada por quatro fitas de LED fixadas no interior da porta de forma equidistante, totalizando 4,4 m e contendo ao total 264 diodos emissores de luz que, ao todo, forneciam 264 lúmens.

Os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri de poliestireno (9 cm Ø) contendo uma divisória ao meio. Em cada metade da placa foram depositados 10 mL de cada meio de cultura. Após solidificação, transferiram-se 23 discos miceliais (5 mm Ø) para cada metade da placa, obtidos a partir de colônias pré-desenvolvidas no meio BDA. Esse estágio foi denominado como fase de "desenvolvimento".

Em um dos tratamentos, as placas permaneceram em desenvolvimento por 7 dias consecutivos em BOD, enquanto que em outro, após 3 dias na câmara BOD, as placas foram transferidas para sala de crescimento sob luz NUV e fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 22 ºC, onde permaneceram 4 dias.

Ao final dos 7 dias, quantificaram-se os esporos em cada lado das placas. Isso foi realizado pela adição de 10 mL de água destilada estéril (ADE) sobre as colônias e raspagem com auxílio de um pincel (n.12). Em seguida, a suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze, e os esporos foram quantificados com o auxílio de um hemacitômetro. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado, com 4 repetições por tratamento. O experimento foi realizado duas vezes e os resultados expressam a análise conjunta dos dados.

1.2.3.2. Pigmentação de esporos produzidos *in vitro*

Para a avaliação da pigmentação de esporos produzidos *in vitro* o fungo foi cultivado conforme descrito no item anterior. Testaram-se os meios de cultura BDA e $CaCO_3$-A. O tratamento de luz consistiu somente da manutenção das colônias sob LED por 3 dias e em seguida 4 dias sob NUV. Obteve-se a suspensão dos esporos e realizou-se diluição até concentração de 1×10^3 esporos.mL^{-1}. Em seguida, 200 µL das suspensões de esporos foram colocados em microtubos com capacidade de 500 µL, onde adicionaram-se 60 µL de solução

de Azul de Amann (Êxodo Científica®). Os tubos foram agitados em vórtex por 10 s e mantidos em temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, montaram-se lâminas de microscopia onde se avaliou a pigmentação de 100 esporos por repetição. Para isso, adaptou-se a metodologia de (Oh *et al.*, 1998). Como não-pigmentados, consideraram-se aqueles esporos onde houve absorção do corante pelas paredes, os quais se tornaram azuis. O experimento foi conduzido uma vez em delineamento completamente casualizado com 4 repetições por tratamento.

1.2.3.3. Patogenicidade

As suspensões de esporos produzidos conforme descrito o item 1.2.3.1 tiveram suas concentrações ajustadas para 1×10^4 esporos.mL^{-1}. Posteriormente, inocularam-se folhas jovens da cv. Ponkan por aspersão. Cada unidade amostral foi composta por uma placa de Petri (9 cm Ø) contendo uma camada de papel filtro umedecida sobre a qual foram colocadas três folhas com a face abaxial voltadas para cima. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em BOD por 72 h.

Após esse período, as folhas foram digitalizadas em impressora multifuncional HP D1100 series, com resolução de 300 DPI. Em seguida, a proporção de área sintomática foi quantificada com o software Quant (Vale *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em porcentagem de área foliar sintomática. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado com 5 repetições por tratamento. O experimento foi realizado duas vezes e os resultados expressam a análise conjunta dos dados.

1.2.4. Germinação de esporos e formação de apressórios *in vitro*

Suspensões de esporos produzidas conforme descrito no item 1.2.3.1 tiveram suas concentrações ajustadas para 1×10^4 esporos.mL^{-1}. Em seguida, foram depositadas três gotas de 20 µL por placa de poliestireno (9 cm Ø) sem meio de cultura. As placas foram vedadas e mantidas em BOD durante 24 h. Em seguida, o processo de germinação foi interrompido pela adição de 5 µL de solução de Azul de Amann. A quantificação de esporos germinados e a formação de apressórios foram avaliados com auxílio de microscópio óptico. Como esporos germinados, consideraram-se aqueles cujo tubo germinativo estava maior que o seu comprimento (El Ghaouth *et al.*, 1994). Foram avaliados 100 esporos em cada gota. Cada unidade experimental foi uma placa de poliestireno contendo três gotas. O delineamento

experimental utilizado foi completamente casualizado com 3 repetições por tratamento. O experimento foi realizado duas vezes e os resultados expressam a análise conjunta dos dados.

1.2.5. Velocidade de crescimento micelial *in vitro*

Neste experimento, avaliou-se a velocidade de crescimento micelial do fungo nos diferentes meios de cultura (BDA e $CaCO_3$-A). Assim, colônias fúngicas foram pré-desenvolvidas em BDA a partir do isolado conservado em papel filtro, por 10 dias. Em seguida, um disco micelial foi repicado para o centro de placas de Petri (9 cm Ø) contendo 20 mL de BDA ou $CaCO_3$-A. As placas foram mantidas em BOD durante cinco dias. Diariamente, o diâmetro de cada colônia foi avaliado em sentidos ortogonais com auxílio de um paquímetro. A velocidade de crescimento micelial foi quantificada conforme (Oliveira, 1991). O experimento foi realizado uma vez e conduzido em delineamento completamente casualizado com cinco repetições por tratamento.

1.2.6. Avaliação do desenvolvimento fúngico *in vitro* por microscopia eletrônica de varredura

Para avaliação do desenvolvimento fúngico sobre os meios de cultura BDA ou $CaCO_3$-A, inicialmente se realizou com o pré-desenvolvimento de colônias em meio de cultura BDA, seguindo-se da repicagem para placas de Petri com divisória ao meio, nos mesmos moldes descritos no item 1.2.3.1. O tratamento de luz consistiu da manutenção das placas em BOD com LED por 3 dias e em seguida sob NUV por 4 dias.

Após esse período, coletaram-se *plugs* (5 mm Ø) das colônias fúngicas, os quais foram submetidos ao processo de pré-fixação em solução de Karnovsky (1965) modificada. Para isso, após a imersão nessa solução foram submetidos a 5 sessões de vácuo (-400 mmHg) durante 20 s. Após completa pré-fixação, os discos foram lavados em tampão cacodilato 0,2 M (pH 7,2) por 30 min e em seguida pós-fixados em vapor de tetróxido de ósmio (1 %) durante 12 h. As amostras foram desidratadas em acetona com concentrações crescentes (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e três vezes 100 %), durante 30 min em cada etapa e em seguida submetidas a equipamento de “ponto-crítico” EM CPD 300 (Leica®).

Para visualização das amostras, as mesmas foram coladas em *stubs* com fita dupla-face de carbono (EMS®), metalizadas por 180 s em equipamento “sputter coater” (Baltec SCD

050), e observadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP no Laboratório de Microscopia Eletrônica (NAP/ESALQ). Cada tratamento contou com três repetições.

1.2.7. Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento completamente casualizado e as análises estatísticas realizadas através do software Statistica 6.0. Para isso, inicialmente verificou-se a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett ($p<0,05$). Satisfeita a condição para a análise paramétrica, efetuou-se a análise de variância e o teste de Fischer ($p<0,05$). Quando necessário, a separação de médias foi realizada pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) ($p<0,05$).

1.3. Resultados

1.3.1. Identificação molecular

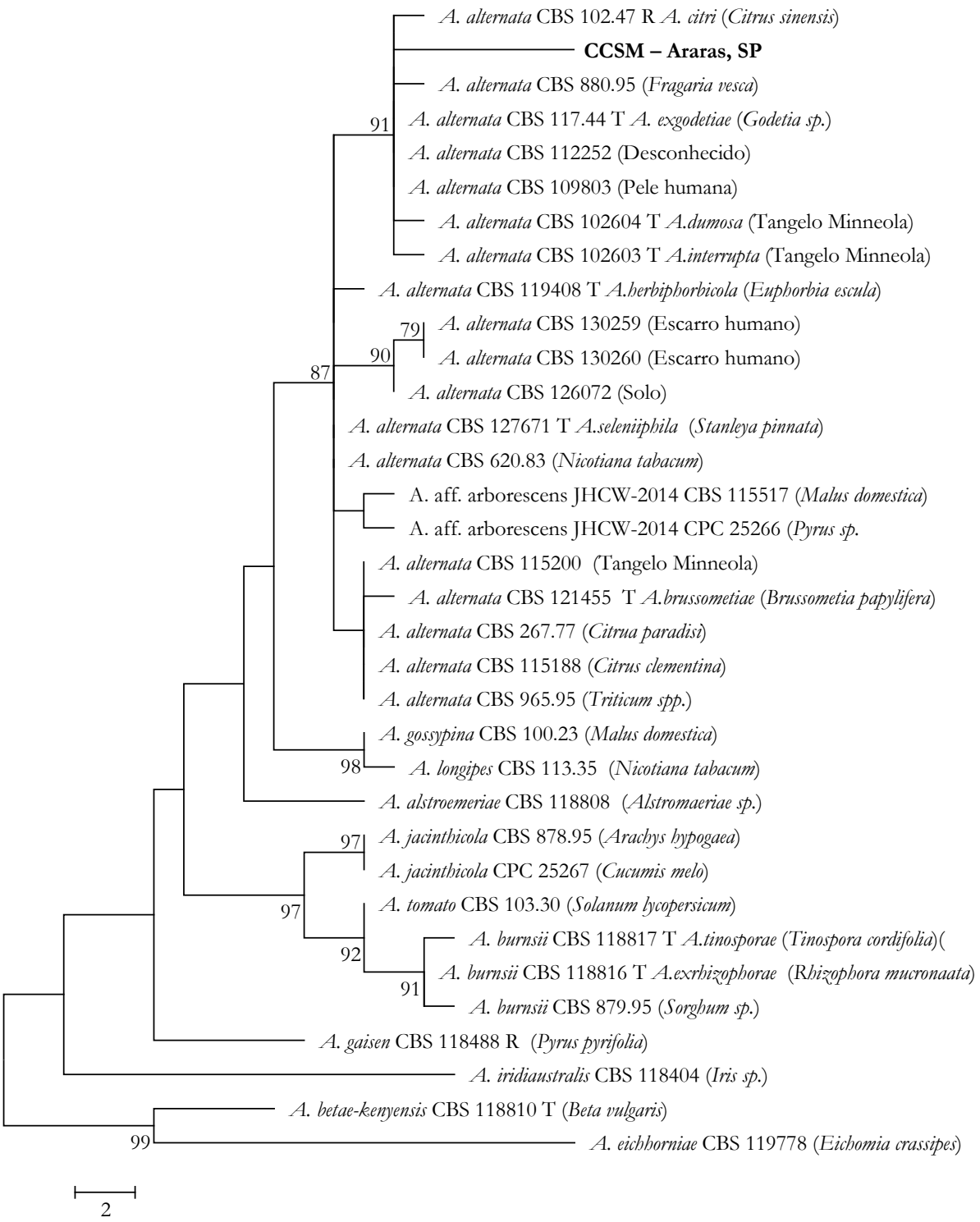

Figura 2. Árvore filogenética gerada por Parcimônia (P) e por Inferência Bayesiana da região ITS e de parte do gene endopoligalactonase (EndoPG) do isolado "CCSM – Araras, SP" patogênico às tangerinas cvs. Ponkan e Murcott. Os valores de bootstrap ≥70% e probabilidade posterior ≥0,90 estão anotados acima dos nós. A barra de escala representa o número de substituições por sítio.

As sequências do ITS e EndoPG concatenadas foram comparadas, inicialmente, com as sequências depositadas por Woudenberg et al. (2015b) no GenBank para 157 isolados. Em seguida, as sequências para comparação foram reduzidas para 34, conforme (Garganese et al., 2016), cujo resultado é mostrado na Figura 2. A árvore filogenética demonstra que o isolado CCSM-Araras, SP, agrupou-se, em um clado estatisticamente bem suportado, com isolados de A. alternata obtidos de diferentes hospedeiros vegetais (*C. sinensis*, Tangelo Mineola, *Fragaria vessa*, etc.). Porém, por essa análise, não foi possível diferenciá-lo do fungo isolado de pele humana.

1.3.2. Esporulação em meios de cultura e patogenicidade

1.3.2.1. Esporulação

Quando o fungo foi mantido durante todo o período do experimento (7 dias) sob as condições da BOD (LED), não foram detectados esporos pelo método de contagem com câmara de Neubauer, independente do meio de cultura utilizado. Entretanto, quando as placas foram mantidas por 3 dias em BOD sob LED e posteriormente transferidas para NUV por 4 dias, houve esporulação em ambos meios de cultura. Na Figura 3, pode-se observar que a quantidade de esporos por cm^2 de colônia no meio de cultura $CaCO_3$-A foi mais de 100 vezes superior quando comparada à produção de colônias mantidas em meio de cultura BDA.

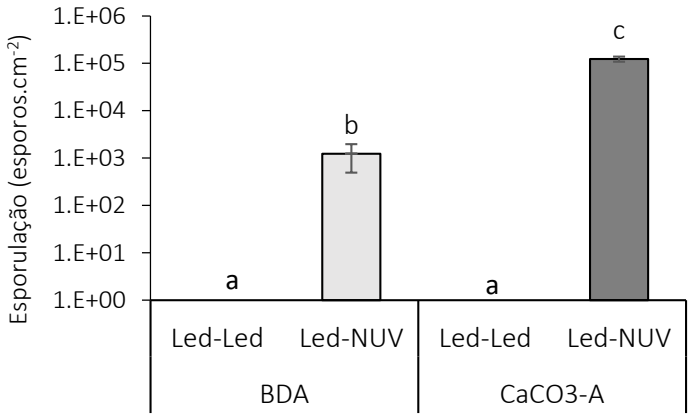

Figura 3. Esporulação de *A. alternata* nos meios de cultura BDA e $CaCO_3$-A em placas de Petri submetidas à luz emitida por diodos (LED) por 3 dias e seguidas por mais 4 dias sob a mesma luz, ou, em seguida transferidas por mais 4 dias sob luz próxima ao ultravioleta (NUV). As médias representam a análise conjunta de dois experimento distintos. Médias seguidas da mesma não diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Kels ($p<0,05$).

1.3.2.2. Pigmentação de esporos produzidos *in vitro*

A porcentagem de esporos totalmente pigmentados, produzidos em ambos os meios de cultura, foi considerada característica indicativa da maturação fisiológica dos mesmos (Figura 6). Conforme demonstrado na Figura 4, em média 80 % dos esporos produzidos no meio de cultura $CaCO_3$-A apresentavam-se completamente pigmentados, enquanto àqueles produzidos em BDA, a média de esporos pigmentados foi de 14%. Os exemplos de esporos não pigmentados e pigmentados podem ser observados na Figura 5 (A e B).

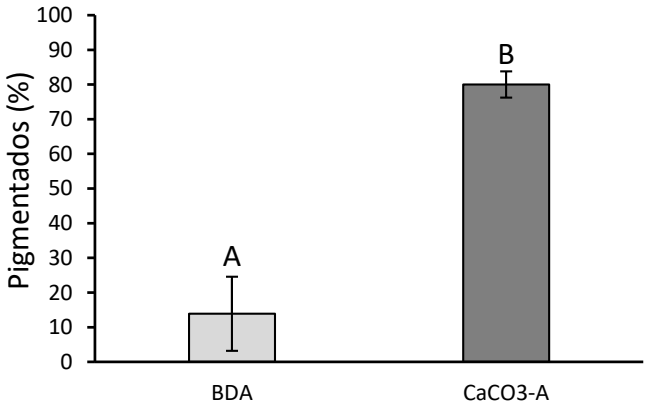

Figura 4. Pigmentação de esporos de *A. alternata* produzidos nos meios de cultura BDA e $CaCO_3$-A. As médias representam o resultado de um experimento. Houve diferença entre os tratamentos pelo teste de Fischer ($p<0.05$).

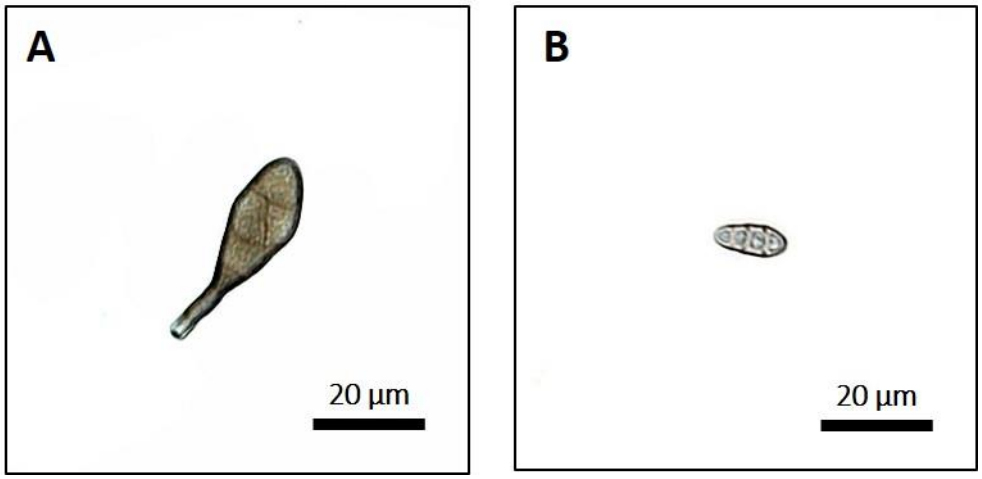

Figura 5. Em (A) se observa um exemplo de esporo completamente melanizado, enquanto em (B) outro esporo parcialmente melanizado, indicado pela absorção do corante Azul de Amann.

1.3.2.3. Patogenicidade

Após a observação de qual foi o método mais adequado para a produção de esporos em quantidade suficiente para a realização dos bioensaios, buscou-se averiguar a viabilidade desses para causar doença. Quando inoculados sobre folhas da cultivar Ponkan, aqueles produzidos em meio de cultura BDA apresentaram maior agressividade, como demonstrado pela maior severidade da doença (Figura 6). A Figura 7 demonstra a severidade da doença 72 horas após a inoculação (HAI).

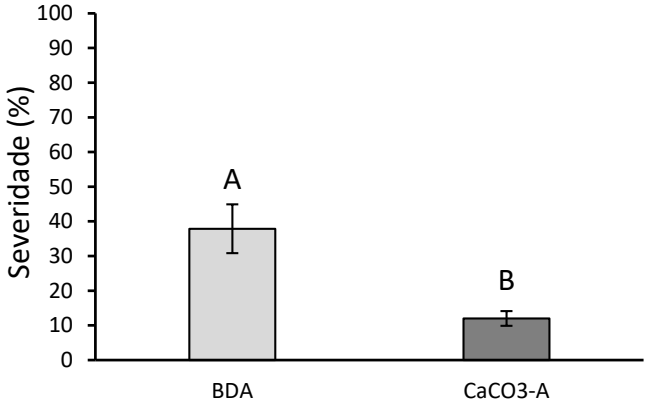

Figura 6. Severidade da mancha-marrom de Alternaria em folhas de tangerina da cv. Ponkan. As folhas destacadas foram inoculadas com suspensões de esporos (1×10^4 esporos.mL^{-1}) produzidos em diferentes meios de cultura, e avaliadas 72 HAI. As médias representam a análise conjunta de dois experimentos distintos. Houve diferença entre os tratamentos de acordo com o teste de Fischer ($p<0.05$).

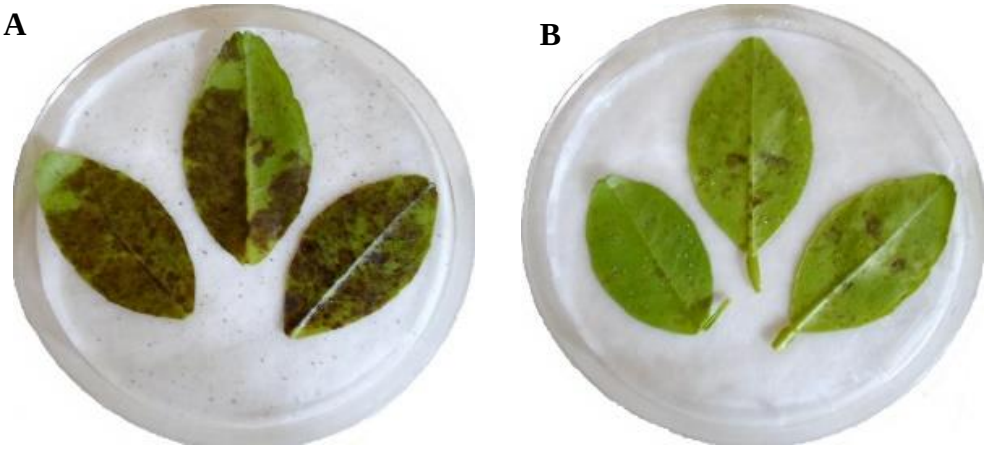

Figura 7. Severidade da mancha-marrom de Alternaria em folhas de tangerina da cv. Ponkan. As folhas destacadas foram inoculadas com suspensões de esporos (1×10^4 esporos.mL^{-1}) produzidos em meio de cultura BDA (A) ou $CaCO_3$-A (B) e avaliadas 72 HAI.

1.3.3. Germinação de esporos e formação de apressórios *in vitro*

Conforme se pode observar na Figura 8, houve diferença na porcentagem de esporos germinados oriundos dos diferentes meios de cultura testados. Em média, a germinação de esporos foi 38 % maior quando produzidos no meio de cultura $CaCO_3$-A em comparação àqueles produzidos no meio BDA. Contudo, quando se comparou a diferença na formação de apressórios *in vitro* dos esporos germinados produzidos nos diferentes meios, em média 8 % dos esporos produzidos em BDA que germinaram apresentaram apressórios, enquanto que naqueles produzidos em $CaCO_3$-A a formação de apressórios foi ocasional não atingindo 0,5 %.

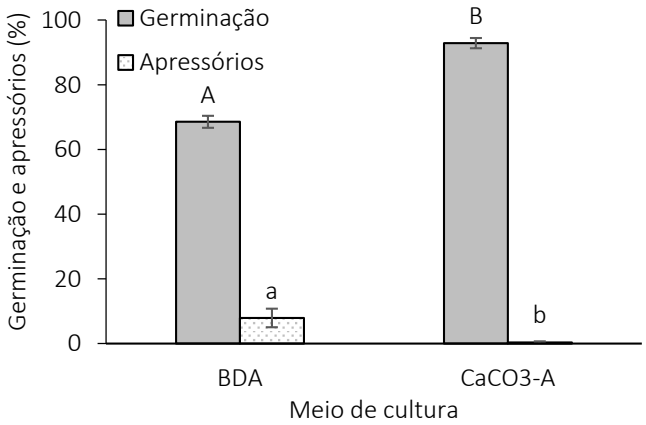

Figura 8. Germinação de esporos e formação de apressórios *in vitro* de esporos de *A. alternata* produzidos em BDA e $CaCO_3$-A. As médias representam os resultados de um experimento. Houve diferença na porcentagem de esporos germinados e na porcentagem de formação de apressórios pelo teste de Fischer ($p<0,05$). Letras maiúsculas comparam a porcentagem de germinação e letras minúsculas a porcentagem de apressórios.

1.3.4. Velocidade de crescimento micelial *in vitro*

Outro parâmetro avaliado no desenvolvimento de *A. alternata* sob condições *in vitro* foi seu crescimento radial nos meios de cultura BDA e $CaCO_3$-A. O experimento foi conduzido por 5 dias, até que as colônias atingissem cerca de 2/3 do diâmetro das placas. Por meio do índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), pode-se notar que o fungo no meio $CaCO_3$-A cresceu em média 1.36 mm por dia a mais que no meio BDA. Ao final do experimento, observou-se que as colônias em $CaCO_3$-A estavam cerca de 12 % maiores. O crescimento se desenvolveu linearmente ao longo dos 5 dias de experimento como visto na Figura 9.

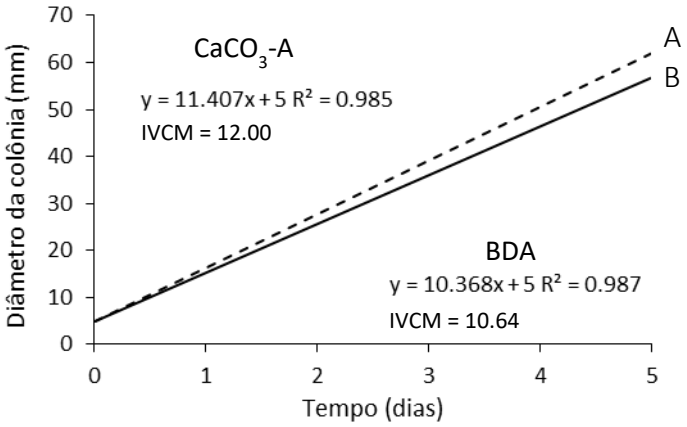

Figura 9. Crescimento radial de colônias de *A. alternata* nos meios de cultura BDA (linha contínua) e $CaCO_3$-A (linha tracejada). Observa-se maior Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de colônias em meio $CaCO_3$-A em relação ao meio BDA. O experimento foi realizado uma vez. Houve diferença estatística através do teste de Fischer ($p<0,05$).

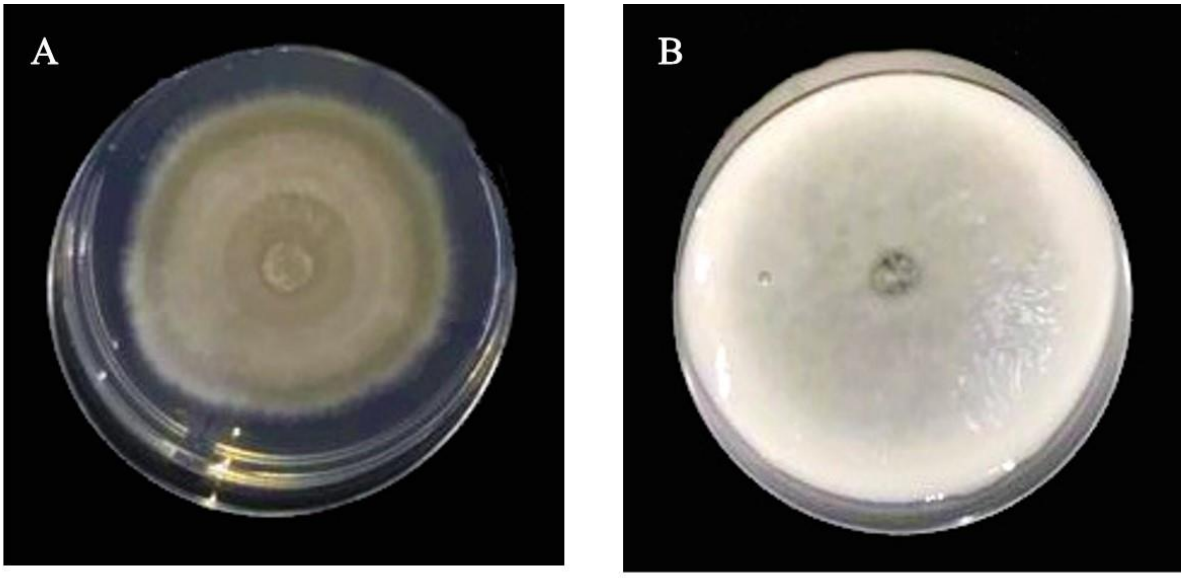

Figura 10. Colônias de *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina" 5 dias após a repicagem para os meios de cultura BDA (A) e $CaCO_3$-A (B).

Visualmente, pode-se observar que as colônias crescidas em meio de cultura BDA aparentavam crescimento micelial mais denso (Figura 10 A) em relação àquelas crescidas no meio de cultura $CaCO_3$-A (Figura 10 B), apesar de apresentar crescimento radial mais rápido nesse segundo meio de cultura.

1.3.5. Avaliação do desenvolvimento fúngico *in vitro* por microscopia eletrônica de varredura

Por meio de microscopia eletrônica de varredura foi possível constatar que o fungo apresentou crescimentos vegetativo e reprodutivo diferentes entre os meios de cultura. No meio de cultura BDA houve abundante crescimento vegetativo, confirmando-se o que havia sido percebido experimento de velocidade de crescimento micelial. As Figura 11 A, C e D representam o que foi verificado nesse meio de cultura e essa sequência de imagens refere-se a aumentos sucessivos do mesmo local de observação. Nos maiores aumentos, é possível constatar que houve a formação abundante de conidióforos porém baixa formação de esporos. Os poucos esporos observados aparecem de forma única nos conidióforos, diferindo portanto da característica da espécie que é a formação de esporos em cadeia.

Os resultados do crescimento fúngico no meio $CaCO_3$-A estão demonstrados nas Figuras 11 B, D e F, com fotomicrografias obtidas da mesma região da colônia em aumentos crescentes. Novamente, ficou evidente a menor densidade de micélio conforme previamente observado e descrito nos resultados do item 1.3.4. A partir das Figuras 11 D e F, foi possível notar a presença de conídios e conidióforos. Principalmente na Figura 11 F, pode-se observar a presença de numerosos esporos do fungo. Apesar de não estarem ligados, aparentemente tratam-se de conídios em cadeia característicos da espécie. Sugere-se que a catenulação foi desmontada devido ao processamento prévio das amostras (fixação e/ou desidratação).

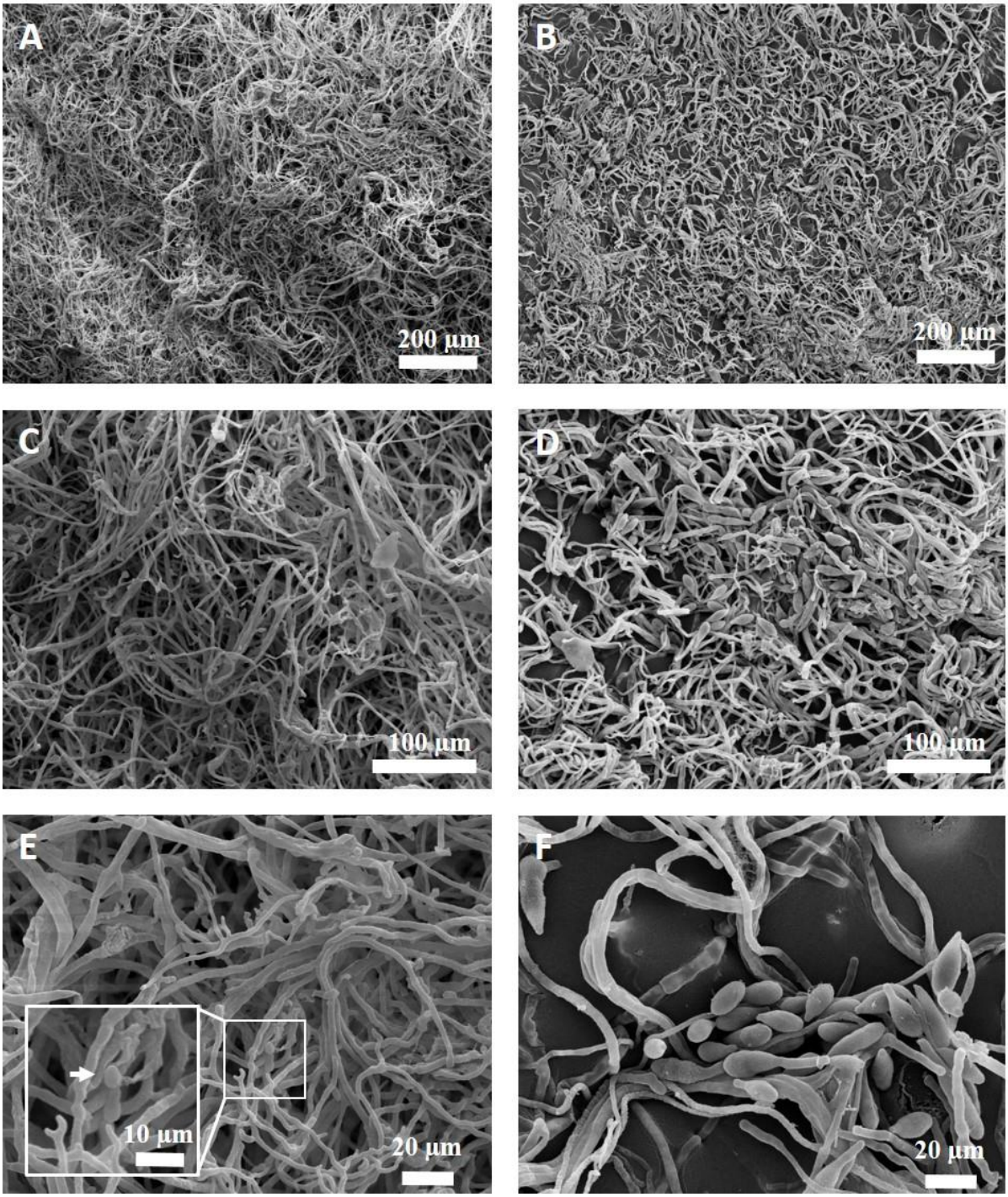

Figura 11. Fotomicrografias de *A. alternata* crescido em nos meios de cultura BDA (A, C, D) e $CaCO_3$-A (B, D, F). O fungo permaneceu sob LED por 3 dias e, posteriormente, sob NUV por 4 dias. As imagens se referem à mesma região de cada tratamento com aumentos crescentes. A seta em E destaca a presença de um conídio.

1.4. Discussão

A mancha-marrom de Alternaria em tangerinas é uma das principais doenças fúngicas da cultura (Bassanezi *et al.*, 2016) e uma das estratégias para seu controle tem sido a

busca por genótipos resistentes. É frequente, na literatura, trabalhos que avaliam a resistência de genótipos ou os mecanismos de patogenicidade do fungo utilizando técnicas com folhas destacadas (Kohmoto *et al.*, 1993; Azevedo *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2012; Bastianel *et al.*, 2014; Michielin *et al.*, 2016).

Contudo, a produção de esporos de fungos do gênero *Alternaria* sob condições *in vitro* para a realização de experimentos se mostra como um desafio, sobretudo para as espécies com esporos grandes e solitários como *A. solani* (pinta-preta da batata) (Rotem, 1994; Rodrigues *et al.*, 2010) e *A. dauci* (mancha-de-alternaria em cenoura) (Pulz & Massola, 2009). Para espécies que produzem esporos em cadeia como *A. cucumerina* (mancha-de-alternaria em curcubitáceas) e *A. alternata* (agente causal de diversas doenças em plantas) há maior facilidade de esporulação *in vitro* (Rotem, 1994). O processo de crescimento vegetativo e diferenciação de estruturas fúngicas para reprodução é influenciado por diferentes fatores como temperatura, umidade, gases (ex: CO_2), luz e nutrição (Griffin, 1994).

Diferentemente do relatado para *A. alternata* por Rotem (1994), os resultados deste estudo demonstraram que o patótipo "tangerina" dessa espécie mostrou dificuldade para produção de esporos de acordo com o tipo de luz e o meio de cultura. Observou-se, por exemplo, quando se utilizou um método para produção de esporos já relatado na literatura (Azevedo *et al.*, 2010), que ao se utilizar iluminação emitida por diodos (LED) o patógeno não produz esporos em meio de cultura. Assim, sabendo-se que fungos do gênero *Alternaria* normalmente são induzidos à esporulação pela luz próxima ao ultravioleta (NUV), avaliou-se a combinação dos dois tipos de iluminação para a produção de esporos em quantidades adequadas à realização de bioensaios *in vitro*.

Para isso, utilizou-se um isolado fúngico obtido de folhas de tangerinas oriundas do município de Araras, SP. O isolado foi devidamente identificado como sendo a espécie *Alternaria alternata* através dos sequenciamentos dos genes ITS e endoPG conforme descrito por Woudenberg *et al.*, (2015b) e Garganese *et al.*, (2016).

Todos experimentos foram conduzidos com fotoperíodo pois se sabe que fungos do gênero *Alternaria spp.* são dependentes de uma fase clara e outra escura para diferenciação de estruturas reprodutivas. Enquanto a formação dos conidióforos ocorre durante o período luminoso, a formação de conídios acontece no período escuro (Witsch & Wagner, 1955; Leach, 1967; Rotem, 1994). Porém, no presente estudo, verificou-se que mesmo quando as colônias fúngicas permaneceram durante todo o período de condução do experimento (7 dias) sob LED com fotoperíodo de 12 h, não houve produção de esporos em meio de cultura, destacando-se apenas crescimento mais denso de estruturas somáticas em meio BDA quando

comparado ao meio $CaCO_3$-A, apesar do crescimento radial das colônias nesse último ser ligeiramente mais rápido.

Enquanto comprimentos de onda da luz azul inibem a esporulação de fungos do gênero *Alternaria spp.* (Vakalounakis & Christias, 1986), sabe-se que a luz NUV induz a esporulação em uma ampla gama de espécies de diferentes gêneros (Leach, 1962; Rotem, 1994). Rotineiramente, há indicação de utilização de lâmpadas do tipo fluorescente em câmaras de crescimento de fungos (Dhingra, 1985; Zauza *et al.*, 2016). Ao avaliar a distribuição espectral de lâmpadas fluorescentes de luz branca, Pulz (2007) relatou que uma parte da radiação emitida por essas lâmpadas ocorre em torno de 314 nm, ou seja, parte da radiação emitida por lâmpadas fluorescentes convencionais é NUV. Para *Alternaria solani*, é conhecido desde a década de 1960 que radiação com comprimento de onda de 310 nm favorece a esporulação (Aragaki, 1961) e para *A. cichorii* comprimentos de onda entre 300 e 400 nm induzem a formação de conídios e conidióforos (Vakalounakis & Christias, 1986).

Porém, com a utilização de iluminação através de LEDs, não foi observada esporulação do patógeno, independente do meio de cultura testado. Assim, buscou-se adaptar o método para a utilização de combinação de LED com luz NUV o que se mostrou adequado. A possibilidade desta integração entre dois tipos de iluminação pode ser explicada por características de microrganismos do gênero *Alternaria spp.* como descrito por Rotem (1994). Conforme esse autor, o processo de esporulação pode ser descrito por duas fases distintas. Na primeira, as células-mãe dos conidióforos são induzidas a se diferenciarem em células reprodutivas por fatores como exaustão nutricional, presença de CO_2, umidade, etc.. Na segunda etapa, há a indução de conidióforos para que esses passem a produzir esporos, sendo essa segunda fase dependente de luz, principalmente, NUV (Leach, 1962, 1967). Assim, especula-se que apesar de inicialmente as colônias permanecerem sob LED, os quatro dias subsequentes expostos ao NUV seriam suficientes para estimular a esporulação e pigmentação dos esporos.

Sugere-se, inclusive, que a presença de pigmentos esteja relacionada ao processo de esporulação de alguns fungos, os quais atuariam como fotorreceptores conforme relatado por Leach (1965). Nesse trabalho, o autor identificou um componente induzido por luz NUV envolvido na esporulação de *A. chrysanthemi*, denominando-o "fator de esporulação P_{310}". Esse pigmento foi produzido quando as colônias foram expostas à luz NUV, enquanto aquelas que permaneceram no escuro não o sintetizaram. Salienta-se porém, que o pigmento "fator de esporulação P 310" não é o único sintetizado por fungos do gênero *Altenaria spp.*. Kawamura et al. (1999), estudando a influência da biossíntese de melanina na esporulação de *A. alternata*

patótipo “pêra-japonesa”, notou que seu bloqueio alterou o tamanho dos esporos e o número de septos. Porém, entre as principais funções da melanina está a proteção contra radiação UV conforme demonstrou expondo esses esporos a esse tipo de radiação.

Nas avaliações realizadas neste trabalho, notou-se menor pigmentação de conídios de *A. alternata* quando as colônias foram cultivadas em meio de cultura BDA em comparação ao meio $CaCO_3$-A, ambos expostos à luz NUV. Destaca-se, porém, que no presente trabalho não se fez a diferenciação de quais tipos de pigmentos foram produzidos pelo fungo. Assim, com base nos resultados deste estudo, colônias de *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo “tangerina” crescidas no meio de cultura $CaCO_3$-A além de produzirem esporos em maior quantidade, também os produz com características morfológicas mais próximas do que é descrito na literatura para a espécie (Simmons, 2007), onde se destaca a produção de esporos pigmentados.

Além da influência do tipo de luz sobre a esporulação do agente causal da mancha-marrom de Alternaria, observou-se também que o tipo de meio de cultura foi outro fator importante. A maior esporulação ocorreu no meio de cultura $CaCO_3$-A, ou seja, um meio de cultura com alta quantidade de carbono, fornecido pela sacarose da sua composição, além do sal inorgânico carbonato de cálcio. O meio de cultura BDA, onde houve menor esporulação e menor pigmentação dos esporos, por sua vez, é produzido à base de caldo de batata, com adição de dextrose, podendo ser considerado, portanto, um meio mais rico nutricionalmente.

O estudo sobre a influência de aspectos nutricionais sobre a esporulação de fungos foi pioneiramente desenvolvido por Klebs (1899). Esse, no final do século detectou XIX, verificou que células fúngicas bem nutridas entravam em fase de reprodução à medida que ocorria a exaustão de nutrientes. Ainda verificou a influência de sais inorgânicos sobre a esporulação fúngica. A partir dessas evidências, pode-se fazer um paralelo com o método aqui desenvolvido para esporulação de *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo “tangerina”.

Pelos experimentos aqui desenvolvidos, a metodologia pode ser descrita em três fases: “pré-desenvolvimento”, “desenvolvimento” e “esporulação”. Na fase de “pré-desenvolvimento”, o fungo é recuperado a partir da sua preservação pelo método do papel filtro e colocado em meio BDA por 10 dias com iluminação de LED e fotoperíodo de 12 h. Como já descrito, o meio BDA pode ser considerado um meio rico em nutrientes, o que proporciona o crescimento fúngico vigoroso e células bem nutridas. Na segunda fase, chamada “desenvolvimento”, ocorre a repicagem dessas colônias vigorosas para o meio de cultura $CaCO_3$-A as quais permanecem por três dias sob LED e mesmo fotoperíodo. Nessa fase, é possível observar que há crescimento vegetativo fúngico a partir dos *plugs* de meio de

cultura BDA repicados e o fungo passa a crescer no novo meio $CaCO_3$-A. Ou seja, as duas primeiras fases assemelham-se aos “princípios de Klebs” (Klebs, 1899), quando o fungo passa de um meio de cultura “rico” para outro “pobre” em nutrientes. Na terceira fase, denominada aqui de “esporulação”, as colônias são então expostas à luz NUV, onde permanecem por quatro dias, também com fotoperíodo de 12 h, onde finalmente são induzidas à formação de esporos. Assim, coadunam-se alguns princípios de Klebs (1899) com informações mais específicas para a esporulação de fungos do gênero *Alternaria spp.*, como à indução por luz NUV (Leach, 1962, 1965, 1967; Trione & Leach, 1969; Pulz, 2007).

Quando os esporos produzidos nos dois diferentes meios de cultura foram inoculados em folhas de tangerinas da cv. Ponkan notou-se que os esporos produzidos em meio de cultura BDA resultaram em maior severidade da doença. Esses esporos, apesar de germinarem em média 25 % menos em relação aos produzidos no meio de cultura $CaCO_3$-A, cerca de 7 % dos que germinaram formaram apressórios após 24 h, enquanto que dos esporos produzidos em $CaCO_3$-A, apenas 0,33 % apresentavam apressórios. Os apressórios são estruturas que se desenvolvem a partir dos tubos germinativos e estão envolvidos com a adesão e penetração de fungos em plantas (Griffin, 1994). No entanto, apesar de causar maior severidade de doença, esses esporos produzidos em BDA, além de serem em menor quantidade, são muito distintos morfologicamente do que descrito para a espécie (Barnett & Hunter, 1986; Simmons, 2007).

Desta forma, através dos estudos aqui realizados, desenvolveu-se uma nova metodologia para produção massal de esporos de *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo “tangerina”. Essa metodologia pode ser empregada combinando-se a utilização de meios de cultura BDA e $CaCO_3$-A e iluminação do tipo LED e NUV.

Referências

Akimitsu K, Kohmoto K, Otani H, Nishimura S, 1989. Host-specific effects of toxin from the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata* on mitochondria. *Plant physiology* **89**, 925–931.

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E, 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* **24**, 1337–1344.

Aragaki M, 1961. Quality of radiation inhibitory to sporulation of *Alternaria tomato*. *Phytopathology* **51**, 803–805.

Araujo L, Paschoalino RS, 2015. Microscopic Aspects of Silicon-Mediated Rice Resistance to Leaf Scald. *Phytopathology*.

Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ, 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* **104**, 280–292.

Azevedo FA, Polydoro DA, Bastianel M *et al.*, 2010. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação in vitro e in vivo de *Alternaria alternata*. *Revista Brasileira de Fruticultura* **32**, 944–951.

Barnett HL, Hunter BB, 1986. *Illustrated genera of imperfect fungi*. New York: New York Macmillan.

Bassanezi RB, Silva Jr. GJ, Feichtenberger E, Belasque Jr. J, Behlau F, Wulff NA, 2016. Doenças dos Citros. In: Amorim L,, Rezende JAM,, Bergamim Filho A,, Camargo LEA, eds. *Manual de Fitopatologia*. Ouro Fino: Ceres, 292–293.

Bastianel M, Simonetti LM, Schinor EH *et al.*, 2014. Avaliação do banco de germoplasma de mexericas com relação a características físico-químicas e suscetibilidade à mancha marrom de alternária. *Bragantia* **73**, 23–31.

Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–54.

Carvalho DDC, Alves E, Barbosa Camargos R *et al.*, 2011. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. *Revista Iberoamericana de Micologia* **28**, 173–178.

Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA *et al.*, 2004. First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus* Liberibacter asiaticus") in Brazil. *Plant Disease* **88**, 1382–1382.

Daudi A, O'Brien JA, 2012. Protocolo DAB. *Bio-protocol* **2**, 20–23.

Dehpour AA, Majd A, Alavi S V., 2010. Histopathological studies with electron microscopy (SEM & TEM) of *Alternaria alternata*, causal agent of brown spot and black rot diseases (as postharvest diseases) on citrus in the North of Iran. In: *Acta Horticulturae*. 1655–1662.

Dhingra DO, 1985. *Basic Plant Pathogen Methods*. Boca Raton: CRC Press.

Dita MA, Brommonschenkel S, Mizubuti ESG, 2007. Histopathological study of the *Alternaria solani* infection process in potato cultivars with different levels of early blight resistance. *Journal of Phytopathology* **155**, 462–469.

Feichtenberger E, Bassanezi BB, Spósito MB, Berlasque Jr. J, 2005. Doenças dos citros. In: Kimati H,, Amorim L,, Rezende JAM,, Bergamim Filho A,, Camargo LEA, eds. *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Ceres, 239–269.

Felipini RB, Boneti JI, Katsurayama Y *et al.*, 2016. Apple scab control and activation of plant defence responses using potassium phosphite and chitosan. *European Journal of Plant Pathology*.

Garganese F, Schena L, Siciliano I *et al.*, 2016. Characterization of Citrus-Associated *Alternaria* Species in Mediterranean Areas. , 1–18.

El Ghaouth A, Arul J, Grenier J, Benhamou N, Asselin A, Bélanger R, 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of Pythium aphanidermatum and induction of defenses reactions. *Phytopathology* **84**, 313–320.

Giannopolitis CN, Ries SK, 1977. Superoxide Dismutases. *Plant physiology* **59**, 309–314.

Goes A, Montes de Oca AG, Reis RF, 2001. Ocurrencia de la mancha de alternaria em mandarina “Dancy” en el Estado de Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira* **26**, 386.

Gonçalves RC, Alfenas AC, Mafia RG, 2016. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: Alfenas AC,, Mafia R., eds. *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa: UFV, 101–102.

Griffin DH, 1994. *Fungal Physiology*. New York: Wiley-Liss.

Harkin JM, Obst JR, 1973. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidases participation. *Science* **180**, 296–298.

Heath RL, Packer L, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189–198.

Heiser I, Obwald W, Elstner EF, 1998. The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Physiological Biochemistry* **36**, 703–713.

Heiser I, Osswald WF, 2008. Formação e função das espécies reativas de oxigênio nas interações planta-patógeno. In: Pascholati SF,, Leite B,, Stangarlin JR,, Cia P, eds. *Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Piracicaba: FEALQ, 627.

Hiraga S, 2001. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 462–468.

de Hoog GS, Gerrits van den Ende AHG, 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses* **41**, 183–189.

IBGE, 2014. Banco de dados agregados.

Jones JDG, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.

Karnovsky MJ, 1965. A formaldehyde-glutaraldeyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**, 137–138.

Kawamura C, Tsujimoto T, Tsuge T, 1999. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **12**, 59–63.

Klebs G, 1899. Zur Physiologie fier Fortpflanzung einiger Pilze. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik* **33**, 513.

Kohmoto K, Akimitsu K, Otani H, 1991. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. *Phytopathology* **81**, 719–722.

Kohmoto K, Itoh Y, Shimomura N *et al.*, 1993. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* **83**, 495–502.

Kohmoto K, Scheffer RP, Whiteside J., 1979. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. *Phytopathology* **69**, 667–671.

Koshikumo ESM, 2011. Identificação Molecular E Morfológica , Métodos De Esporulação , Indução E Detecção De Cercospora Do Milho. Universidade Federal de Lavras.

Kraus TE, McKersie BD, Fletcher RA, 1995. Paclobutrazol-induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Increased Antioxidant Enzyme Activity. *Journal of Plant Physiology* **145**, 570–576.

Leach CM, 1962. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. *Can J Bot* **40**, 151–161.

Leach CM, 1965. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Canadian Journal of Botany* **43**, 185–200.

Leach CM, 1967. Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercosporella*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *and Stemphylium*. *Canadian Journal of Botany* **45**, 1999–2016.

Lin CH, Yang SL, Chung KR, 2011. Cellular responses required for oxidative stress tolerance, colonization, and lesion formation by the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in Citrus. *Current Microbiology* **62**, 807–815.

Llorens E, Fernández-Crespo E, Vicedo B, Lapeña L, García-Agustín P, 2013. Enhancement of the citrus immune system provides effective resistance against Alternaria brown spot disease. *Journal of Plant Physiology* **170**, 146–154.

Massa GD, Kim HH, Wheeler RM, Mitchell CA, 2008. Plant productivity in response to LED lighting. *HortScience* **43**, 1951–1956.

Michielin THV, Cristofani-yaly M, Campos, Kelly Aparecida Fernandez de, Schinor H, Azevedo FA de, Bastianel M, 2016. Reação de híbridos de citros à inoculação com *Alternaria alternata*. *Summa Phytopathologica* **42**, 313–320.

Nishimura S, 1978. Host-specific toxins from *Alternaria alternata*: problem and prospects. *roceedings of the Japan Academy* **B56**, 362–366.

Nishimura S, Kohmoto K, 1983. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Review of Phytopathology* **21**, 87–116.

Oliveira JA, 1991. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (Cucumis sativus L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Pacheco CDA, 2015. Aspectos histológicos, físico-químicos, sensoriais e fitotecnicos da tangerina Fremont. Instituto Agronômico.

Pacheco CDA, Martelli IB, Polydoro DA *et al.*, 2012. Resistance and susceptibility of mandarins and their hybrids to *Alternaria alternata*. *Scientia Agricola* **69**, 386–392.

Park P, Nishimura S, Kohmoto K, Otani H, Tsujimoto K, 1981. Two action sites of AM-toxin I produced by apple pathotype of *Alternaria alternata* in host cells: an ultrastructural study. *Canadian Journal of Botany*, 301–310.

Park P, Ohno T, Nishimura S, Kohmoto K, Otani H, 1988. Golgi vesicles fused with invaginated plasma membranes in host cells treated with a host-specific toxin from japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **54**, 493–502.

Pascholati SF, Dalio RJD, 2018. Fisiologia do Parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorim L,, Rezende JAM,, Bergamim Filho A, eds. *Manual de Fitopatologia*. Ouro Fino: Ceres, 424–450.

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C, 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* **24**, 255–265.

Peever TL, Su G, Carpenter-Boggs L, Timmer LW, 2004. Molecular Systematics of Citrus-Associated *Alternaria* Species. *Mycologia* **96**, 119–134.

Pulz P, 2007. Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani* em meio de cultura. Universidade de São Paulo.

Pulz P, Massola NS, 2009. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. *Summa Phytopathologica* **35**, 121–126.

Reis RF, de Almeida TF, Stuchi ES, de Goes A, 2007. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the Alternaria brown spot. *Scientia Horticulturae* **113**, 336–342.

Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM, 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesade plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 123–130.

Rodrigues TTMS, A. Maffia L, D. Dhingra O, Mizubuti ESG, 2010. In vitro production of conidia of Alternaria solani. *Tropical Plant Pathology* **35**, 203–212.

Rotem J, 1994. The Genus *Alternaria: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity*. Minnesota: APS PRESS.

Saunt J, 2000. *Citrus varieties of the world*. Norwish: England Sinclair International Ltd.

Scheffer RP, Livingston RS, 1984. Host-Selective Toxins and Their Role in Plant Diseases. *Science* **223**, 17–21.

Schwarz SF, 2009. Melhoramento genético e variedades. In: Koller OC, ed. *Citricultura: cultura de tangerineiras*. Porto Alegre: Rígel, 35–48.

Simmons EG, 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre.

Souza MC, Stuchi ES, de Goes A, 2009. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. *Scientia Horticulturae* **123**, 1–4.

Timmer LW, Gottwald TR, 2000. Greasy spot and similar disease. In: Timmer LW, Garnsey SM,, Graham JM, eds. *Compendium of Citrus Diseases*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 25–28.

Timmer LW, Solel Z, Gottwald TR, Ibanez AM, Zitko SE, 1998. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathology* **88**, 1218–1223.

Trione EJ, Leach CM, 1969. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. *Phytopathology* **59**, 1077–1083.

Vakalounakis DJ, Christias C, 1986. Light quality, temperature and sporogenesis in *Alternaria cichorii*. *Transactions of the British Mycological Society* **86**, 247–254.

Vale FXR, Fernandes Filho EI, Liberato J, 2001. Quantificação de doenças - Quant.

Witsch H V., Wagner F, 1955. Beobachtungen fiber den Einflull des Lichtes auf Mycel- und Conidienbildung bei *Alternaria brassicae* var . *dauci* . *Archiv für Mikrobiologie* **312**, 307–312.

Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW, 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* **75**, 171–212.

Woudenberg JHC, van der Merwe NA, Jurjević Ž, Groenewald JZ, Crous PW, 2015a. Diversity and movement of indoor *Alternaria alternata* across the mainland USA. *Fungal Genetics and Biology* **81**, 62–72.

Woudenberg JHC, Seidl MF, Groenewald JZ *et al.*, 2015b. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* **82**, 1–21.

Yang SL, Chung KR, 2012. The nadph oxidase-mediated production of hydrogen peroxide (h2o2) and resistance to oxidative stress in the necrotrophic pathogen *Alternaria alternata* of citrus. *Molecular Plant Pathology* **13**, 900–914.

Yang SL, Lin CH, Chung KR, 2009. Coordinate control of oxidative stress tolerance, vegetative growth, and fungal pathogenicity via the AP1 pathway in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**, 100–110.

Zauza EAV, Alfenas AC, Mafia RG, 2016. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: Alfenas AC,, Mafia RG, eds. *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa: Editora UFV, 27–54.

2. INTERAÇÕES ENTRE *Alternaria alternata* f.sp. *citri* PATÓTIPO "TANGERINA" COM AS CULTIVARES PONKAN, MURCOTT E FREMONT

Resumo

Durante a interação entre fitopatógenos e plantas pode ocorrer uma série de eventos, os quais resultam em resistência ou suscetibilidade às doenças. Este trabalho, buscou avaliar o processo infeccioso de *Alternaria alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina" sobre as cultivares suscetíveis Ponkan e Murcott e na resistente Fremont. Para isso, abordaram-se técnicas de microscopia e bioquímica fitopatológica. A germinação de esporos do fungo sobre folhas destacadas foi observada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) 6, 12 e 24 h após a inoculação (HAI). Adicionalmente, verificaram-se respostas bioquímicas nas folhas por meio da quantificação de peroxidases (POX), catalases (CAT), superóxido dismutase (SOD) e também a presença e teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A concentração de melondialdeído (MDA) foi medida como indicativa da peroxidação de lipídeos. Os efeitos da inoculação na estrutura dos tecidos das folhas foram verificados por meio de cortes histológicos e observação em microscópio óptico de luz. Para verificar alterações nas folhas a nível subcelular, realizaram-se análises por meio de microscópio eletrônico de transmissão (MET) de secções transversais do material vegetal 24 h após a inoculação. Os resultados de MEV revelaram que, nas três cultivares analisadas, independentemente de serem suscetíveis ou resistente, houve germinação, formação de apressórios e entrada do fungo na cavidade estomática. Ao avaliarem-se as atividades enzimáticas e o acúmulo de H_2O_2, verificaram-se dois tipos diferentes de reações: nas cultivares suscetíveis (Ponkan e Murcott) o aumento das atividades de SOD e CAT foi mais discreto e houve acúmulo de H_2O_2 e reação de hipersensibilidade (RH), enquanto que na cultivar resistente Fremont não houve RH e as atividades de SOD e CAT se mostraram mais intensas. Os sintomas histológicos da inoculação nas folhas suscetíveis puderam ser observados por meio de microscopia de luz nas cultivares Ponkan e Murcott, porém sem notar a presença de hifas do patógeno no interior do tecido. A nível subcelular, por meio de MET, notou-se, 24 HAI, nas cultivares suscetíveis, plasmólise das células com destaque para a fragmentação das membranas plasmáticas das células epidermais e parenquimáticas. Assim, sugere-se que a resistência da cultivar Fremont esteja relacionada à sua capacidade de detoxificar espécies reativas de oxigênio como H_2O_2, não responder à inoculação por meio de RH e não apresentar danos nas membranas plasmáticas, sítio de ação da toxina do patógeno.

Palavras-chave: SOD; CAT; POX; Resposta de hipersensibilidade; Peróxido de hidrogênio; Microscopia

Abstract

During the host-phytopathogen interactions a series of events can occur, which result in resistance or susceptibility to the diseases. This work aimed to evaluate the infectious process of *Alternaria alternata* f.sp. *citri* "tangerine" pathotype on the susceptible cultivars Ponkan and Murcott and on the resistant Fremont. For that, techniques of microscopy and

phytopathological biochemistry were addressed. The germination of fungal spores on detached leaves was observed by scanning electron microscopy (SEM) 6, 12 and 24 hour after inoculation (HAI). In addition, biochemical changes in the leaves were verified through quantifications of peroxidases (POX), catalases (CAT), superoxide dismutase (SOD) and also the presence and content of hydrogen peroxide. The concentration of melondialdehyde (MDA) was measured as indicative of lipid peroxidation. The effects of inoculation in leaf tissues were verified through light microscopy. To verify changes into the leaves at subcellular level, analyzes were performed by transmission electron microscope (TEM) of the plant material 24 HAI. SEM results showed that the three cultivars analyzed, regardless of being susceptible or resistant, there was germination, appressorium formation, and entrance of the fungus through the stomata. When enzymatic activities and hydrogen peroxide accumulation (H_2O_2) were evaluated , two different types of responses occurred: in the susceptible cultivars (Ponkan and Murcott) the increase of SOD and CAT activities was more discreet, and there was accumulation of H_2O_2 and hypersensitivity reaction (HR), whereas in cv. resistant Fremont, there was no HR, and SOD and CAT activities were more intenses. The histological symptoms of inoculation in susceptible leaves could be observed by light microscopy in cvs. Ponkan and Murcott, but with no hyphae of the pathogen inside the tissues. TEM results revealed that the susceptible cultivars showed cell plasmolisis and plasma membrane fragmentation 24 HAI on the inoculated leaves. Thus, it is suggested that the resistance of cv. Fremont is related to its ability to detoxify reactive oxygen species, besides not responding to inoculation through HR and showing no damage to plasma membranes.

Keywords: SOD; CAT; POX; Hypersensitivity reaction; Hydrogen peroxide; Microscopy

2.1. Introdução

A mancha-marrom de Alternaria causada por *Alternaria alternata* f.sp. *citri* patótipo “tangerina” (Woudenberg *et al.*, 2015b) é uma das principais doenças que acometem o cultivo de tangerinas (*Citrus reticulata* e alguns de seus híbridos) (Souza *et al.*, 2009). O fungo infecta tecido vegetal jovem causando manchas necróticas de coloração marrom e senescência de folhas e frutos. Quando a infecção incide sobre folhas mais velhas as lesões são menores (Timmer & Gottwald, 2000). Após a queda de folhas e frutos, o patógeno pode se desenvolver saprofiticamente (Timmer *et al.*, 1998). Sobre as lesões, o fungo produz conídios com 4-6 septos transversais e 1 ou mais septos longitudinais que, ao atingirem a maturidade, são disseminados pelo vento (Feichtenberger *et al.*, 2005).

As cultivares de tangerinas, Ponkan (*C. reticulata*) e Murcott (*C. reticulata x C. sinensis*), mais plantadas no mundo são suscetíveis à mancha-marrom de Alternaria (Reis *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009). Enquanto a cultivar Ponkan apresenta frutos grandes com casca pouco aderida aos gomos, a cultivar Murcott ou “*Honey Tangerine*” como é conhecida nos

EUA, produz frutos médios com casca fina e muito aderida aos frutos (Saunt, 2000). Uma das estratégias para o controle da doença tem sido a busca por cultivares resistentes à doença. Nesse contexto, uma opção é a cultivar Fremont (*C. clementina* x *C. reticulata*) (Saunt, 2000), a qual não apresenta sintomas quando inoculada como o patógeno (Reis *et al.*, 2007).

Durante o processo infeccioso, alguns fungos produzem toxinas como mecanismo de ataque. Em alguns casos, essas toxinas específicas de hospedeiros (TEH) atuam como moléculas reconhecíveis pelo hospedeiro, se ligando a um sítio específico e podendo suprimir respostas de defesa da planta nos processos de infecção e colonização (Nishimura & Kohmoto, 1983; Scheffer & Livingston, 1984; Kohmoto *et al.*, 1991). No caso de *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina", o fungo utiliza a toxina ACT como um mecanismo de ataque e indica-se que seu sítio de ação se encontrae na membrana plasmática (Kohmoto *et al.*, 1993). Outro patótipo de *A. alternaria* f.sp. *citri* que causa doença em *C. limon* e *C. jambhiri* é denominado "limão-rugoso" e produz a TEH chamada ACLR, a qual tem como um sítio de ação as cristas mitocondriais (Akimitsu *et al.*, 1989). Quando o patótipo "tangerina" é inoculado em *C. limon* e o patótipo "limão-rugoso" sobre *C. reticulata*, não há desenvolvimento de sintomas (Kohmoto *et al.*, 1979). Outro sítio de ação conhecido de TEHs são os cloroplastos, como ocorre em células de folhas de macieira na presença da toxina AM produzida por *A. alternata* patótipo "maçã", a qual também afeta a membrana plasmática (Park *et al.*, 1981).

As toxinas fúngicas podem ser reconhecidas pelas plantas e alterar o metabolismo oxidativo, aumentando as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) como radicais superóxido (O_2^{-1}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH). Esse acúmulo de EROs pode resultar na morte da célula vegetal, conhecida como "reação de hipersensibilidade" (Heiser *et al.*, 1998; Heiser & Osswald, 2008). No caso de patógenos necrotróficos como *A. alternaria*, sabe-se que são capazes de detoxificar EROs, permitindo-lhes a infecção e colonização (Lin *et al.*, 2011; Yang & Chung, 2012). Durante esse processo de interação entre patógeno e hospedeiro no metabolismo oxidativo estão envolvidas uma série de enzimas como o complexo NADPH-oxidase, capaz de formar radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), da superóxido dismutase a qual transforma o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da catalase que pode converter o H_2O_2 em água (H_2O) e O_2 (Heiser & Osswald, 2008). As peroxidases por sua vez, podem estar envolvidas no processo de eliminação do peróxido de hidrogênio através da sua utilização como substrato para síntese de lignina ou outros compostos (Harkin & Obst, 1973; Passardi *et al.*, 2005). Assim, se por um lado os patógenos como *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina" podem utilizar mecanismos de

ataque como toxinas, as plantas podem apresentar mecanismos de defesa que resultam na formação de barreiras físicas como deposição de calose no sítio de infecção, formação de papilas ou espessamento da parede celular, ou ainda a formação de compostos tóxicos patógeno como fitoalexinas e peróxido de hidrogênio (Pascholati & Dalio, 2018).

Análises estruturais através de estudos de microscopia podem auxiliar na identificação dos eventos envolvidos durante a interação entre plantas e patógenos. Em um primeiro momento da interação é possível verificar a formação de estruturas especializadas para fixação e penetração do patógeno como apressórios (Dita *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2011; Koshikumo, 2011). Outras técnicas que utilizam corantes ou reagentes que conferem coloração ao tecido foliar podem demostrar respostas de defesa como acúmulo de lignina, espessamento de parede, formação de papilas, acúmulo de peróxido de hidrogênio e reação de hipersensibilidade (Dita *et al.*, 2007; Llorens *et al.*, 2013; Araujo & Paschoalino, 2015). Por meio de microscopia eletrônica de transmissão, pode-se, por exemplo, observar sítios de ação de toxinas e alterações a nível intracelular (Kohmoto *et al.*, 1979; Park *et al.*, 1981, 1988; Akimitsu *et al.*, 1989). Apesar de algumas comparações morfológicas entre a cultivar resistente Fremont com as cultivares suscetíveis Ponkan e Murcott terem sido realizadas, o motivo da resistência da Fremont ainda não está esclarecido (Pacheco, 2015).

Para melhor compreensão desse patossistema, este estudo buscou avaliar a germinação de esporos de *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo “tangerina” sobre folhas das cultivares suscetíveis Ponkan e Murcott e da cultivar resistente Fremont. Ainda, verificou-se a atividade de enzimas oxidativas durante as primeiras 48 HAI do patógeno. Adicionalmente, analisaram-se o acúmulo de peróxido de hidrogênio e a peroxidação de lipídios nas folhas inoculadas, assim como a sensibilidade do fungo ao peróxido de hidrogênio *in vitro*. Por fim, análises estruturais por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão foram efetuadas para verificar possíveis alteração anatômicas.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O material vegetal consistiu de folhas jovens (do ápice dos ramos com até 2 cm de comprimento) destacadas do ápice de brotações novas de mudas de tangerineiras das cultivares Ponkan, Murcott e Fremont. Esporos do patógeno foram produzidos conforme descrito no item 1.3.2.1 do capítulo anterior, em meio $CaCO_3$-A (3 dias sob LED + 4 dias sob

NUV). As folhas foram dispostas sobre uma camada de papel filtro umedecido dentro de placas de Petri de poliestireno (6 cm Ø) e inoculadas por aspersão de suspensão com $1x10^4$ esporos.mL^{-1} na superfície abaxial. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 27 ºC e fotoperíodo de 12 h sob LED. Amostras de folhas foram coletadas 6, 12 e 24 horas após a inoculação (HAI). No momento das coletas, cortou-se com auxílio de um bisturi um fragmento foliar medindo aproximadamente 5 x 5 mm. Cada unidade experimental foi composta por uma placa com uma folha. O experimento foi composto por quatro repetições por tratamento.

Para o processo de fixação, os fragmentos foram depositados em microtubos com capacidade para 2 mL, contendo 1,5 mL de solução de Karnovsky (1965) modificada. Para melhor fixação das amostras, os tubos foram submetidos ao vácuo (-400 mmHg) em sessões de 30 segundos, até a precipitação das amostras na solução fixadora. Os fragmentos foram armazenados em geladeira (4 ºC).

Na continuação do processamento para visualização no MEV as amostras foram cuidadosamente retiradas do fixador e o excesso de solução removido com auxílio de papel filtro. As amostras foram lavadas por 20 min em tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2. Em seguida, as amostras foram dispostas com a superfície abaxial voltada para cima dentro de uma placa de Petri contendo uma folha de papel filtro umedecida. No centro da placa, utilizou-se como recipiente uma tampa de um microtubo plástico, dentro do qual foram depositadas 3 gotas de solução de tetróxido de ósmio (1 %) para pós-fixação. As placas foram vedadas e mantida *overnight* no escuro.

Terminado o período de pós-fixação, os fragmentos foliares foram cuidadosamente colados em *stubs* metálicos com auxílio de fita de carbono dupla-face (EMS©). Esses *stubs* contendo os fragmentos foliares foram devidamente identificados e organizados em racks de madeira, e em seguida colocados em potes plásticos hermeticamente fechados contendo sílica gel por 48 h para desidratação. As amostras, então, foram cobertas com ouro em equipamento "sputter coater" (Baltec SCD 050) durante 180 s. Finalmente, realizaram-se as análises por meio de microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP no Laboratório de Microscopia Eletrônica (NAP/ESALQ).

2.2.2. Atividades enzimáticas em folhas

Para verificar as atividades enzimáticas nas diferentes cultivares foram realizados testes *in vitro*. Folhas jovens destacadas das cultivares Ponkan, Murcott e Fremont foram

dispostas em placas de Petri (6 cm Ø) sobre uma folha de papel filtro umedecida, com a superfície abaxial voltada para cima. Em seguida, foram pulverizadas com água destilada estéril (tratamento não inoculado) ou suspensão de esporos de *A. alternata* (1×10^5 esporos.mL^{-1}) (tratamento inoculado).

Após a inoculação, as placas de Petri foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara do tipo BOD, com temperatura de 27 ºC e fotoperíodo de 12 h. As coletas foram realizadas 12, 24 e 48 HAI, exceto a do tempo 0 (zero) que foi realizada imediatamente antes da inoculação. As amostras, imediatamente após a coleta, foram embrulhadas em papel alumínio, imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 ºC. O experimento foi conduzido duas vezes em delineamento completamente casualizado e com seis repetições por tratamento.

2.2.2.1. Quantificação de proteínas totais

A extração de proteínas totais foi realizada de acordo com Felipini et al. (2016) com alterações. Folhas (200 mg) foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), polivinilpirrolidona (0,5 % m/v) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 1 mM). Os homogenatos foram dispostos em microtubos com capacidade para 2,0 mL e centrifugados a 20.000 *g* por 30 min a 4 ºC. O sobrenadante (extrato proteico) foi coletado e armazenado sob -80 ºC até o momento das avaliações.

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando como reagente o produto comercial “Protein Assay” (Bio-Rad®). Os valores de absorbância das amostras a 595 nm foram interpolados em uma curva-padrão de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich) (0-15 µg.mL^{-1}, R^2=0,9972).

2.2.2.2. Peroxidases (POX EC 1.11.1.7)

A atividade de guaiacol peroxidases (POX) foi mensurada a partir da reação de 5 µL do extrato proteico, adicionados em 2,995 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) a 40 ºC contendo guaiacol (0,25 % v/v) e peróxido de hidrogênio (0,1 M). A reação foi conduzida por 3 min, anotando-se os valores de absorbância em espectrofotômetro a 470 nm em intervalos

de 30 segundos. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 470 nm por min por mg de proteína ($DO_{470nm}.min^{-1}.mg\ proteína^{-1}$).

2.2.2.3. Catalases (CAT EC 1.11.1.6)

A atividade de catalases (CAT) foi quantificada em espectrofotômetro de acordo com Kraus et al. (1995) com modificações de Azevedo et al. (1998). A reação consistiu de 15 µL de extrato proteico adicionado a 1 mL tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,5) contendo 2.5 µL de H_2O_2 (30 %). A reação foi conduzida durante 1 min em temperatura ambiente. A atividade foi calculada com base no coeficiente de extinção do H_2O_2 (39,4 $M.cm^{-2}$) e os resultados expressos em $\mu mol.min^{-1}.mg\ proteína^{-1}$.

2.2.2.4. Superóxido dismutase (SOD EC 1.15.1.1)

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi quantificada de acordo com (Giannopolitis & Ries, 1977) a partir da fotorredução do cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT – Sigma-Aldrich) e leitura em espectrofotômetro. A reação consistiu da adição de 30 µL do extrato proteico em 1,470 mL de solução de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo 1,3 µM riboflavina, 13 mM metionina, 0,1 mM EDTA e 63 µM NBT).

Todo o processo de mistura dos reagentes e disposição em microtubos transparentes foi realizado na ausência de luz direta. As amostras foram dispostas em uma câmara de reaçã, com acesso a uma lâmpada fluorescente (20 W). A reação foi iniciada pelo acionamento da lâmpada e conduzida por 5 min em temperatura ambiente. Foram realizados dois brancos contendo a solução de reação e 30 µL do tampão utilizado para obtenção do extrato proteico. Um desses brancos foi exposto à luz na caixa de reação enquanto o outro permaneceu no escuro, envolto por papel alumínio. O composto formazana resultante da fotorredução do NBT foi medido em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos em U $SOD.mg\ proteína^{-1}$, sendo uma unidade de SOD a quantidade de enzima necessária para inibir 50 % da fotorredução do NBT para formazana.

2.2.3. Peróxido de hidrogênio

A quantificação de peróxido de hidrogênio e avaliação da peroxidação lipídica em folhas de tangerinas inoculadas com *A. alternata* foi realizado um experimento nos mesmo moldes descritos no item 2.2.2. A partir das amostras foliares se procedeu a obtenção de um extrato macerando-se 200 mg de tecido fresco em solução de extração contendo ácido tricloroacético (0,1 %) (TCA) e polivinilpirrolidona (1 %). Em seguida, o homogenato foi transferido para microtubos com capacidade para 2 mL e centrifugado a 13000 *g* durante 10 min, sob temperatura de 4 ºC.

2.2.3.1. Quantificação de peróxido de hidrogênio nas folhas

Para quantificação de peróxido de hidrogênio foi utilizado o método descrito por (Alexieva *et al.*, 2001) com algumas adaptações. A reação ocorreu pela adição de 0,2 mL do extrato foliar em 0,2 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,8 mL de reagente iodeto de potássio (1 M). O branco consistiu dos mesmos volumes acima descritos, porém o extrato foliar foi substituído pela solução de extração. A reação foi conduzida durante 1 h no escuro e a absorbância mensurada a 390 nm em espectrofotômetro. Os valores de absorbância foram interpolados em uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio. O experimento contou com 6 repetições por tratamento e foi conduzido sob delineamento completamente casualizado.

2.2.3.2. Acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas

Este experimento teve por objetivo verificar o acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas de tangerina inoculadas com *A. alternata*. Para isso, folhas jovens das cultivares Ponkan, Murcott e Fremont foram destacadas e colocadas em placas de Petri (6 cm Ø) contendo uma folha de papel filtro umedecido. Em seguida, as folhas foram inoculadas por pulverização com 1×10^5 esporos.mL^{-1} na superfície abaxial. As placas foram vedadas e mantidas em câmara do tipo BOD a 27 ºC e fotoperíodo de 12 h.

Após 24 h, foram coletados discos foliares (8 mm Ø) e colocadas em tubos de ensaio de vidro, individualmente, e infiltrados com solução de 1,2-diamino-3,4-dimetilbenzidina – DAB (1 mg.mL^{-1}) (Sigma-Aldrich) conforme Daudi and O'Brien (2012) com modificações. Após inicialmente serem submetidos a seções de vácuo de 20 s (-400 mmHg) os discos

permaneceram na solução de DAB pelo período de 24 h, em mesa de agitação com velocidade de 200 rpm. Em seguida, removeu-se a solução de DAB e diafanizaram-se as folhas cobrindo-as com solução de etanol e ácido acético (3:1). Os tubos foram vedados e mantidos em estufa a 45 ºC durante 3 dias, sendo a solução trocada diariamente. Finalmente, a solução de diafanização foi removida e substituída por uma solução de etanol, ácido acético e glicerol (3:1:1) para conservação.

A avaliação foi realiada através de fotomicroscópio Axioimager D2 (Zeiss®). O experimento contou com quatro repetições por tratamento e foi conduzido em delineamento completamente casualizado.

2.2.3.3. Sensibilidade de *Alternaria alternata* ao peróxido de hidrogênio *in vitro*

Para verificar o efeito de diferentes doses de peróxido de hidrogênio sobre o crescimento micelial de *A. alternata* foram realizados testes *in vitro*. Para isso, acrescentou-se peróxido de hidrogênio (Merck®) em meio de cultura BDA autoclavado e em temperatura fundente (45 ºC) nas concentrações de 0 (controle), 2,5, 5, 10 e 20 $mmol.g^{-1}$ de meio de cultura, agitando-se em seguida. Posteriormente, verteu-se 20 g do meio de cultura em cada placa. Após a solidificação, um disco de micélio de *A. alternata* (5 mm Ø) oriundo das bordas de uma colônia fúngica de 10 dias crescida em meio de cultura BDA foi repicado para o centro de cada placa. As placas foram dispostas em BOD a 27 ºC e fotoperíodo de 12 h. O diâmetro das colônias foi medido após 6 dias. Os experimentos foram conduzidos em delineamento completamente casualizado com 5 repetições por tratamento.

2.2.3.4. Quantificação de malondialdeído

Para quantificação de malondialdeído (MDA) decorrente da peroxídação de lipídeos se utilizou o método de Heath and Packer (1968). Uma alíquota de 250 µL do sobrenadante obtido no item 2.2.3 foi adicionada em 1 mL de solução contendo TCA (20 %) e ácido 2-tiobarbitúrico (0,5 %) (Sigma-Aldrich). A mistura foi incubada a 95 ºC, durante 30 min e ao final desse período, resfriada em banho de gelo (10 min) e em seguida mantida em temperatura ambiente por 15 min, no escuro. A absorbância das amostras foi lida em

espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 532 e 600 nm e a quantificação de MDA foi realizada considerando o coeficiente de extinção (ε= 155 mM^{-1} cm^{-1}).

2.2.4. Microscopia de luz (ML)

Para avaliação do efeito da inoculação de *A. alternata* nos tecidos foliares das cultivares alvo do estudo, foi desenvolvido um experimento com inoculação *in vitro*. Folhas destacadas das cvs. Ponkan, Murcott e Fremont, acondicionadas sobre uma folha de papel filtro dentro de placas de Petri (6 cm Ø), foram inoculadas com 1×10^5 esporos.mL^{-1} por aspersão na superfície abaxial. Como controle foram utilizadas folhas pulverizadas com água destilada estéril.

Fragmentos foliares (6 mm × 4 mm) foram coletados 24, 36, 48 e 72 HAI. Após cada coleta, foram colocados em microtubos com capacidade para 2 mL contendo solução de Karnovsky (1965) modificada para fixação. Os tubos foram submetidos a sessões de vácuo (-400 mmHg) de 5 min até submergirem na solução de fixação e em seguida armazenados em geladeira (4 ºC). Após a retirada da solução de fixação, as amostras foram colocadas em tampão cacodilato 0,2 M (pH 7,2) por 10 min, duas vezes, para remoção de aldeídos. Em seguida, foram desidratadas em série etanólica (30 %, 50 %, 70 %, 90 % 100 %), por 20 min, sendo a última etapa repetida três vezes.

O processo de infiltração foi realizado com resina “JB-4 Plus Embedding Media” (EMS®) e o emblocamento foi adaptado a partir das recomendações do fabricante. Assim, as amostras foram dispostas em concentrações crescentes de “solução de infiltração” diluída em etanol (3:1, 1:1, 1:3 e 1:9) durante uma hora em cada etapa, e em mesa de agitação. Finalmente, as amostras foram colocadas em “solução de infiltração” pura, durante 72 h, sendo a resina substituída a cada 24 h. Após esse processo de infiltração, então as amostras foram emblocadas, conforme recomendação do fabricante.

As amostras foram cortadas com espessura de 5 µm, no sentido transversal, com auxílio de micrótomo. Em seguida, os cortes foram colocados em lâminas de microscopia e essas sobre chapa aquecedora até a secagem. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina pH 6,0 durante 2 min e então lavados com água corrente por 1 min. Após secagem ao ar, as lâminas foram montadas com lamínula em meio “Permount” (Fischer Scientific®). De cada amostra, foram observados ao menos 80 cortes histológicos. O experimento contou com 3 repetições por tratamento e foi realizado duas vezes.

2.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a realização do experimento foi utilizada uma suspensão de esporos do patógeno com concentração de $1x10^5$ esporos.mL^{-1}. Uma gota de 30 µL foi depositada com auxílio de micropipeta na superfície abaxial da folha sobre a nervura principal. No tratamento testemunha, foi depositada uma gota com o mesmo volume de água destilada estéril (tratamento não inoculado). As folhas foram mantidas em placas de Petri (6 mm Ø), individualmente, sobre uma folha de papel filtro umedecida. Após o período de 24 horas, foram coletados fragmentos com auxílio de um bisturi (aproximadamente 3 mm x 4 mm), exatamente abaixo de onde foi depositado o inóculo. Os fragmentos foram imediatamente colocados em microtubos contendo solução de Karnovsky modificada (Karnovsky, 1965). Para agilizar o processo de fixação das amostras, os tubos foram submetidos a 6 sessões de 20 s no vácuo (-500 mmHg) e, posteriormente, foram armazenados em geladeira a 4 ºC. Foram realizadas três repetições de cada tratamento (inoculado e não inoculado) para cada cultivar (Ponkan, Murcott e Fremont).

No preparo das amostras, as mesmas foram retiradas da solução de Karnovsky e lavadas, durante 10 min em tampão cacodilato (0,2 M pH 7,2) por 3 vezes. Em seguida, as amostras foram colocadas na presença de tetróxido de ósmio (1 %) durante 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram lavadas com água destilada e foi realizada a pré-contrastação, adicionando-se acetato de uranila (0,5 %) e mantendo-as em geladeira pelo período de 12 horas.

A desidratação foi realizada em série de acetona (30, 50, 70, 90 e 3 vezes em 100 %, durante 20 min em cada etapa), em temperatura ambiente e em seguida infiltradas com resina de baixa viscosidade Spurr's (EMS®) (12 h em solução 1:1 com acetona e posteriormente 24 h em resina pura e, em seguida, emblocadas a 70 ºC por 72 h. Com a resina já polimerizada, os blocos foram trimados e cortados com o auxílio de um ultramicrótomo modelo UCT (Leica®). Os cortes ultrafinos (60-70 nm) foram realizados com lâmina de vidro, coletados em telas de cobre com poros de 300 mesh, e dispostos na presença de acetato de uranila (3 %) por 20 min, lavadas com água por três vezes e então submetidas a citrato de chumbo por 12 min, sendo então lavadas novamente três vezes em água. Cada amostra foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011 (JEOL®).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio das observações em microscópio eletrônico de varredura (MEV), pode-se observar que 6 HAI havia abundante quantidade de esporos germinados sobre as folhas, independente da cultivar avaliada (Figuras 12-14).

Na cultivar Ponkan (Figura 12), 6 HAI foi possível observar esporos com dois tubos germinativos (Figura 12 A1). Contudo, também havia esporos com um tubo germinativo, cujo crescimento passava pelas aberturas estomáticas sem adentrá-las (Figura 12 A2). O crescimento de tubos germinativos também foi observado sobre as folhas 12 HAI (Figuras 12 B1-B2). Quando se analisaram as amostras 24 HAI, a formação de apressórios se tornou evidente (Figura 12 C1). Eventualmente, foi possível verificar a entrada do fungo na cavidade estomática (Figura 12 C2).

Características semelhantes à cultivar Ponkan puderam ser vistas nos esporos germinados sobre folhas da cultivar Murcott (Figura 13). No tempo de 6 HAI foi possível observar tubos germinativos que cresceram e passaram sobre os estômatos sem adentrá-los (Figura 13 A1). Havia a presença de esporos germinados notadamente com tubo germinativo de tamanhos variados (Figuras 13 A1-A2). Ao analisar as imagens 24 HAI, notou-se a presença de apressórios, inclusive, a aparente formação de um apressório sobre a cavidade estomática (Figura 13 C1). A presença de estruturas do patógeno adentrando os estômatos pode ser vista mais de uma vez (Figura 13 C2).

Ao avaliar as imagens da germinação de esporos sobre folhas da cultivar Fremont (Figura 14) padrões semelhantes aos anteriormente descritos para as suscetíveis foram notados. No tempo de 6 HAI se notaram esporos germinados e não germinados (Figura 14 A1) e o tubo germinativo não aparentou crescer em direção às cavidades estomáticas (Figura 14 A2). A presença de apressórios não foi observada 12 HAI (Figuras 13 B1-B2) e na Figura B2 é possível notar o crescimento da hifa passando sobre o estômato sem entrar em sua abertura. E, semelhantemente às cultivares suscetíveis, 24 HAI se notou a formação de apressórios (Figura 13 C1) e, também, a entrada do fungo em aberturas de estômatos (Figura 13 C2).

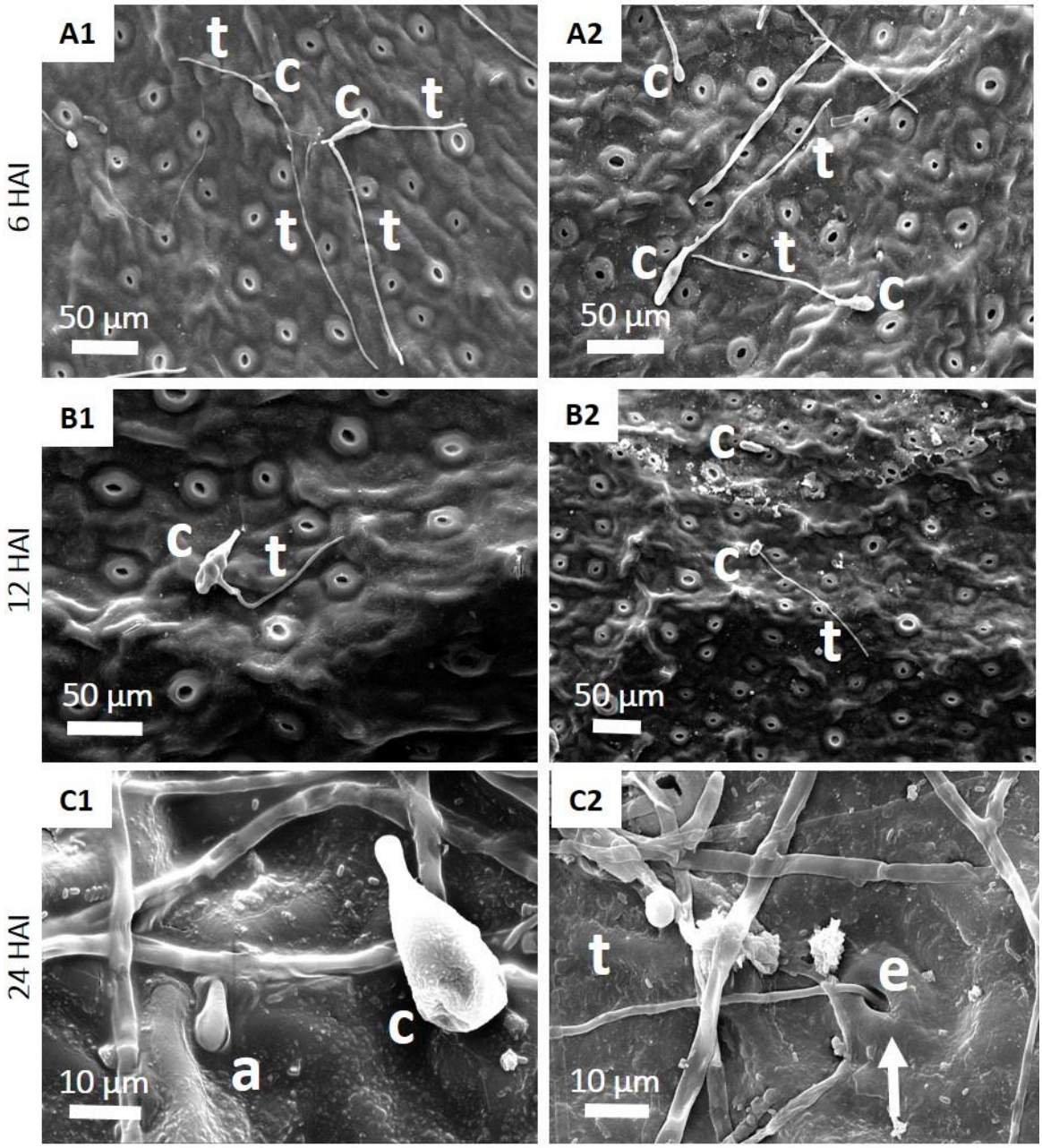

Figura 12. Germinação de *Alternaria alternata* sobre folhas de tangerina cv. Ponkan 6, 12 e 24 horas após a inoculação (HAI). Observa-se que nos tempo 6 HAI e 12 HAI (A1-A2 e B1-B2) houve crescimento do tubo germinativo, porém, foram observados apressórios somente 24 HAI (C1). Observa-se ainda nesse tempo o fungo penetrando através da câmara estomática (C2) indicado pela seta. a = apressório; c = conídio; e = estômato; t = tubo germinativo.

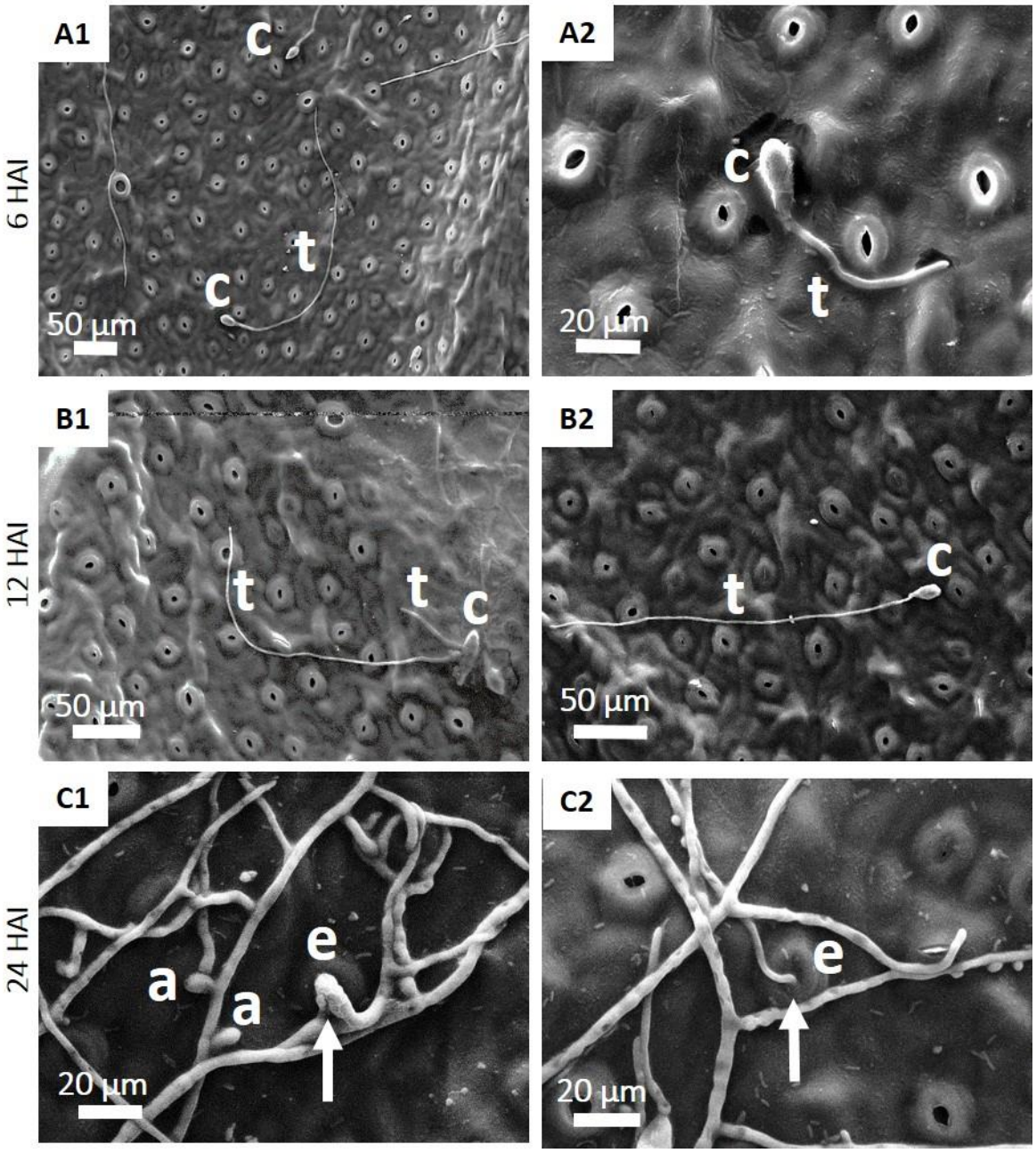

Figura 13. Germinação de *Alternaria alternata* sobre folhas de tangerina cv. Murcott 6, 12 e 24 horas após a inoculação (HAI). Observa-se que nos tempo 6 HAI e 12 HAI (A1-A2 e B1-B2) houve crescimento do tubo germinativo, porém, foram observados apressórios somente 24 HAI (C1). Observa-se ainda nesse tempo o fungo penetrando através de câmaras estomáticas (C1 e C2) indicadas pelas setas. a = apressório; c = conídio; e = estômato; t = tubo germinativo.

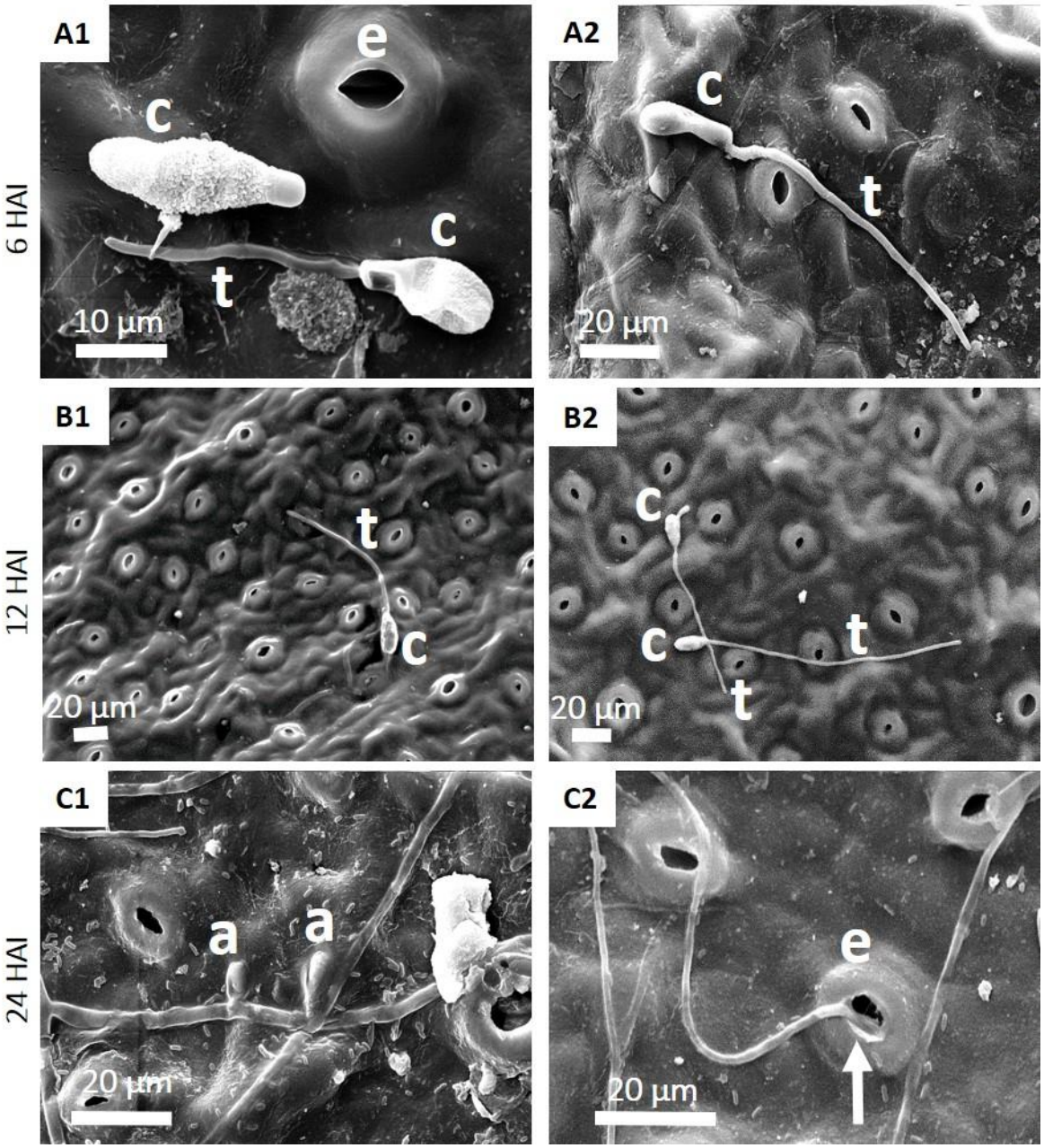

Figura 14. Germinação de *Alternaria alternata* sobre folhas de tangerina cv. Fremont 6, 12 e 24 horas após a inoculação (HAI). Observa-se que nos tempo 6 HAI e 12 HAI (A1-A2 e B1-B2) houve crescimento do tubo germinativo, porém, foram observados apressórios somente 24 HAI (C1). Observa-se ainda nesse tempo o fungo penetrando através da câmara estomática (C2) indicado pela seta. a = apressório; c = conídio; e = estômato; t = tubo germinativo.

2.3.2. Atividades enzimáticas em folhas

2.3.2.1. Peroxidases (POX EC 1.11.1.7)

Observou-se que houve diferença na atividade de peroxidases (Figura 15) no decorrer do tempo nas cultivares Ponkan e Murcott, assim como entre folhas inoculadas ou não inoculadas. Quando se realizou análise nas folhas da cultivar Fremont não foram observadas alterações na atividade de peroxidases.

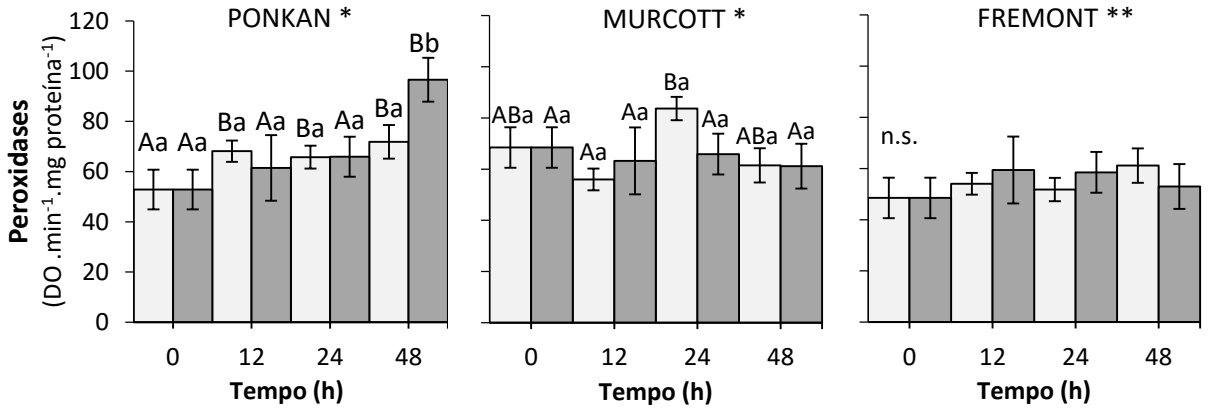

Figura 15. Atividade de peroxidases em folhas de tangerinas cvs. Ponkan, Murcott e Fremont em diferentes tempos após a inoculação. Folhas destacadas foram pulverizadas com água destilada estéril (□ - não inoculadas) ou (■ – inoculadas) com $1x10^5$ esporos.mL^{-1} de *Alternaria alternata*. Médias seguidas da mesma letra (maiúsculas dentro de inoculadas ou não inoculadas e minúsculas dentro de cada tempo) não diferem entre si nas análises foram realizadas dentro de cada cultivar pelo teste de Student Newman-Kels (SNK) ($p<0,05$). Os asteriscos comparam as atividades médias entre as cultivares (SNK $p<0,05$). n.s.: não houve diferença significativa pelo teste de Fischer ($p<0,05$).

2.3.2.2. Catalases (CAT EC 1.11.1.6)

A atividade de catalases (Figura 16) diferiu dentro de todas as cultivares avaliadas, assim como houve interação entre tempos e folhas inoculadas e não inoculadas. No caso da cultivar Ponkan se percebeu o aumento da atividade enzimática tanto em folhas inoculadas como não inoculadas 12 HAI, porém, 24 HAI as folhas inoculadas demonstraram um pico de atividade. A concentração da enzima foi reduzida para os níveis iniciais do experimento (tempo 0) 48 HAI.

No caso da cultivar Murcott, 12 HAI as folhas inoculadas apresentaram atividade enzimática em média 48 % superior em relação às não inoculadas, sendo essa diferença reduzida 24 HAI, e caindo a níveis inferiores 48 HAI.

Para a cultivar Fremont, 12 HAI a atividade de catalases foi 78 % superior nas folhas inoculadas em relação às não inoculadas. Porém, ao se analisar o tempo posterior de coleta (24 HAI) a atividade nas folhas inoculadas foi reduzida, voltando a superar as não inoculadas 48 HAI.

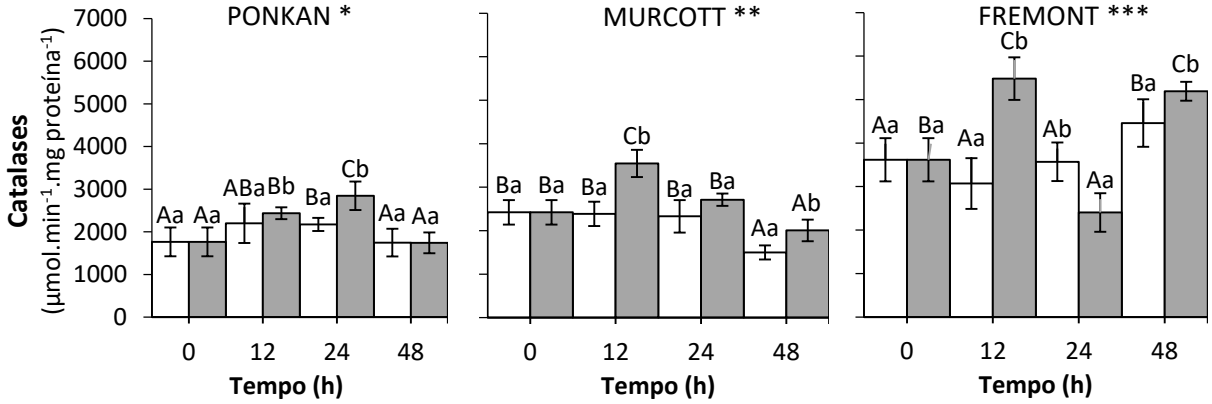

Figura 16. Atividade de catalases em folhas de tangerinas cvs. Ponkan, Murcott e Fremont em diferentes tempos após a inoculação. Folhas destacadas foram pulverizadas com água destilada estéril (□ - não inoculadas) ou (■ – inoculadas) com $1x10^5$ esporos.mL^{-1} de *Alternaria alternata*. Médias seguidas da mesma letra (maiúsculas dentro de inoculadas ou não inoculadas e minúsculas dentro de cada tempo) não diferem entre si nas análises foram realizadas dentro de cada cultivar pelo teste de Student Newman-Kels (SNK) ($p<0,05$). Os asteriscos comparam as atividades médias entre as cultivares (SNK $p<0,05$).

2.3.2.3. Superóxido dismutase (SOD 1.15.1.1)

Como se pode observar na Figura 17, não houve diferença na atividade de superóxido dismutase nas folhas das cultivares Ponkan e Murcott, tanto no decorrer do tempo quanto em relação às inoculadas e não inoculadas. Quando se analisou a cultivar Fremont, houve redução na atividade enzimática 24 HAI nas folhas não inoculadas, que retornou aos níveis iniciais no tempo de avaliação posterior. Diferentemente, a atividade enzimática não diferiu entre as folhas inoculadas em todos os tempos analisados, incluindo 24 HAI, quando foi superior às folhas não inoculadas.

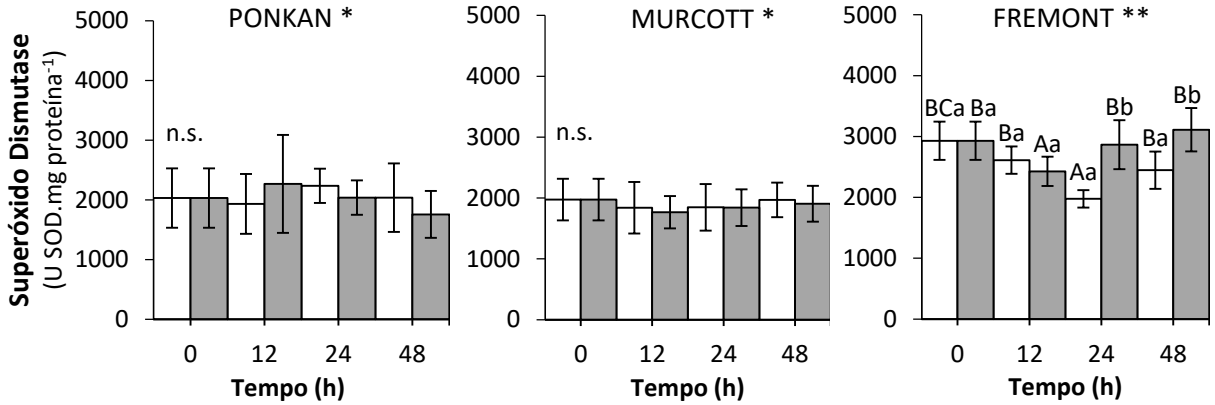

Figura 17. Atividade de superóxido dismutase em folhas de tangerinas cvs. Ponkan, Murcott e Fremont em diferentes tempos após a inoculação. Folhas destacadas foram pulverizadas com água destilada estéril (□ - não inoculadas) ou (■ – inoculadas) com $1x10^5$ esporos.mL^{-1} de *Alternaria alternata*. Médias seguidas da mesma letra (maiúsculas dentro de inoculadas ou não inoculadas e minúsculas dentro de cada tempo) não diferem entre si nas análises foram realizadas dentro de cada cultivar pelo teste de Student Newman-Kels (SNK) ($p<0,05$). Os asteriscos comparam as atividades médias entre as cultivares (SNK $p<0,05$). n.s.: não houve diferença significativa pelo teste de Fischer ($p<0,05$).

2.3.3. Peróxido de hidrogênio

2.3.3.1. Quantificação de peróxido de hidrogênio nas folhas

Como se pode observar pela Figura 18, não foi possível notar diferenças nas concentrações de peróxido de hidrogênio nos diferentes tempos de avaliação dentro das cultivares avaliadas. Observou-se, no entanto, que a cultivar Fremont apresentou constitutivamente concentrações de peróxido de hidrogênio em média 52 % superior em relação à cultivar Ponkan e 82 % superior quando comparada à cultivar Murcott.

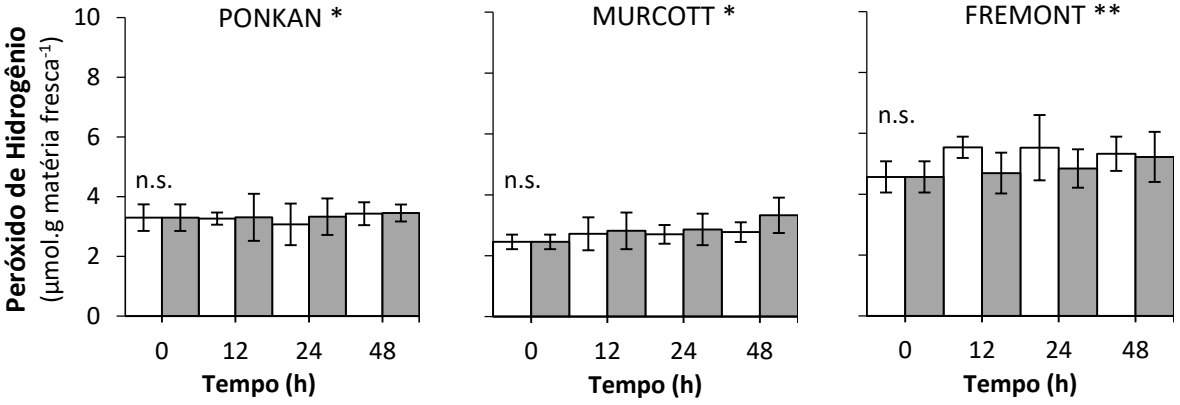

Figura 18. Teor de peróxido de hidrogênio em folhas de tangerinas cvs. Ponkan, Murcott e Fremont em diferentes tempos após a inoculação. Folhas destacadas foram pulverizadas com água destilada estéril (□ - não inoculadas) ou (■ – inoculadas) com $1x10^5$ esporos.mL^{-1} de *Alternaria alternata*. Os asteriscos comparam as atividades médias entre as cultivares (SNK p<0,05). n.s.: não houve diferença significativa dentro da cultivar pelo teste de Fischer (p<0,05).

2.3.3.2. Acúmulo de peróxido de hidrogênio nas folhas

Por meio das imagens observadas na Figura 19, é possível notar que não houve precipitação de DAB nas folhas das três cultivares avaliadas quando não inoculadas com o patógeno (Figura 19 A, C e E). Porém, quando se analisaram as folhas inoculadas, houve precipitação de DAB em folhas das cultivares Ponkan (Figura 19 B) e Murcott (Figura 19 D) 24 HAI, indicando que houve reação de hipersensibilidade. Não foi observada reação de hipersensibilidade em folhas inoculadas da cultivar Fremont (Figura 19 E).

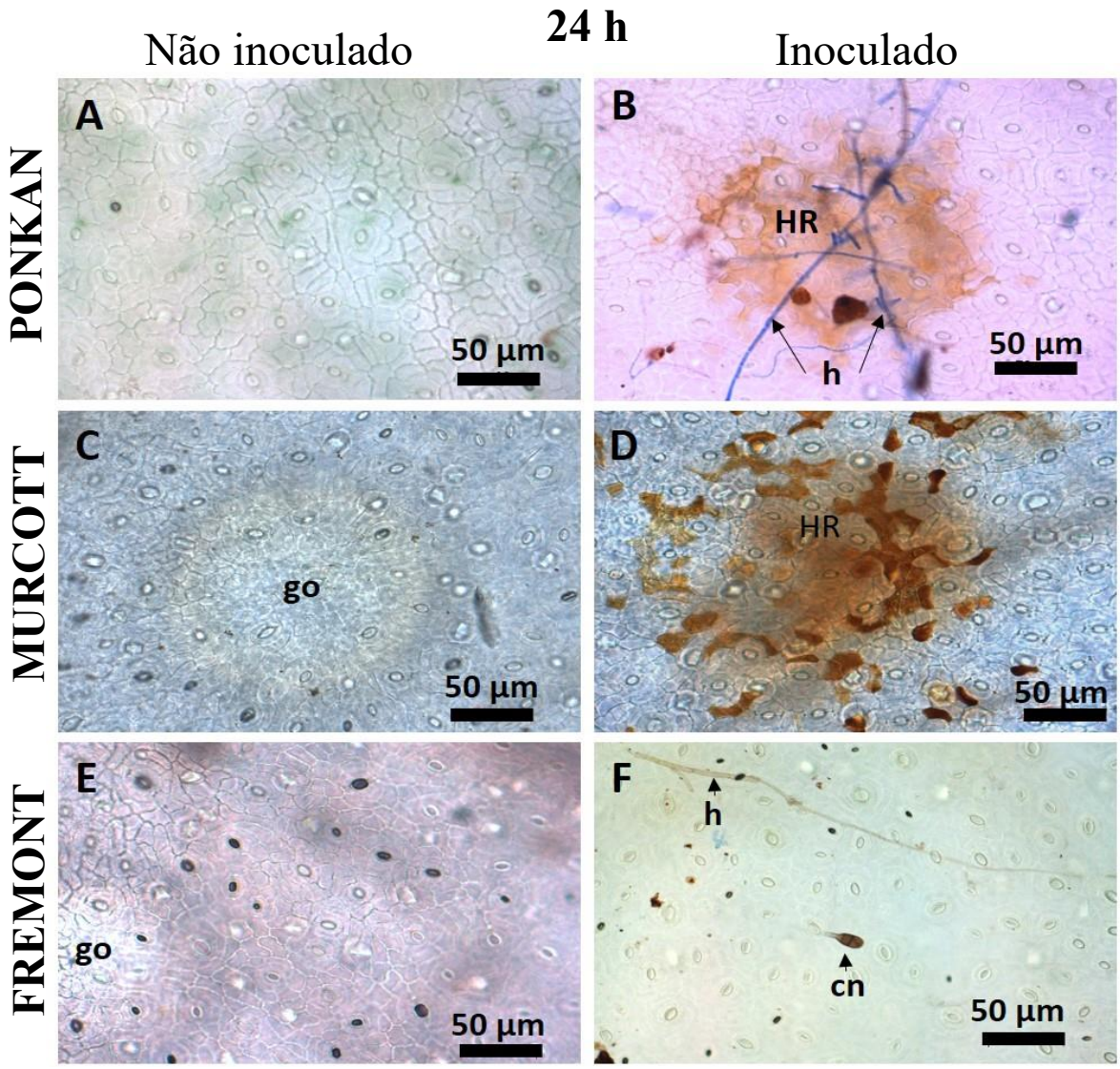

Figura 19. Precipitação de diaminobenzina (DAB) folhas de tangerina cvs. Ponkan (A-B), Murcott (C-D) e Fremont (E-F). As folhas foram pulverizadas com água destilada estéril (A, C, E) ou com 8×10^4 conídios.mL^{-1} e avaliadas 24 HAI. RH = resposta de hipersensibilidade demonstrada pela precipitação de DAB de coloração alaranjada. h = hifas de *A. alternata* pigmentadas com corante Azul de Amann. cn = conídio de *A. alternata*. go = glândula oleífera da folha.

Como demonstrado pela Figura 20 (A, C, E) é possível verificar que as folhas que foram pulverizadas com água não apresentaram precipitação de DAB mesmo após 48 HAI. Porém, quando se observaram as imagens das cultivares Ponkan (Figura 20 B) e Murcott (Figura 20 D) inoculadas, a precipitação do DAB se tornou mais nítida e a coloração adquiriu tonalidade mais castanha em relação àquelas avaliadas 24 HAI. Esses acúmulos, característicos de reação de hipersensibilidade, apresentaram, geralmente, formato circular, abrangendo numerosas células. Na Figura 20 D, inclusive, é possível notar a presença de um

conídio de *A. alternata* bem ao centro da RH. A precipitação de DAB não foi observada na cv. Fremont (Figura 20 F).

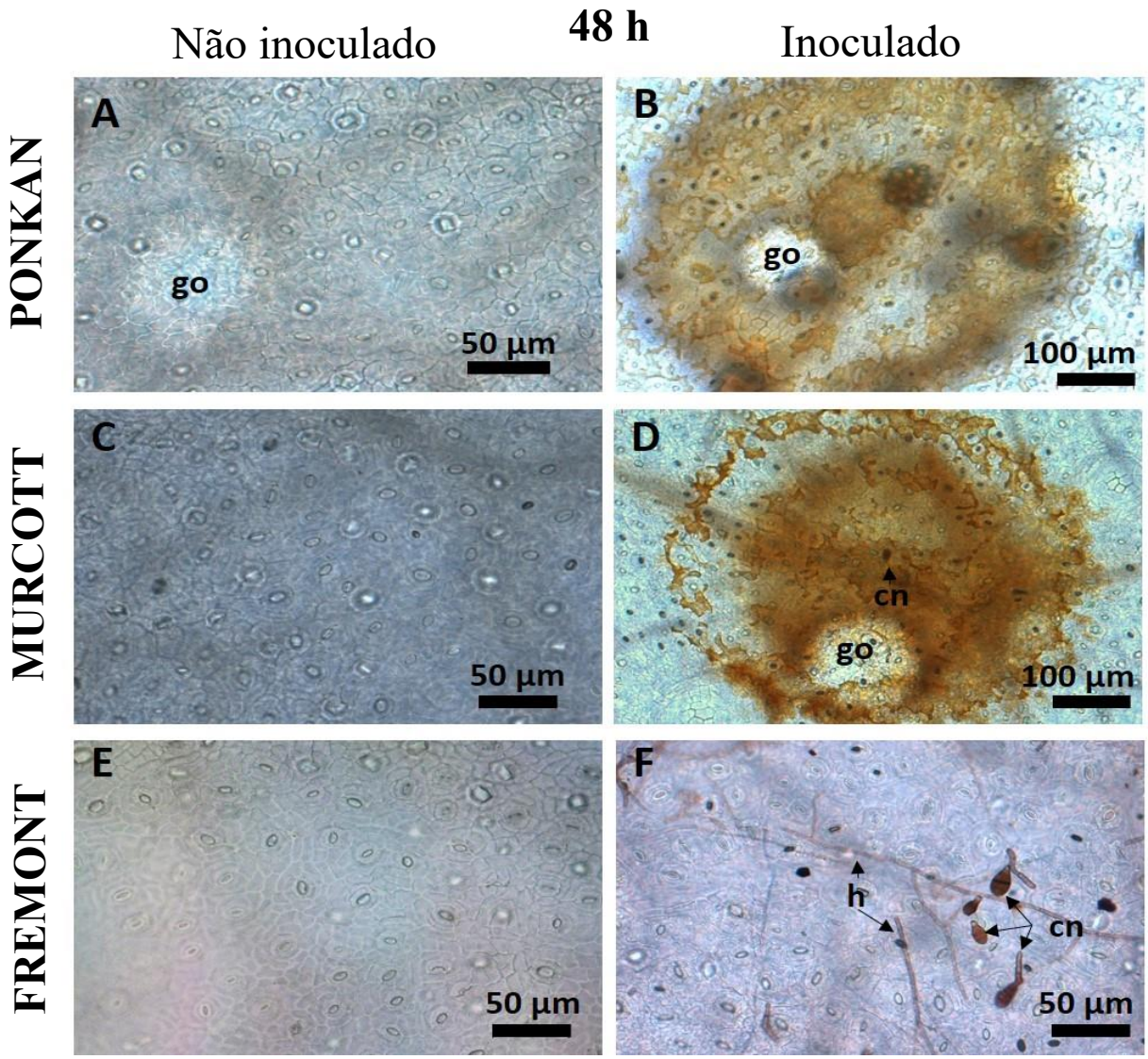

Figura 20. Precipitação de diaminobenzina (DAB) folhas de tangerina cvs. Ponkan (A-B), Murcott (C-D) e Fremont (E-F). As folhas foram pulverizadas com água destilada estéril (A, C, E) ou com 8×10^4 conídios.mL^{-1} e avaliadas 48 HAI. RH = resposta de hipersensibilidade demonstrada pela precipitação de DAB de coloração alaranjada. h = hifas de *A. alternata* pigmentadas com corante Azul de Amann. cn = conídio de *A. alternata*. go = glândula oleífera da folha.

2.3.3.3. Sensibilidade de *Alternaria alternata* ao peróxido de hidrogênio *in vitro*

Ao se analisar o efeito do peróxido de hidrogênio sobre o crescimento micelial *in vitro* (Figura 21), verificou-se que o fungo é sensível a essa espécie reativa de oxigênio de

forma diretamente proporcional a partir da concentração de 2,5 mmol de peróxido de hidrogênio.g de meio de cultura^{-1}, não apresentando crescimento das colônias na concentração de 20 mmol.g de meio de cultura^{-1} até 6 dias após a repicagem.

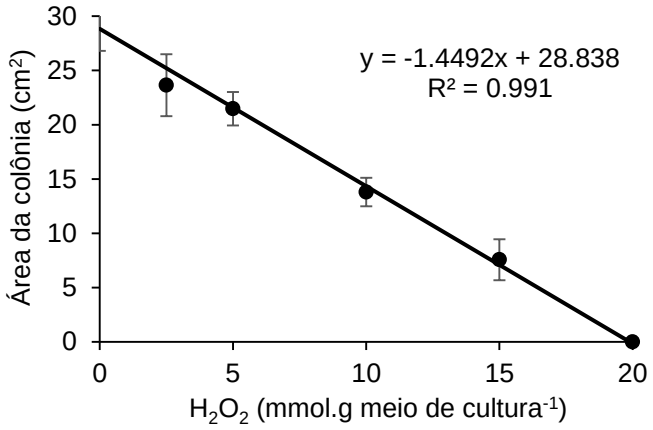

Figura 21. Efeito de concentrações de peróxido de hidrogênio sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata*. O peróxido de hidrogênio foi incorporado ao meio de cultura BDA nas diferentes concentrações. As colônias foram avaliadas 6 dias após a repicagem. Houve efeito de dose pelo teste de Fischer ($p<0,05$). Os pontos representam a média de dois experimentos distintos ± desvio padrão.

2.3.3.4. Quantificação de melondialdeído

A peroxidação de lipídios foi verificada indiretamente pela quantificação de melondialdeído (MDA). Por meio dos resultados obtidos, houve diferença nas concentração de MDA nas cultivares Ponkan e Murcott, porém, o mesmo não foi notado na cultivar Fremont (Figura 22). No caso da cultivar Ponkan, houve aumento nas concentrações de MDA em todos os tempos a partir do tempo “0”, porém, 24 HAI as folhas inoculadas apresentaram um pico na concentração dessa molécula, igualando-se novamente às folhas não inoculadas 48 HAI. No caso da cultivar Murcott, não houve aumento na concentração de MDA 12 HAI nas folhas não inoculadas em relação ao tempo 0, mas sim no caso das folhas inoculadas. Nos tempos 24 HAI e 48 HAI houve aumento das concentrações de MDA em relação ao tempo 0 nas folhas não inoculadas, igualando-as às folhas inoculadas.

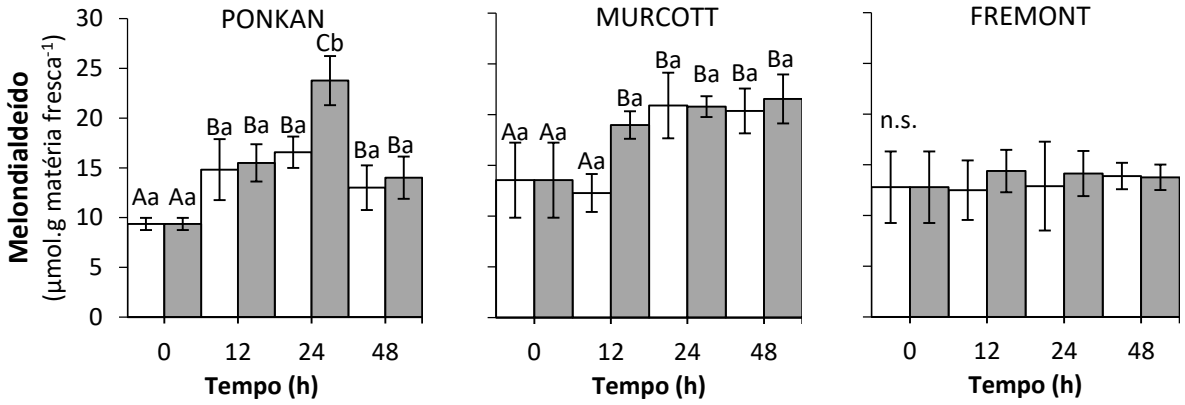

Figura 22. Concentração de melondialdeído (MDA) em folhas de tangerinas cvs. Ponkan, Murcott e Fremont em diferentes tempos após a inoculação. Folhas destacadas foram pulverizadas com água destilada estéril (☐ - não inoculadas) ou (■ – inoculadas) com $1x10^5$ esporos.mL^{-1} de *Alternaria alternata*. Os asteriscos comparam as atividades médias entre as cultivares (SNK $p<0,05$). n.s.: não houve diferença significativa dentro de cada cultivar pelo teste de Fischer ($p<0,05$).

2.3.4. Microscopia de luz (ML)

Em nenhuma das amostras analisadas por ML foi verificada a presença de hifas no interior do tecido foliar. Na Figura 23, os sintomas nas cultivares suscetíveis (Ponkan e Murcott) puderam ser notados 36 HAI. Os sintomas histológicos iniciaram na epiderme abaxial (lado da inoculação), onde células com coloração azul mais intensa indicaram os locais onde houve desorganização celular. Também houve aumento do espaços intercelulares no parênquima das cultivares Ponkan e Murcott. Adicionamente, nas três cultivares estudadas, e tanto em folhas inoculadas quanto nas não inoculadas, verificou-se a presença de plasmólise. Não foi possível notar alterações nos feixes vasculares da nervura central em quaisquer tratamentos.

No tempo de 72 HAI, áreas sintomáticas se tornaram evidentes. Na cultivar Ponkan, observou-se aprofundamento da epiderme e maceração de paredes celulares. As lacunas formadas por essa destruição parenquimática ficaram evidentes quando se comparou com o tecido de folhas não inoculadas. Os sintomas foram observados em ambos os lados da folhas, com desorganização atingindo o parênquima paliçádico. Os vasos condutores (xilema e floema) estavam desorganizados. No caso da cultivar Murcott os sintomas também ficaram evidentes na superfície inoculada, porém, menos intensamente, não atingindo as células do lado adaxial nem os vasos condutores. As folhas da cultivar Fremont, tanto inoculadas quanto

não inoculadas, apresentaram plasmólise de células epidérmicas e parenquimáticas. Não foram notadas alterações em vasos condutores.

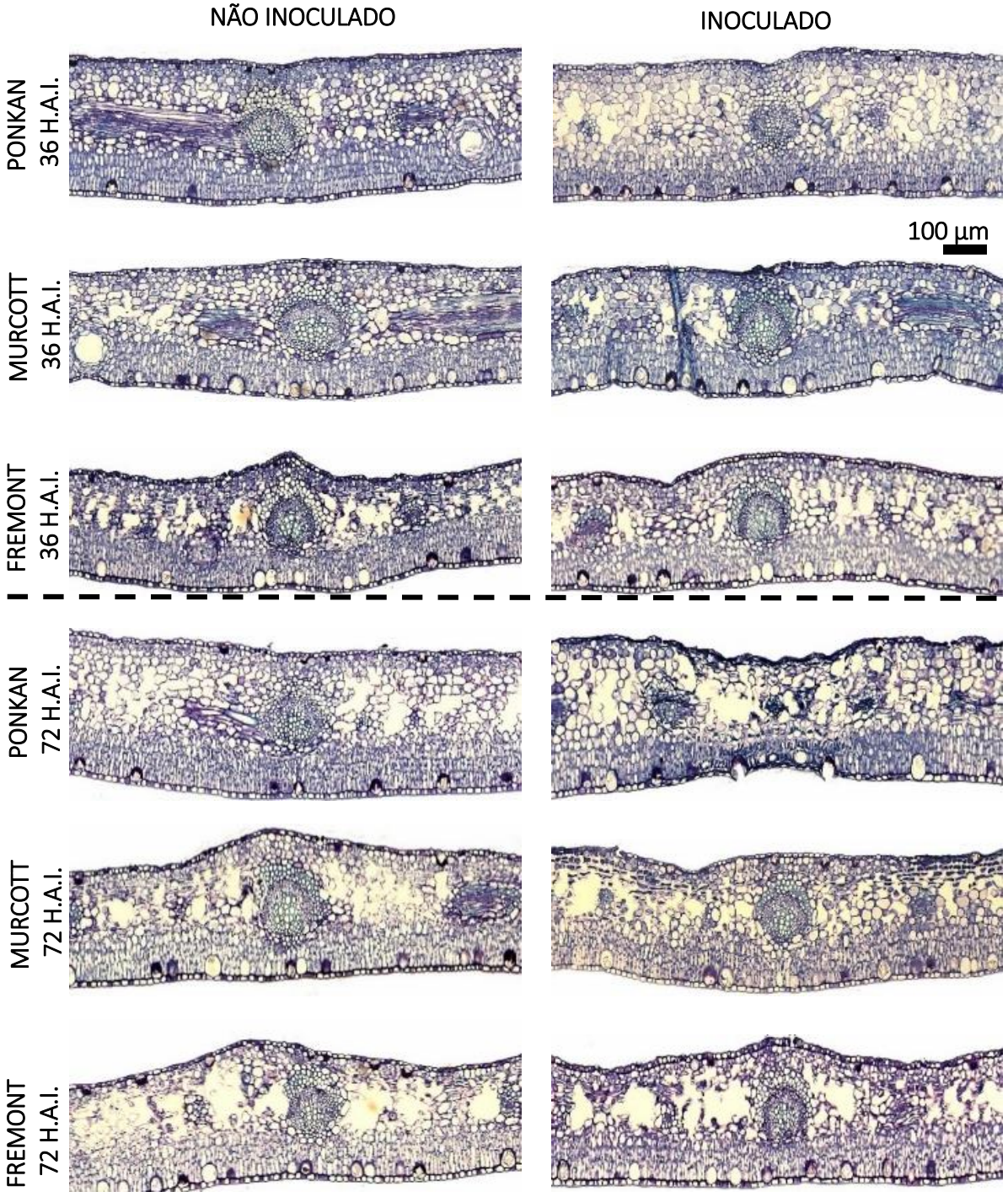

Figura 23. Cortes transversais (5 µm de espessura) de folhas de tangerinas inoculadas ou não com 1×10^5 esporos.mL^{-1}. Os fragmentos foram emblocados em resina (JB-4 – EMS), seccionados com micrótomo e corados com Azul de Toluidina (pH 6,8).

2.3.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Ao se avaliarem cortes histológicos das cultivares Ponkan, Murcott e Fremont por meio de MET, percebeu-se nas amostras não inoculadas (Figura 24 A e B) que não houve alterações nas membranas plasmáticas das células epidérmicas e parenquimáticas. Porém, plasmólise (Figuras 24C e 25C) e fragmentação das membrana plasmáticas nas células da epiderme e do parênquima (Figuras 24D e 25D) foram frequentemente observadas nas amostras inoculadas das cultivares Ponkan e Murcott. Não foi detectada a presença de estruturas do patógeno, inter ou intracelularmente, em nenhuma das amostras inoculadas.

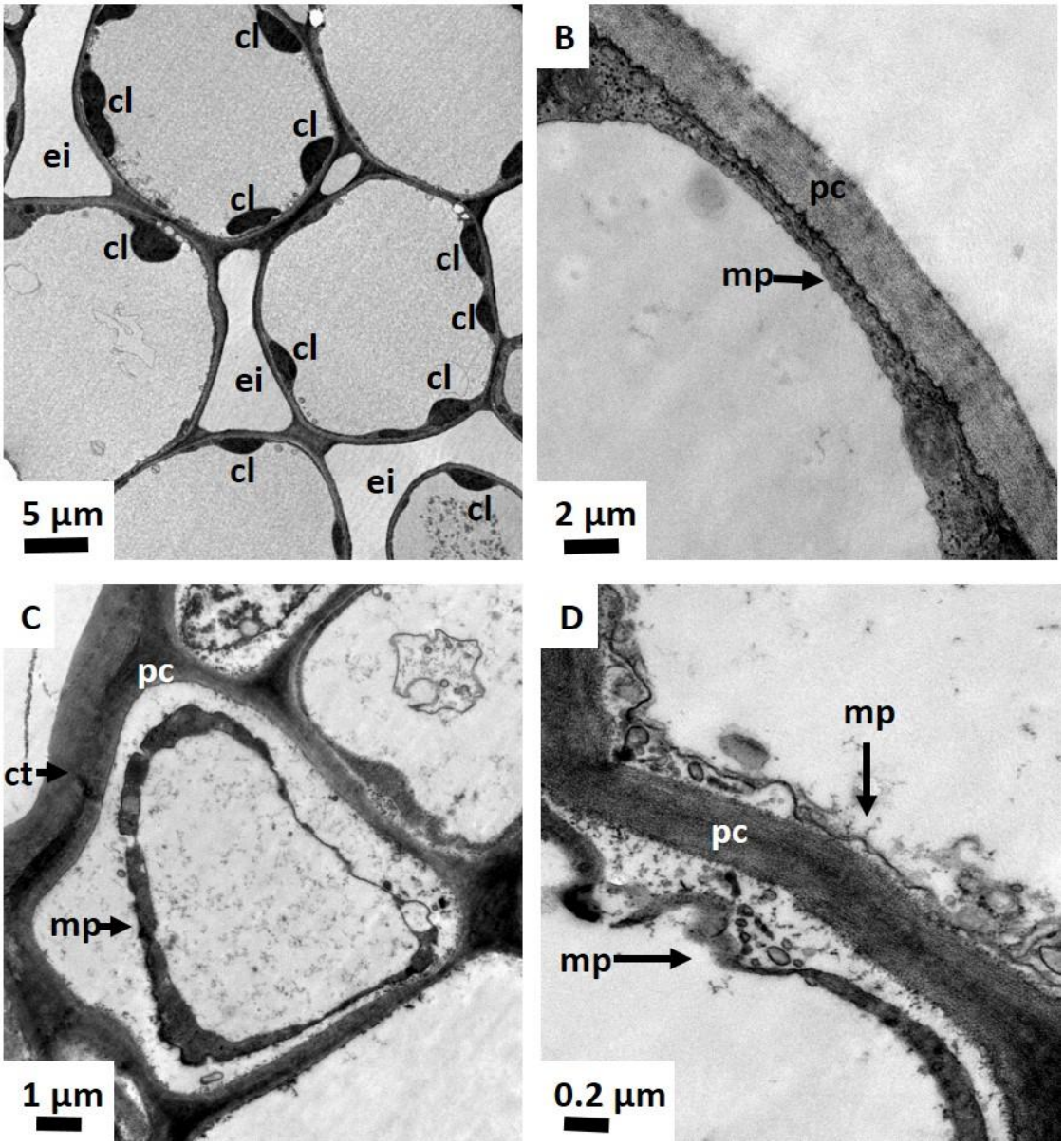

Figura 24. Fotomicrografias de células de tangerina cv. Ponkan. Em A e B, fotos de células parenquimáticas não inoculadas e, em C e D, células da epiderme abaxial 24 HAI. cl = cloroplasto; ct = cutícula; ei = espaço intercelular; mp = membrana plasmática; pc = parede celular.

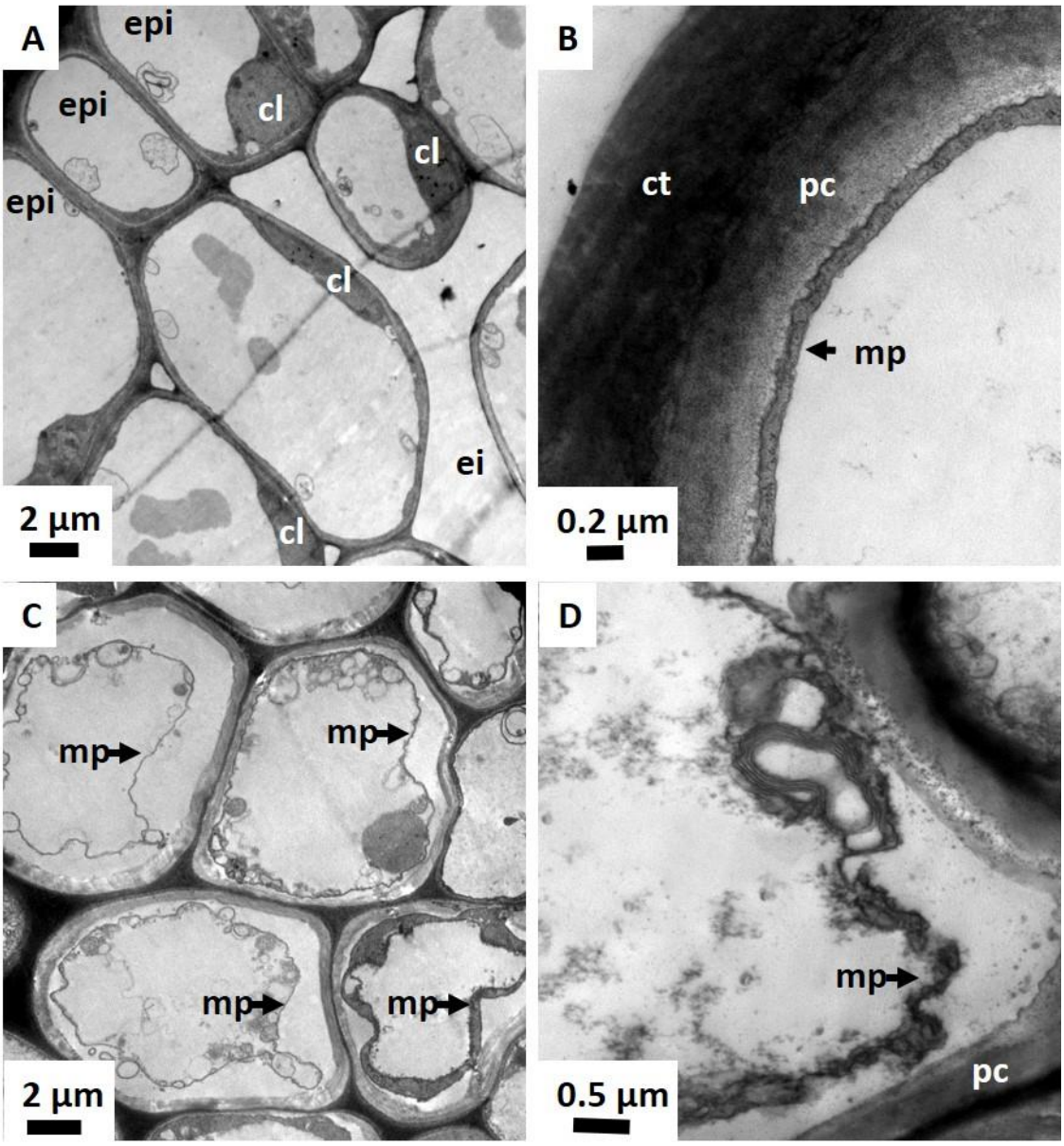

Figura 25. Fotomicrografias de células de tangerina cv. Murcott. Em A e B, fotos de células epidérmicas não inoculadas e, em C e D, células parenquimáticas 24 HAI. cl = cloroplasto; ct = cutícula; ei = espaço intercelular; mp = membrana plasmática; pc = parede celular.

No caso da cultivar resistente Fremont, tanto as amostras não inoculadas (Figura 26 A-B) quando as células de folhas inoculadas com o patógeno (Figura 26 C-D), não apresentaram alterações ultraestruturais, como plasmólise e fragmentação nas membranas plasmáticas características da ação do patógeno como verificadas nas cultivares Ponkan e Murcott.

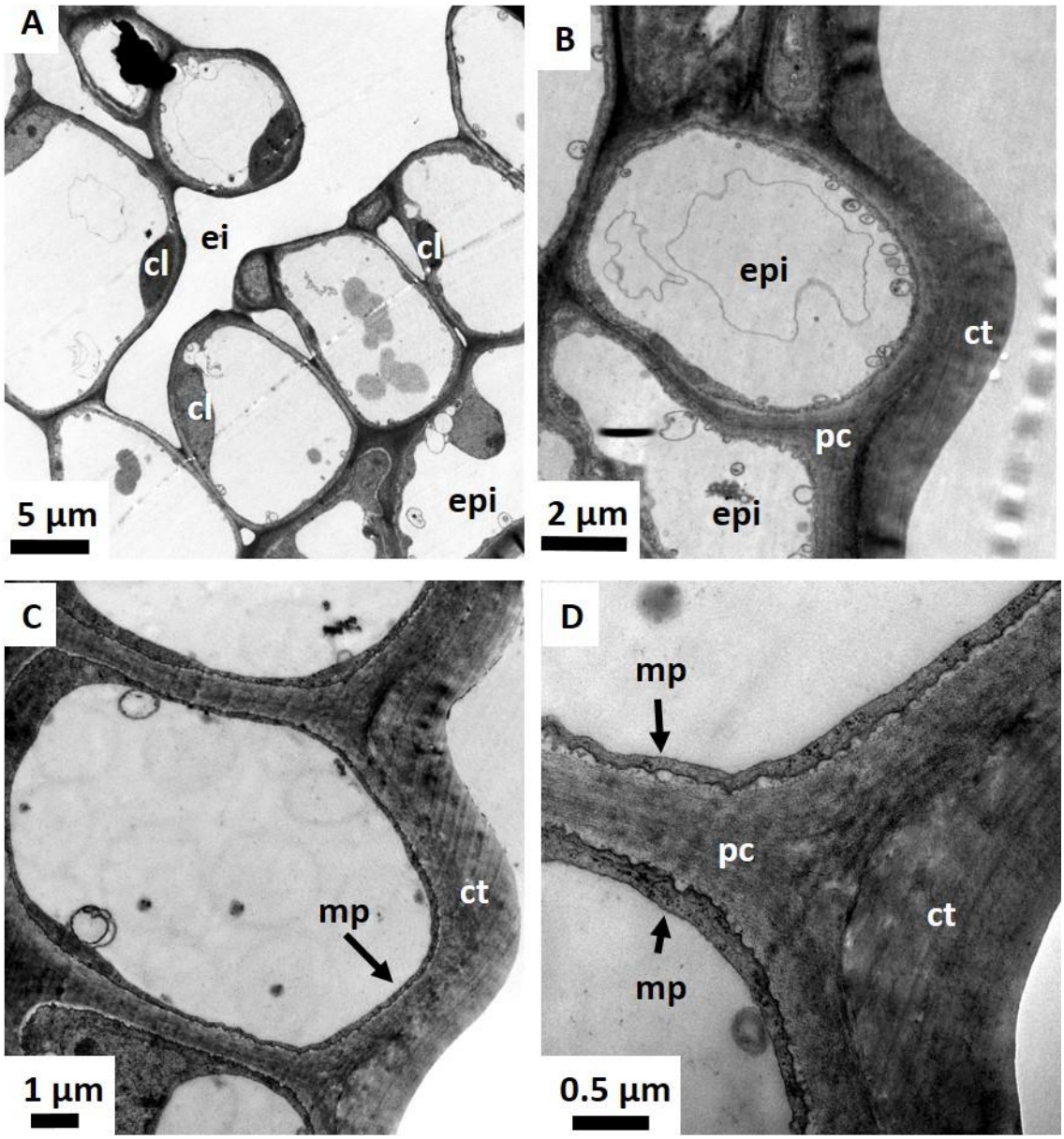

Figura 26. Fotomicrografias de células de tangerina cv. Fremont. Em A foto de células epidérmicas e parenquimáticas e em B detalhe de uma célula da epiderme abaxial não inoculadas e, em C e D, células epidérmicas 24 HAI. cl = cloroplasto; ct = cutícula; ei = espaço intercelular; mp = membrana plasmática; pc = parede celular.

2.4. Discussão

A mancha-marrom de Alternaria causada por *A. alternta* f.sp. *citri* patótipo "tangerina" é uma das principais doenças que acometem essa cultura (Bassanezi *et al.*, 2016). Diagnosticada em 2001 no Brasil (Goes *et al.*, 2001), destacou-se por incidir nas duas principais cultivares plantadas no Brasil, Ponkan e Murcott (Azevedo *et al.*, 2010), porém,

não causa doenças em algumas cultivares por motivos ainda não totalmente esclarecidos (Azevedo *et al.*, 2010; Pacheco, 2015; Michielin *et al.*, 2016).

Por meio dos resultados aqui obtidos, observou-se que a germinação e formação de apressórios sobre as folhas são iguais tanto nas cultivares suscetíveis quando na resistente. Avaliando por meio de MEV, no tempo de 6 HAI foi possível ver grande parte dos esporos germinados sobre as folhas com a presença de tubos germinativos. A formação de apressórios pode ser verificada 24 HAI em todas as cultivares. Também foi possível notar, raramente, a entrada de estruturas do fungo através dos estômatos, aparentando um acontecimento ao acaso. Esse processo inicial se assemelha com o descrito por Dita *et al.* (2007) que avaliaram a germinação de *A. solani* sobre folhas de batateira (*Solanum tuberosum*). Resultado semelhante também foi encontrado por Dehpour *et al.* (2010) avaliando a germinação *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo "tangerina" sobre folhas de tangelo Minneola (suscetível). Assim, sugere-se que a resistência da cultivar Fremont não esteja relacionada à germinação, crescimento e formação de apressórios sobre as folhas, assim como com a entrada do fungo nas aberturas estomáticas.

De acordo com os tempos aqui analisados, o estreitamento da relação entre o patógeno e as folhas ocorre por volta de 24 HAI, momento no qual as respostas bioquímicas também se intensificaram. O processo de respostas bioquímicas se inicia a partir do reconhecimento pela planta a partir de receptores que identificam padrões específicos na superfície celular (PRR, na sigla em inglês de "Pattern Recognition Receptors") de moléculas de microrganismos ou patógenos (MAMPS ou PAMPS, "Microbial – or Pathogen-associated Molecular Patterns") ou pelo reconhecimento, por parte da planta, de efetores do patógeno, como toxinas, por meio de proteínas presentes no interior das células as quais ativam a cascata de sinalização de MAP-kinases e expressão de genes relacionados à defesa (Jones & Dangl, 2006). No caso da cultivar Murcott foi notado aumento da concentração de MDA 12 HAI, indicando peroxidação lipídica. Assim, o reconhecimento do patógeno por parte das folhas não dependeu da formação de apressórios, tendo em vista que essas estruturas só foram vistas 24 HAI.

Após o reconhecimento do patógeno pela planta pode haver o processo denominado "explosão oxidativa", no qual há formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Entre as etapas iniciais de formação de EROs se destaca a atividade com complexo enzimático NADPH-oxidases presente na membrana plasmática. Estas enzimas resultam na transferência de elétrons e formação de radical superóxido (O^-) o qual pode, por sua vez, resultar na peroxidação de lipídios ou ser transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da

superóxido dismutase (SOD) (Resende *et al.*, 2003). Das cultivares avaliadas, somente a cultivar Fremont demonstrou alteração na atividade da SOD, cuja atividade caiu nas folhas não inoculadas mas se manteve constante no decorrer do tempo nas folhas inoculadas. Pode-se presumir, nesse caso, que a cultivar resistente foi capaz de reconhecer o patógeno e manter a síntese da SOD a níveis estáveis devido a um possível aumento da concentração do radical superóxido decorrente desse reconhecimento. No entanto, não foi quantificado o radical superóxido no presente estudo.

O passo seguinte no metabolismo de EROs é a detoxificação do peróxido de hidrogênio pela ação da catalase (CAT), enzima que transforma H_2O_2 em H_2O e O_2 (Resende *et al.*, 2003). Notou-se que as folhas inoculadas das cultivares Ponkan e Murcott apresentaram um único pico de atividade enzimática ao longo do tempo, enquanto que a cultivar resistente apresentou dois picos de atividade (12 HAI e 48 HAI). O acúmulo de peróxido de hidrogênio nas folhas suscetíveis (Ponkan e Murcott) inoculadas com o fungo foi evidente quando se realizou o teste com diaminobenzidina. Ao mesmo tempo, ressalta-se a baixa atividade de CAT nessas cultivares, resultando em resposta de hipersensibilidade (RH), o que não ocorreu com a resistente Fremont. Contudo, é preciso destacar que o peróxido de hidrogênio é uma molécula bastante instável e no experimento quantitativo não foi possível diferenciar suas concentrações dentro de cada cultivar quando se compararam folhas suscetíveis e resistentes. Mas, salienta-se que o experimento quantitativo foi realizado apenas uma vez, portanto, sugere-se a adaptação do método descrito por Alexieva *et al.* (2001) para o estudo do patossistema tangerina x *Alternaria alternata*.

A partir de então, é possível supor dois tipos de relações nas cultivares estudadas. Nas suscetíveis (Ponkan e Murcott) ocorre o acúmulo de peróxido de hidrogênio e reação de hipersensibilidade (RH), com baixa detoxificação de peróxido de hidrogênio pela CAT. Diferentemente, a cultivar resistente apresenta aumento nos níveis de CAT, não ocorre acúmulo de peróxido de hidrogênio e, consequentemente, RH. Jones & Dangl (2006) indicam que reações de defesa com RH não são eficazes contra patógenos necrotróficos, o que coaduna com os presentes resultados, onde ocorreu RH justamente nas cultivares suscetíveis. Sugere-se aqui, portanto, que os mecanismos de detoxificação de EROs envolvendo CAT e SOD podem estar envolvidos no sistema de defesa da Fremont contra a infecção por *A. alternata* por evitar RH.

Sabe-se que a reação de hipersensibilidade é uma forma de defesa da planta, principalmente contra patógenos biotróficos (Yang *et al.*, 2009), os quais necessitam das células do seu hospedeiro vivas. Porém, no caso de patógenos necrotróficos, a morte celular

pode ser, inclusive, uma estratégia de acesso aos nutrientes da planta. Lin *et al.* (2011) verificaram que plantas inoculadas com *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo “tangerina” apresentavam acúmulo de peróxido de hidrogênio, resposta de hipersensibilidade e peroxidação de lipídios. Porém, para o patógeno causar doença, o mesmo precisa eliminar espécies reativas de oxigênio utilizando seu complexo de NADPH-oxidases (Yang & Chung, 2012). Ou seja, a RH de plantas à infecção de patógenos necrotróficos pode resultar no fenótipo suscetível ou resistente de acordo com a capacidade do fungo em eliminar as EROs produzidas pela planta. No presente estudo, verificou-se que para evitar o crescimento micelial de *A. alternata* foi necessária a concentração de 20 mmol (ou 20000 µmol) de H_2O_2 por grama de meio de cultura. Isso representa 4000 vezes mais H_2O_2 do que o quantificado nas folhas da cultivar Fremont, a qual apresentou em média 5 µmol de H_2O_2.g matéria fresca^{-1}.

Outra forma de metabolização do peróxido de hidrogênio por parte das plantas é sua utilização como doador de elétrons para formação de compostos fenólicos precursores de lignina, síntese de auxinas e de metabólitos secundários (Hiraga, 2001). Os presentes resultados demonstraram que somente a cultivar Ponkan apresentou pico de atividade enzimática nas folhas inoculadas no último tempo de avaliação, enquanto que na cultivar Murcott houve redução na atividade enzimática nas folhas inoculadas no tempo de 24 HAI. Além das peroxidases estarem envolvidas na síntese de componentes de parede e no metabolismo secundário, indica-se que também estejam presentes no processo de senescência (Passardi *et al.*, 2005). A senescência precoce de folhas de tangerineiras atacadas por *A. alternata* é, também, um dos sintomas da doença (Bassanezi *et al.*, 2016). Assim, as alterações no metabolismo de POX nas cultivares suscetíveis podem estar relacionadas ao processo de senescência das folhas doentes, já que nenhuma alteração foi detectada na cultivar resistente.

Os efeitos da degradação celular nas folhas das cultivares Ponkan e Murcott puderam ser vistos por meio de cortes histológicos analisados por microscopia de luz. Apesar do grande número de cortes histológicos analisados (cerca de 240 por tratamento) não foi possível observar estruturas do patógeno dentro das folhas de nenhuma das cultivares. Uma possibilidade aqui sugerida é a de que o patógeno utiliza apressórios apenas para se fixar sobre as folhas e seu acesso ao conteúdo celular ocorra após a morte das mesmas, ocasionada pela ação da sua toxina.

Para atuação de toxinas específicas de hospedeiros, como a produzida por *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo “tangerina”, é necessária a presença de um alvo específico no

hospedeiro. Para *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo “limão-rugoso” se sabe que o sítio de ação da toxina ACRL se encontra nas membranas mitocondriais. No caso do patótipo “tangerina”, sugere-se que seu alvo esteja na membrana plasmática (Kohmoto *et al.*, 1991). Nos testes de MET aqui realizados, foram observadas plasmólise e fragmentação das membranas plasmáticas de células da superfície abaxial, lado das folhas onde foi realizada a inoculação, das cultivares suscetíveis Ponkan e Murcott, semelhante ao observado por Kohmoto *et al.* (1991) nas cultivares Dancy e Emperor. O mesmo não ocorreu na cultivar Fremont.

Frente ao até aqui exposto, sugere-se que os processos iniciais de infecção e colonização de *A. alternata* f.sp. *citri* patótipo “tangerina” nas cultivares suscetíveis Ponkan e Murcott dependem do reconhecimento do patógeno por parte das plantas, o que resulta em resposta de hipersensibilidade. Por se tratar de uma patógeno necrotrófico, capaz de detoxificar o peróxido de hidrogênio, a RH que normalmente é relacionada à defesa da planta, favorece a colonização do fungo. A cultivar resistente Fremont, por sua vez, não responde à inoculação com RH mas aumenta seu metabolismo de eliminação de espécies reativas de oxigênio, o que pode estar relacionado à sua resistência à doença.

Referências

Akimitsu K, Kohmoto K, Otani H, Nishimura S, 1989. Host-specific effects of toxin from the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata* on mitochondria. *Plant physiology* **89**, 925–931.

Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E, 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* **24**, 1337–1344.

Aragaki M, 1961. Quality of radiation inhibitory to sporulation of *Alternaria tomato*. *Phytopathology* **51**, 803–805.

Araujo L, Paschoalino RS, 2015. MMicroscopic aspects of silicon-mediated rice resistance to leaf scald. *Phytopathology*.

Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ, 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* **104**, 280–292.

Azevedo FA, Polydoro DA, Bastianel M *et al.*, 2010. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação in vitro e in vivo de *Alternaria alternata*. *Revista Brasileira de Fruticultura* **32**, 944–951.

Barnett HL, Hunter BB, 1986. *Illustrated genera of imperfect fungi*. New York: New York Macmillan.

Bassanezi RB, Silva Jr. GJ, Feichtenberger E, Belasque Jr. J, Behlau F, Wulff NA, 2016. Doenças dos Citros. In: Amorim L,, Rezende JAM,, Bergamim Filho A,, Camargo LEA, eds. *Manual de Fitopatologia*. Ouro Fino: Ceres, 292–293.

Bastianel M, Simonetti LM, Schinor EH *et al.*, 2014. Avaliação do banco de germoplasma de mexericas com relação a características físico-químicas e suscetibilidade à mancha marrom de alternária. *Bragantia* **73**, 23–31.

Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–54.

Carvalho DDC, Alves E, Barbosa Camargos R *et al.*, 2011. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. *Revista Iberoamericana de Micologia* **28**, 173–178.

Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA *et al.*, 2004. First report of the causal agent of huanglongbing ("*Candidatus* Liberibacter asiaticus") in Brazil. *Plant Disease* **88**, 1382–1382.

Daudi A, O'Brien JA, 2012. Protocolo DAB. *Bio-protocol* **2**, 20–23.

Dehpour AA, Majd A, Alavi S V., 2010. Histopathological studies with electron microscopy (SEM & TEM) of *Alternaria alternata*, causal agent of brown spot and black rot diseases (as postharvest diseases) on citrus in the North of Iran. In: *Acta Horticulturae*. 1655–1662.

Dhingra DO, 1985. *Basic Plant Pathogen Methods*. Boca Raton: CRC Press.

Dita MA, Brommonschenkel S, Mizubuti ESG, 2007. Histopathological study of the *Alternaria solani* infection process in potato cultivars with different levels of early blight resistance. *Journal of Phytopathology* **155**, 462–469.

Feichtenberger E, Bassanezi BB, Spósito MB, Berlasque Jr. J, 2005. Doenças dos citros. In: Kimati H,, Amorim L,, Rezende JAM,, Bergamim Filho A,, Camargo LEA, eds. *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Ceres, 239–269.

Felipini RB, Boneti JI, Katsurayama Y *et al.*, 2016. Apple scab control and activation of plant defence responses using potassium phosphite and chitosan. *European Journal of Plant Pathology*.

Garganese F, Schena L, Siciliano I *et al.*, 2016. Characterization of citrus-associated *Alternaria* species in mediterranean areas, 1–18.

El Ghaouth A, Arul J, Grenier J, Benhamou N, Asselin A, Bélanger R, 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defenses reactions. *Phytopathology* **84**, 313–320.

Giannopolitis CN, Ries SK, 1977. Superoxide Dismutases. *Plant physiology* **59**, 309–314.

Goes A, Montes de Oca AG, Reis RF, 2001. Ocurrencia de la mancha de alternaria em mandarina “Dancy” en el Estado de Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira* **26**, 386.

Gonçalves RC, Alfenas AC, Mafia RG, 2016. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: Alfenas AC,, Mafia R., eds. *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa: UFV, 101–102.

Griffin DH, 1994. *Fungal Physiology*. New York: Wiley-Liss.

Harkin JM, Obst JR, 1973. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidases participation. *Science* **180**, 296–298.

Heath RL, Packer L, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189–198.

Heiser I, Obwald W, Elstner EF, 1998. The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Physiological Biochemistry* **36**, 703–713.

Heiser I, Osswald WF, 2008. Formação e função das espécies reativas de oxigênio nas interações planta-patógeno. In: Pascholati SF,, Leite B,, Stangarlin JR,, Cia P, eds. *Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Piracicaba: FEALQ, 627.

Hiraga S, 2001. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 462–468.

de Hoog GS, Gerrits van den Ende AHG, 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses* **41**, 183–189.

IBGE, 2014. Banco de dados agregados.

Jones JDG, Dangl JL, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.

Karnovsky MJ, 1965. A formaldehyde-glutaraldeyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**, 137–138.

Kawamura C, Tsujimoto T, Tsuge T, 1999. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **12**, 59–63.

Klebs G, 1899. Zur Physiologie fier Fortpflanzung einiger Pilze. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik* **33**, 513.

Kohmoto K, Akimitsu K, Otani H, 1991. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. *Phytopathology* **81**, 719–722.

Kohmoto K, Itoh Y, Shimomura N *et al.*, 1993. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* **83**, 495–502.

Kohmoto K, Scheffer RP, Whiteside J., 1979. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. *Phytopathology* **69**, 667–671.

Koshikumo ESM, 2011. Identificação molecular e morfológica, métodos de esporulação, indução e detecção de Cercospora do milho. Universidade Federal de Lavras.

Kraus TE, McKersie BD, Fletcher RA, 1995. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. *Journal of Plant Physiology* **145**, 570–576.

Leach CM, 1962. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. *Can J Bot* **40**, 151–161.

Leach CM, 1965. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Canadian Journal of Botany* **43**, 185–200.

Leach CM, 1967. Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercosporella*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *and Stemphylium*. *Canadian Journal of Botany* **45**, 1999–2016.

Lin CH, Yang SL, Chung KR, 2011. Cellular responses required for oxidative stress tolerance, colonization, and lesion formation by the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in *Citrus*. *Current Microbiology* **62**, 807–815.

Llorens E, Fernández-Crespo E, Vicedo B, Lapeña L, García-Agustín P, 2013. Enhancement of the citrus immune system provides effective resistance against Alternaria brown spot disease. *Journal of Plant Physiology* **170**, 146–154.

Massa GD, Kim HH, Wheeler RM, Mitchell CA, 2008. Plant productivity in response to LED lighting. *HortScience* **43**, 1951–1956.

Michielin THV, Cristofani-yaly M, Campos, Kelly Aparecida Fernandez de, Schinor H, Azevedo FA de, Bastianel M, 2016. Reação de híbridos de citros à inoculação com *Alternaria alternata*. *Summa Phytopathologica* **42**, 313–320.

Nishimura S, 1978. Host-specific toxins from *Alternaria alternata*: problem and prospects. *roceedings of the Japan Academy* **B56**, 362–366.

Nishimura S, Kohmoto K, 1983. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria*

species. *Annual Review of Phytopathology* **21**, 87–116.

Oliveira JA, 1991. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Pacheco CDA, 2015. Aspectos histológicos, físico-químicos, sensoriais e fitotecnicos da tangerina Fremont. Instituto Agronômico.

Pacheco CDA, Martelli IB, Polydoro DA *et al.*, 2012. Resistance and susceptibility of mandarins and their hybrids to *Alternaria alternata*. *Scientia Agricola* **69**, 386–392.

Park P, Nishimura S, Kohmoto K, Otani H, Tsujimoto K, 1981. Two action sites of AM-toxin I produced by apple pathotype of *Alternaria alternata* in host cells: an ultrastructural study. *Canadian Journal of Botany*, 301–310.

Park P, Ohno T, Nishimura S, Kohmoto K, Otani H, 1988. Golgi vesicles fused with invaginated plasma membranes in host cells treated with a host-specific toxin from japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **54**, 493–502.

Pascholati SF, Dalio RJD, 2018. Fisiologia do Parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorim L,, Rezende JAM,, Bergamim Filho A, eds. *Manual de Fitopatologia*. Ouro Fino: Ceres, 424–450.

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C, 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* **24**, 255–265.

Peever TL, Su G, Carpenter-Boggs L, Timmer LW, 2004. Molecular Systematics of Citrus-Associated Alternaria Species. *Mycologia* **96**, 119–134.

Pulz P, 2007. Crescimento e esporulação de Alternaria dauci e A. solani em meio de cultura. Universidade de São Paulo.

Pulz P, Massola NS, 2009. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de Alternaria dauci e A. solani. *Summa Phytopathologica* **35**, 121–126.

Reis RF, de Almeida TF, Stuchi ES, de Goes A, 2007. Susceptibility of citrus species to Alternaria alternata, the causal agent of the Alternaria brown spot. *Scientia Horticulturae* **113**, 336–342.

Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM, 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesade plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 123–130.

Rodrigues TTMS, A. Maffia L, D. Dhingra O, Mizubuti ESG, 2010. In vitro production of conidia of Alternaria solani. *Tropical Plant Pathology* **35**, 203–212.

Rotem J, 1994. The Genus *Alternaria: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity*. Minnesota:

APS PRESS.

Saunt J, 2000. *Citrus varieties of the world*. Norwish: England Sinclair International Ltd.

Scheffer RP, Livingston RS, 1984. Host-Selective Toxins and Their Role in Plant Diseases. *Science* **223**, 17–21.

Schwarz SF, 2009. Melhoramento genético e variedades. In: Koller OC, ed. *Citricultura: cultura de tangerineiras*. Porto Alegre: Rígel, 35–48.

Simmons EG, 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre.

Souza MC, Stuchi ES, de Goes A, 2009. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. *Scientia Horticulturae* **123**, 1–4.

Timmer LW, Gottwald TR, 2000. Greasy spot and similar disease. In: Timmer LW, Garnsey SM,, Graham JM, eds. *Compendium of Citrus Diseases*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 25–28.

Timmer LW, Solel Z, Gottwald TR, Ibanez AM, Zitko SE, 1998. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathology* **88**, 1218–1223.

Trione EJ, Leach CM, 1969. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. *Phytopathology* **59**, 1077–1083.

Vakalounakis DJ, Christias C, 1986. Light quality, temperature and sporogenesis in *Alternaria cichorii*. *Transactions of the British Mycological Society* **86**, 247–254.

Vale FXR, Fernandes Filho EI, Liberato J, 2001. Quantificação de doenças - Quant.

Witsch H V., Wagner F, 1955. Beobachtungen fiber den Einflull des Lichtes auf Mycel- und Conidienbildung bei *Alternaria brassicae* var. *dauci* . *Archiv für Mikrobiologie* **312**, 307–312.

Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW, 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* **75**, 171–212.

Woudenberg JHC, van der Merwe NA, Jurjević Ž, Groenewald JZ, Crous PW, 2015a. Diversity and movement of indoor *Alternaria alternata* across the mainland USA. *Fungal Genetics and Biology* **81**, 62–72.

Woudenberg JHC, Seidl MF, Groenewald JZ *et al.*, 2015b. Alternaria section Alternaria: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* **82**, 1–21.

Yang SL, Chung KR, 2012. The nadph oxidase-mediated production of hydrogen peroxide (H_2O_2) and resistance to oxidative stress in the necrotrophic pathogen *Alternaria alternata* of citrus. *Molecular Plant Pathology* **13**, 900–914.

Yang SL, Lin CH, Chung KR, 2009. Coordinate control of oxidative stress tolerance, vegetative growth, and fungal pathogenicity via the AP1 pathway in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**, 100–110.

Zauza EAV, Alfenas AC, Mafia RG, 2016. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: Alfenas AC,, Mafia RG, eds. *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa: Editora UFV, 27–54.