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

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 – CaCO₃-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 CaCO₃-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 – CaCO₃-A). It was quantified the number of spores per mm² 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 CaCO₃-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 psílídio *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 morfológicos, 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 *Alternaria 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 “P₃₁₀” 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 (CaCO₃-A).

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 intensens. 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 plasmolysis 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 encontra 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 ($O_2^{\cdot-}$), 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 demonstrar 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.

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. Ocorrência 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-glutaraldehyde 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 der 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*, *Cercospora*, *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. *Proceedings 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 annuum* L.). Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- Pacheco CDA, 2015. Aspectos histológicos, físico-químicos, sensoriais e fitotécnicos da tangerina Fremont. Instituto Agrônômico.
- 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*. Norwich: 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.