



THIAGO OLIVEIRA CONDÉ

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE
ISOLADOS DE *Alternaria alternata* PATÓTIPO TANGERINA A
ESTROBILURINAS**

LAVRAS - MG

2018

THIAGO OLIVEIRA CONDÉ

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE
Alternaria alternata PATÓTIPO TANGERINA A ESTROBILURINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Eduardo Alves

Orientador

Dr. Silvino Intra Moreira

Coorientador

**LAVRAS - MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Condé, Thiago Oliveira.

Diversidade e caracterização da resistência de isolados de
Alternaria alternata patótipo tangerina a estrobilurinas / Thiago
Oliveira Condé. - 2018.

52 p.

Orientador(a): Eduardo Alves.

Coorientador(a): Silvino Intra Moreira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Fungicidas QoI. 2. Resistência. 3. *Alternaria alternata*. I.
Alves, Eduardo. II. Moreira, Silvino Intra. III. Título.

THIAGO OLIVEIRA CONDÉ

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE
Alternaria alternata PATÓTIPO TANGERINA A ESTROBILURINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de julho de 2018.

Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Jorge Teodoro de Souza	UFLA
Dra. Ester Alice Ferreira	EPAMIG

Prof. Dr. Eduardo Alves
Orientador

Dr. Silvino Intra Moreira
Coorientador

**LAVRAS - MG
2018**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Helena e Sebastião, os responsáveis pela minha formação como pessoa. Ao meu irmão, Wagner, pela amizade e companheirismo.

Aos meus avós Pedro e Maria (*in memoriam*), e ao meu tio Pedro Raimundo (*in memoriam*), pessoas especiais que se foram, mas que estão sempre conosco de alguma forma.

A todos os meus outros familiares, em especial minha madrinha Eliane e minha prima Patrícia, que me apoiaram e ajudaram em momentos difíceis.

Aos meus amigos de faculdade, em especial Wilson, Gabriel e Thiago, pela amizade, palavras de conforto e conselhos ao longo da minha graduação e pós-graduação.

Aos meus ex-companheiros de casa, Antônio, Cayque e Victor, pelos momentos de descontração.

À Carolina por todos os diálogos, conselhos, puxões de orelha e, especialmente, pela amizade incondicional.

À Flávia Fagundes por todo o apoio emocional durante a minha trajetória do mestrado.

Às pessoas que estiveram comigo durante meu intercâmbio e que compartilharam momentos marcantes em minha vida.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, pelo convívio diário e ensinamentos transmitidos.

A todos os meus professores, que contribuíram com o conhecimento a mim transmitido.

Ao professor Eduardo pela orientação e oportunidade de trabalhar no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA.

Ao Adriano e Fabiano pela amizade e ajuda na condução dos experimentos.

Ao Silvino, pela enorme contribuição dada por ele à esta obra, e amizade construída durante o período do meu mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA) e Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela concessão da bolsa e oportunidade de realizar o mestrado.

Finalmente, a todas as outras pessoas que, por ventura, fizeram parte da minha vida e contribuíram para este trabalho de alguma maneira, direta ou indiretamente.

RESUMO

Alternaria alternata patótipo tangerina é o agente causal da mancha marrom de alternaria, doença que atinge pomares de tangerinas e seus híbridos causando severos danos à produção. O primeiro relato do patógeno no Brasil foi em 2001 no Rio de Janeiro, com posteriores ocorrências em diversos estados produtores do país. Dezessete isolados foram identificados como *A. alternata* patótipo tangerina por meio de análises morfológicas, filogenéticas e testes de patogenicidade. Análise filogenética utilizando sequências do gene *endoPG* permitiram observar o agrupamento dos isolados em três linhagens anteriormente descritas para isolados distribuídos globalmente. Estes possuem origem em diferentes localidades da região Sudeste, e foram avaliados em relação a sua sensibilidade aos fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina. A maioria dos isolados foram insensíveis à azoxistrobina e a EC_{50} calculada foi superior a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, a EC_{50} para os isolados na presença de piraclostrobina variou entre 0,7831 a $45,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dois isolados foram identificados possuindo a mutação G143A que confere resistência a fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI). Os isolados com genótipos de resistência apresentaram menor eficiência na germinação de conídios e esporulação *in vitro* em relação a isolados sensíveis, indicando que pode haver um custo adaptativo para a presença da mutação G143A. Imagens obtidas através de microscopia laser confocal mostraram que conídios do isolado QoI-sensível PE15 apresentou alta produção de espécies reativas de oxigênio e morte celular devido a exposição ao fungicida piraclostrobina a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ao contrário, conídios do isolado QoI-resistente PE9 não apresentou morte celular nem evidência de acúmulo de espécies reativas de oxigênio quando exposto ao mesmo fungicida. A ocorrência de *A. alternata* com genótipo resistente sugere que as aplicações de estrobilurinas podem estar selecionando indivíduos resistentes nas áreas de cultivo amostradas.

Palavras-chave: Fungicidas QoI. Resistência. Mutação. Mancha marrom de alternaria. Custo adaptativo.

ABSTRACT

Alternaria alternata tangerine pathotype is the causal agent of citrus brown spot, a disease that affects tangerine and their hybrids causing severe yield losses. First report of the citrus brown spot in Brazil was in 2001 at the Rio de Janeiro state and later occurrences in different citrus producing states. Morphological data, phylogenetic analyses and pathogenicity tests were used to identify seventeen isolates as *A. alternata* tangerine pathotype. Phylogenetic analyses using *endoPG* gene sequences were clustered the isolates into three previously described lineages represented by worldwide reference strains. Isolates were originated from different locations in the Brazilian Southeast region and were examined for sensitivity to azoxystrobin and piraclostrobin. Most of isolates were insensitive to azoxystrobin and calculated EC_{50} was higher than $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. On the other hand, EC_{50} ranged from 0.7831 to $45.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the presence of piraclostrobin. Two isolates were identified carrying the point mutation G143A which confers QoI-fungicides resistance to strains. Resistant genotypes isolates showed lower efficiency for both esporulation and conidia germination compared to sensitive isolates, suggesting that may occurs a fitness cost associated to the point mutation G143A. Laser confocal micrographs revealed that PE15 QoI-sensitive isolate showed high reactive oxygen species production and cell death when exposed to piraclostrobin $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. On contrary, PE9 QoI-resistant isolate conidia do not demonstrated cell death or reactive oxygen species accumulation. The QoI-resistant-*A. alternata* genotypes occurrence suggests that strobilurins applications may be selecting resistant individuals in sampled citrus growing areas.

Keywords: QoI fungicides. Resistance. Mutation G143A. Citrus brown spot. Fitness cost.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Caracterização morfológica dos isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina.	36
Figura 2 - Filogenia gene <i>endoPG</i> estimada utilizando máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV).	37
Figura 3 - Fotografias mostrando a sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Alternaria alternata</i> ao fungicida inibidor externo da quinona (QoI) piraclostrobina	39
Figura 4 - Sequências do gene <i>cyt b</i> de isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina.	42
Figura 5 - Fotomicrografias obtidas em microscópio laser confocal da avaliação de espécies reativas de oxigênio e morte celular em conídios de <i>A. alternata</i>	45
Figura 6 - Eletromicrografias feitas em microscópio eletrônico de varredura com detalhes de conídios de <i>A. alternata</i> após 6 e 18h da inoculação em folhas destacadas de tangelo.....	47
Tabela 1 - Isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina utilizados nesse estudo	28
Tabela 2 - Valores médios da concentração efetiva que inibe o crescimento micelial em 50% (EC ₅₀) para azoxistrobina e piraclostrobina e presença da mutação G143A em isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina	40
Tabela 3 - Tabela comparativa entre os componentes do custo adaptativo da mutação G143A de isolados representativos QoI-resistentes e QoI-sensíveis de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina.	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 A mancha marrom de alternaria	14
2.2 Classificação do gênero <i>Alternaria</i>	15
2.3 Estudos filogeográficos.....	16
2.4 Resistência à fungicidas do grupo químico estrobilurinas	16
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
SEGUNDA PARTE	23
DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Alternaria alternata</i> PATÓTIPO TANGERINA A ESTROBILURINAS	23
1 INTRODUÇÃO	25
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Obtenção dos isolados	27
2.2 Identificação dos isolados.....	27
2.3 Testes de patogenicidade.....	29
2.4 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade dos isolados a fungicidas QoI.....	29
2.5 Avaliação do custo adaptativo da mutação G143A	30
2.5.1 Crescimento micelial	30
2.5.2 Germinação <i>in vitro</i>	30
2.5.3 Esporulação <i>in vitro</i>	31
2.6 Avaliação da germinação conidial <i>in vivo</i> utilizando microscopia eletrônica de varredura.....	31
2.7 Avaliação das espécies reativas de oxigênio e morte celular	32
2.8 Extração de DNA, amplificação dos genes alvo e sequenciamento.	32
2.9 Análise filogenética e detecção da mutação G143A.....	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Identificação dos isolados.....	35
3.1.1 Análise filogenética do gene <i>endoPG</i>	36
3.2 Caracterização <i>in vitro</i> da sensibilidade dos isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina à piraclostrobina	39

3.3 Detecção da substituição G143A nos isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina.....	41
3.4 Custo adaptativo da mutação G143A	42
3.5 Avaliação de EROS e morte celular.....	44
3.6 Germinação <i>in vivo</i> de conídios de <i>A. alternata</i>	46
4 CONCLUSÕES.....	48
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A mancha marrom de alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata* (Fr.:Fr) Keissl. patótipo tangerina, é uma doença que atinge pomares de cultivares de tangerina e seus híbridos em diversas regiões produtoras de citros pelo mundo. A presença deste em áreas de cultivo de citros já foi relatada na Austrália, Europa, África do Sul, Israel, Estados Unidos, Argentina, Perú e Brasil (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). No Brasil, após o primeiro relato da doença em 2001 no estado do Rio de Janeiro (GÓES, A.; MONTES DE OCA, A. G.; REIS, 2001), o patógeno foi relatado em diversos outros estados brasileiros como Minas Gerais, Paraíba, Rio Grande do Sul e São Paulo (SPÓSITO et al., 2003; LOPES, E. D. ALBUQUERQUE, I. C. ARAÚJO, 2009; STUART et al., 2009; FERREIRA et al., 2016).

As cultivares de tangerinas Dancy e Ponkan são bastante suscetíveis à MMA, além dos híbridos tangelos e tangores. O patógeno atinge órgãos jovens da parte aérea da planta causando lesões de coloração marrom a escura em folhas e frutos jovens, e lesões de coloração marrom com presença de halo amarelado em folhas maduras (CARVALHO et al., 2011; AKIMITSU et al., 2014). As lesões amareladas são provocadas por toxinas hospedeiro-específicas produzidas pelo fungo e que atuam suprimindo a resposta de defesa da planta (TSUGE et al., 2013).

Alternaria alternata pertence a seção *Alternaria* descrita por Lawrence et al. (2013), no qual estão incluídas diversas outras espécies de fitopatógenos, dentre eles outros patótipos produtores de toxinas hospedeiro específicas tais como ‘pera japonesa’, ‘maçã’, ‘morango’, ‘tomate’, ‘limão rugoso’ e ‘tangerina’.

Fungicidas do grupo químico das estrobilurinas são recomendados para o manejo da MMA. Estes fungicidas atuam na respiração mitocondrial impedindo a transferência de elétrons entre o citocromo *b* e citocromo *c* se ligando ao sítio da quinona oxidase (Qo) (GRASSO et al., 2006). Porém, mutações em genes alvo são responsáveis pela resistência de fungos e oomicetos a fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI) (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). A substituição do aminoácido glicina pela alanina na posição 143 (G143A) é a principal mutação relatada ligada a resistência de fungos à fungicidas QoI e está relacionada a elevados níveis de resistência (VEGA; DEWDNEY, 2014). Tal mutação altera o sítio alvo da enzima impedindo a ligação do fungicida conferindo a resistência.

A presença da mutação associadas a resistência de fungicidas pode apresentar um custo adaptativo que se torna aparente na falta da pressão de seleção do fungicida. A adaptabilidade é definida como a sobrevivência ou sucesso reprodutivo de um alelo, indivíduo ou um grupo

(PRINGLE; TAYLOR, 2002). Caso a mutação que confere resistência resultar em um custo adaptativo a isolados resistentes em relação à isolados sensíveis, um declínio em sua frequência seria esperado caso houvesse a remoção da pressão de seleção. Em contrapartida, a falta de um custo adaptativo levaria a uma frequência estável da população resistente ou à um rápido desenvolvimento e evolução da resistência na presença da pressão de seleção do fungicida (KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2010; FAN et al., 2015).

Filogenias geradas através do gene *endopoligalacturonase* (*endoPG*) demonstram que isolados amostrados em diversos países podem ser agrupados em três linhagens filogenéticas diferentes e que são relacionadas à origem geográfica dos isolados (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). A hipótese suportada é de que pelo menos três introduções independentes do patógeno ocorreram nas diferentes regiões amostradas, e que elas possivelmente ocorreram através de material propagativo do hospedeiro advindo do mesmo local (PEEVER et al., 2002).

Até o presente estudo não há disponível qualquer relato sobre a ocorrência de resistência de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina associados a citros no Brasil. Dessa forma, este estudo tem como objetivo verificar a diversidade e caracterizar a resistência de isolados causadores da MMA em tangerinas e seus híbridos a fungicidas QoI. Além disso, objetivou-se avaliar a possível existência de custo adaptativo em relação à mutação G143A, e construir uma filogenia do gene *endoPG* com afim de verificar quais linhagens do patógeno estão introduzidas em três áreas de cultivo de citros da região sudeste.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A mancha marrom de alternaria

A mancha marrom de alternaria (MMA) é uma doença destrutiva que atinge tangerinas e seus híbridos possuindo grande importância global (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). O primeiro relato da doença foi feito na Austrália em 1903 (COBB, 1903) estando disseminada globalmente com relatos em diversos países da Europa (VICENT et al., 2000; BELLA et al., 2001), África do Sul (SWART et al., 1996), Israel (SOLEL, 1991), Estados Unidos (WHITESIDE, 1976), Argentina e Peru (PERES; AGOSTINI; TIMMER, L, 2003; MARÍN et al., 2006). O primeiro registro da doença no Brasil ocasionando severos danos à produção de tangerinas e seus híbridos foi feito por (GÓES, A.; MONTES DE OCA, A. G.; REIS, 2001) no estado do Rio de Janeiro. Posteriormente a MMA foi relatada em outros estados produtores do país como Minas Gerais, Paraíba, Rio Grande do Sul e São Paulo (SPÓSITO et al., 2003; LOPES, E. D. ALBUQUERQUE, I. C. ARAÚJO, 2009; STUART et al., 2009; FERREIRA et al., 2016).

Até meados de 2006, a MMA havia sido observada causando danos aos cultivos comerciais brasileiros de tangerina (*Citrus reticulata* Bl.) var. Dancy e tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis* (L.) Osb.) com maior severidade, e em plantios de tangerina var. Ponkan com menor severidade (SPÓSITO, 2006). Entretanto, o cenário atual revela que plantios comerciais de tangerinas ‘Ponkan’ situados no sul do estado de Minas Gerais e no estado de São Paulo estão sofrendo danos altamente severos da doença, inviabilizando a continuidade do cultivo destas variedades em certos municípios.

A doença acomete órgãos jovens da parte aérea da planta, tais como folhas, ramos, ponteiros e frutos (CARVALHO et al., 2011), causando lesões de coloração marrom a escura (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). Em folhas maduras as lesões de coloração marrom são circundadas por um halo amarelo resultado da produção de toxinas, que se expandem e podem levar a abscisão das mesmas (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003; HUANG et al., 2015).

O agente etiológico da MMA foi primeiramente identificado como *Alternaria citri* Ellis & Pierce (WHITESIDE, 1976) devido a sua similaridade morfológica ao agente etiológico de outra doença do citros, a podridão negra de alternaria (PNA). Posteriormente, o patógeno foi renomeado como *Alternaria alternata* (KOHMOTO; SCHEFFER; WHITESIDE, 1979), e SOLEL (1991) o associou a *Alternaria alternata* “patótipo” citri. Atualmente a nomenclatura

mais aceita está associada à patótipos, e o agente causal da MMA é referido como *Alternaria alternata* patótipo tangerina com base em estudos filogenéticos e produção de toxinas hospedeiro-específicas (HSTs) (PEEVER et al., 2004; TSUGE et al., 2013; HUANG et al., 2015).

Até o presente, dois diferentes patótipos de *A. alternata* estão associados a enfermidades em citros baseados em especificidades ao hospedeiro e a produção de HSTs. O patótipo tangerina, agente causal da MMA, é específico a tangerinas, tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macfad.) e tangores, sendo responsável por produzir a toxina ACT (KOHMOTO; AKIMITSU; OTANI, 1991; HUANG et al., 2015). O outro patótipo associado à cultura de citros é nomeado como “limão-rugoso” sendo específico ao limão-rugoso (*C. jambhiri* Lush.) e limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osb.), responsável por causar a mancha foliar de alternaria (MFA) e pela produção da toxina hospedeiro-específica ACR (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003; TIMMER et al., 2003).

2.2 Classificação do gênero *Alternaria*

O gênero *Alternaria* foi estabelecido por Nees em 1816 e desde então a taxonomia do gênero vem sendo amplamente discutida na literatura (LAWRENCE; ROTONDO; GANNIBAL, 2016). A identificação das espécies dentro do gênero *Alternaria* baseou-se durante muito tempo em caracteres morfológicos e, nesse período, Emory Guy Simmons contribuiu amplamente para a identificação de novas espécies e agrupamento das espécies existentes (LAWRENCE; ROTONDO; GANNIBAL, 2016). A identificação morfológica baseava-se particularmente no formato e tamanho dos conídios, entretanto, a distinção entre algumas espécies dentro do gênero poderia ser errônea dependendo das condições de cultivo. Com o avanço das classificações baseadas nas análises de DNA, caracteres tanto morfológicos quanto moleculares vêm sendo empregados para estudos de taxonomia e sistemática dentro do grupo. Os trabalhos de Lawrence et al., (2013); Woudenberg et al., (2013) e (2015) contribuíram para elucidar as delimitações das seções dentro do gênero. Atualmente 27 seções são conhecidas dentro do gênero através de taxonomia, análises filogenéticas e sistemas de pareamento sexual (*mating types*) (LAWRENCE; ROTONDO; GANNIBAL, 2016). Ademais, os marcadores moleculares ATPase de membrana plasmática e calmodulina, foram estabelecidos para a identificação de espécies dentro do gênero *Alternaria* (LAWRENCE et al., 2013).

Alternaria alternata pertence à Seção *Alternaria* (anteriormente chamada de seção *Alternata* por Woudenberg et al., (2013)), sendo constituída por cerca de 60 espécies e comumente referida na literatura como ‘*Alternaria* de esporos pequenos’ (LAWRENCE et al., 2016). Esta seção abrange diversos fitopatógenos, incluindo espécies produtoras de HSTs (TSUGE et al., 2013) do qual são conhecidos os patótipos ‘pera japonesa’, ‘maçã’, ‘morango’, ‘tomate’, ‘tangerina’ e ‘limão rugoso’.

2.3 Estudos filogeográficos

Estudos realizados com o objetivo de inferir a estrutura populacional em escala global e filogeografia do patógeno revelaram que isolados amostrados nos EUA, Colômbia, Austrália, Israel, Turquia e África do Sul podem ser agrupados em três linhagens filogenéticas distintas utilizando dados de sequenciamento do gene *endoPG* (PEEVER et al., 2002; AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003; STEWART et al., 2014). Uma linhagem agrupou somente isolados provenientes dos EUA e Colômbia, enquanto que nas outras linhagens foram encontrados isolados de diversos países. Uma quarta linhagem foi identificada por Huang et. al (2015) no qual somente isolados obtidos na China foram reportados. De acordo com Peever et al. (2004), tais linhagens filogenéticas foram introduzidas independentemente em cada região de cultivo de citros a partir de uma mesma fonte comum populacional através de material propagativo. Tal fonte populacional poderia ter sido o sudeste da Ásia, tendo em vista que essa região é o centro de origem dos citros (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003; PEEVER et al., 2004).

2.4 Resistência à fungicidas do grupo químico estrobilurinas

Para o manejo da MMA é recomendado o uso de mudas sadias e certificadas, a utilização de cultivares resistentes, evitar plantios adensados e áreas com alta umidade, eliminar o uso de irrigação por aspersão na parte aérea e aplicação de fungicidas (VEGA; DEWDNEY, 2014; FERREIRA et al., 2016). Dentre os fungicidas recomendados para o controle da MMA estão aqueles à base de cobre (*Fungicide Resistance Action Committee* [FRAC] código M1), ditiocarbamatos (FRAC código M3), dicarboximidas (FRAC código 2), triazóis (FRAC código 3) e estrobilurinas (FRAC código 11) (FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC), 2018). As moléculas estrobilurinas atuam na inibição da respiração mitocondrial, particularmente agindo sobre a quinona oxidase (Qo) (BRENT; HOLLOMON, 1998), sendo denominados fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI). Os fungicidas QoI bloqueiam a

transferência de elétrons entre o citocromo *b* e citocromo *c* se ligando ao sítio da Qo pertencente ao complexo enzimático mitocondrial *bc₁* que é um componente chave da cadeia transportadora de elétrons (BARTLETT et al., 2002; VEGA; DEWDNEY, 2014). Três moléculas do grupo químico estrobilurinas estão registradas no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), são elas as moléculas azoxistrobina, com 35 produtos registrados, piraclostrobina com 18 produtos registrados e trifloxistrobina com 7 produtos.

A resistência à fungicidas QoI está associada a mutações em sítios-alvo do gene citocromo *b* (*cyt b*) em fungos, resultando em substituições não-sinônimas de nucleotídeos e impedindo a ligação do fungicida ao sítio Qo (BARTLETT et al., 2002; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). Três substituições de aminoácidos na proteína citocromo *b* foram detectadas em fungos e oomicetos fitopatogênicos resistentes à QoI (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). A substituição do aminoácido glicina para alanina na posição 143 (G143A) tem sido relatada na maioria dos fungos resistentes a fungicidas QoI e está relacionada a altos níveis de resistência (VEGA; DEWDNEY, 2014). Outras duas mutações, da fenilalanina para leucina na posição 129 (F129L) e glicina para arginina na posição 137 (G137R), expressam moderado nível de resistência e são controladas com doses de campo em concentrações recomendadas de fungicidas QoI (GISI et al., 2002; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

A resistência à fungicidas QoI foi primeiramente relatada em *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (oídio do trigo) na Alemanha em 1998 (BARTLETT et al., 2002). Subsequentemente, relatos de resistência à fungicidas QoI foram feitos em diversos países ao redor do mundo e entre patógenos que afetam diferentes culturas (VEGA; DEWDNEY, 2014). Castroagudín et al., (2015) constatou a presença de populações de *Pyricularia graminis-tritici* (causador da brusone do trigo) resistentes à fungicidas QoI em diferentes regiões produtoras de trigo no Brasil. Isolados de *Alternaria alternata* responsáveis por doenças em pessegueiro e plantas de pistache também apresentaram resistência a fungicidas QoI (KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2010; FAN et al., 2015). Em relação a MMA, populações resistentes de *A. alternata* patótipo tangerina já foram relatadas nos EUA (MONDAL; GODOY DA SILVA; M. DEWDNEY, 2009; VEGA; DEWDNEY, 2014). Vega e Dewdney (2014) constataram a presença de aproximadamente 60% de isolados resistentes à fungicidas QoI em uma população de 817 isolados amostrados na Flórida.

Além disso, estima-se que a resistência de *A. alternata* em tangerinas ocorra também para outros grupos de fungicida sítio-específicos, dado a existência de vários relatos para esta espécie em citros e para outras culturas (FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC), 2017), além da possibilidade de ocorrência resistência múltipla (AVENOT;

MICHAILIDES, 2015). Avenot; Michailides (2015) relataram a ocorrência de *A. alternata* patogênicos a plantas de pistache com resistência múltipla às moléculas fludioxonil (fenilpirrole), ciprodinil (anilinopirimidina), boscalid (carboxamida) e piraclostrobina (estrobilurina), na Califórnia, EUA. Assim, torna-se necessária a produção de estudos sobre a resistência de *A. alternata* patótipo tangerina a fungicidas, diante da inexistência de qualquer informação (FRAC BRASIL, 2018) que possa orientar os programas de manejo integrado deste patossistema.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A aplicação de fungicidas de maneira inadequada pode exercer pressão de seleção em indivíduos, ou populações, insensíveis a molécula utilizada. Fungicidas com espectro de ação sítio-específico, tais como as estrobilurinas, são considerados de alto risco em relação à emergência de populações resistentes. Mutações pontuais no gene *citocromo b* são conhecidas e conferem resistência à fungicidas estrobilurinas. Dessa forma, monitorar a presença de isolados resistentes torna-se relevante a fim de se evitar o uso desnecessário de fungicidas que exercem pressão de seleção nesses organismos, além de auxiliar em estratégias de manejo mais corretas para contornar este problema.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIMITSU, K. et al. *Alternaria* host-selective toxins: Determinant factors of plant disease. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 2, p. 109–122, 2014.
- AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 6, p. 435–446, 2003.
- AVENOT, H. F.; MICHAILIDES, T. J. Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. **Crop Protection**, v. 78, p. 214–221, 2015.
- BARTLETT, D. W. et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002.
- BELLA, P. et al. Severe infections of *Alternaria* spp. on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 231, 2001.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. 21. ed. Bruxelas, Bélgica: FRAC Monograph, 1998.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, n. 4, p. 173–178, 2011.
- CASTROAGUDÍN, V. L. et al. Resistance to QoI Fungicides Is Widespread in Brazilian Populations of the Wheat Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, v. 105, n. 3, p. 284–94, 2015.
- COBB, N. A. Letters on the diseases of plants - *Alternaria* of the citrus tribe. **Agricultural Gazette NSW**, v. 14, p. 955–986, 1903.
- FAN, Z. et al. Fitness and Competitive Ability of *Alternaria alternata* Field Isolates with Resistance to SDHI, QoI, and MBC Fungicides. **Plant Disease**, v. 99, n. 12, p. 1744–1750, 2015.
- FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. et al. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2008.
- FERREIRA, E. A. et al. Mancha-marrom-de-Alternária em tangerineiras e seus híbridos: identificação e manejo. **EPAMIG. Circular Técnica**, n. 244, p. 1–7, 2016.
- FRAC BRASIL. **Fungicide Resistance Action Committee, Brazil**.
- FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). List of Plant Pathogenic Organisms Resistant to Disease Control Agents. n. May, p. 1–75, 2017.
- FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). FRAC Code List © * 2018: Fungicides sorted by mode of action. p. 1–10, 2018.

- GISI, U. et al. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 859–867, 2002.
- GÓES, A.; MONTES DE OCA, A. G.; REIS, R. F. . Ocorrência de la mancha de *Alternaria* en mandarina Dancy en el estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 386, 2001.
- GRASSO, V. et al. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 62, n. 6, p. 465–472, jun. 2006.
- HUANG, F. et al. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. **Fungal Biology**, v. 119, n. 5, p. 320–330, 2015.
- KARAOGLANIDIS, G. S.; LUO, Y.; MICHAILEDIS, T. J. Competitive Ability and Fitness of *Alternaria alternata* Isolates Resistant to QoI Fungicides. **Plant Disease**, v. 95, n. 2, p. 178–182, 2010.
- KOHMOTO, K.; AKIMITSU, K.; OTANI, H. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. **Phytopathology**, v. 81, p. 719–722, 1991.
- KOHMOTO, K.; SCHEFFER, R. P.; WHITESIDE, J. O. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. **Phytopathology**, v. 69, p. 667–671, 1979.
- LAWRENCE, D. P. et al. The sections of *Alternaria* : formalizing species-group concepts. **Mycologia**, v. 105, n. 3, p. 530–546, 2013.
- LAWRENCE, D. P.; ROTONDO, F.; GANNIBAL, P. B. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. **Mycological Progress**, v. 15, n. 1, 2016.
- LOPES, E. D. ALBUQUERQUE, I. C. ARAÚJO, E. Mancha-marrom-de alternária: uma grave doença nos pomares de tangerina da Paraíba. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 3, p. 23–27, 2009.
- MARÍN, J. E. et al. First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. **Phytopathology**, v. 90, n. 5, p. 686, 2006.
- MONDAL, S. N.; GODOY DA SILVA, A.; M. DEWDNEY, M. Resistance to strobilurin fungicides in a population of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* brown spot of citrus. (Abstr.). **Phytopathology**, v. 99, p. S88, 2009.
- PEEVER, T. L. et al. Worldwide Phylogeography of the Citrus Brown Spot Pathogen, *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v. 92, n. 7, p. 794–802, 2002.
- PEEVER, T. L. et al. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, v. 96, n. 1, p. 119–134, 2004.
- PERES, N. A. R.; AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, v. 87, p. 750, 2003.

- PRINGLE, A.; TAYLOR, J. W. The fitness of filamentous fungi. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 474–481, 2002.
- SOLEL, Z. *Alternaria* brown spot on *Minneola* tangelos in Israel. **Plant Pathology**, v. 40, p. 145–147, 1991.
- SPÓSITO, M. B. et al. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 231, 2003.
- SPÓSITO, M. B. Mancha-Marrom-de-Alternária. In: ZAMBOLIM, L.; BASSANEZI, R. B. (Eds.). **Doenças Quarentenárias dos Citros**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 109–116.
- STEWART, J. E. et al. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: Incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2014.
- STUART, R. M. et al. *Alternaria* Brown Spot. **Laranja**, v. 30, n. 1–2, p. 29–44, 2009.
- SWART, S. H. et al. Brown spot of *Minneola* tangelo and efficacy of fungicidal sprays programmes for disease control in South Africa. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v. 1, p. 379–384, 1996.
- TIMMER, L. W. et al. *Alternaria* diseases of citrus - Novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 42, n. 2, p. 99–112, 2003.
- TSUGE, T. et al. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 44–66, 2013.
- VEGA, B.; DEWDNEY, M. M. Distribution of QoI Resistance in Populations of Tangerine-Infecting *Alternaria alternata* in Florida. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 67–76, 2014.
- VICENT, A. et al. First report of *Alternaria* Brown Spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, v. 84, p. 1044, 2000.
- WHITESIDE, J. O. A newly recorded *Alternaria* induced Brown Spot disease on Dancy tangerines in Florida. **Plant Disease Reporter**, v. 60, p. 326–329, 1976.
- WOUDEBERG, J. H. C. et al. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v. 75, n. May, p. 171–212, 2013.
- WOUDEBERG, J. H. C. et al. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, *formae speciales* or pathotypes? **Studies in Mycology**, v. 82, p. 1–21, 2015.

SEGUNDA PARTE

**DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE
ISOLADOS DE *Alternaria alternata* PATÓTIPO TANGERINA A
ESTROBILURINAS**

RESUMO

Alternaria alternata patótipo tangerina é o agente causal da mancha marrom de alternaria, doença que atinge pomares de tangerinas e seus híbridos causando severos danos à produção. O primeiro relato do patógeno no Brasil foi em 2001 no Rio de Janeiro, com posteriores ocorrências em diversos estados produtores do país. Dezesete isolados foram identificados como *A. alternata* patótipo tangerina por meio de análises morfológicas, filogenéticas e testes de patogenicidade. Análise filogenética utilizando sequências do gene *endoPG* permitiram observar o agrupamento dos isolados em três linhagens anteriormente descritas para isolados distribuídos globalmente. Estes possuem origem em diferentes localidades da região Sudeste, e foram avaliados em relação a sua sensibilidade aos fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina. A maioria dos isolados foram insensíveis à azoxistrobina e a EC_{50} calculada foi superior a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, a EC_{50} para os isolados na presença de piraclostrobina variou entre 0,7831 a $45,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dois isolados foram identificados possuindo a mutação G143A que confere resistência a fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI). Os isolados com genótipos de resistência apresentaram menor eficiência na germinação de conídios e esporulação *in vitro* em relação a isolados sensíveis, indicando que pode haver um custo adaptativo para a presença da mutação G143A. Imagens obtidas através de microscopia laser confocal mostraram que conídios do isolado QoI-sensível PE15 apresentou alta produção de espécies reativas de oxigênio e morte celular devido a exposição ao fungicida piraclostrobina a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ao contrário, conídios do isolado QoI-resistente PE9 não apresentou morte celular nem evidência de acúmulo de espécies reativas de oxigênio quando exposto ao mesmo fungicida. A ocorrência de *A. alternata* com genótipo resistente sugere que as aplicações de estrobilurinas podem estar selecionando indivíduos resistentes nas áreas de cultivo amostradas.

Palavras-chave: Fungicidas QoI. Resistência. Mutação. Mancha marrom de alternaria. Custo adaptativo.

1 INTRODUÇÃO

As tangerinas são o segundo grupo de maior importância dentro do gênero *Citrus* e o Brasil é o terceiro maior produtor mundial desta fruta, no qual o estado de Minas Gerais ocupa a terceira posição dentro do cenário nacional contribuindo com cerca de 15% do volume da produção (FERREIRA et al., 2016).

A mancha marrom de alternaria (MMA) causada pelo fungo *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl. patótipo tangerina, é considerada uma importante doença que atinge pomares de cultivares de tangerina e seus híbridos em regiões de cultivo subtropicais e semiáridas (TIMMER et al., 2003). O fungo produz a toxina hospedeiro-específica ACT, importante na especificidade ao hospedeiro e virulência (TSUGE et al., 2013). O primeiro registro da doença no Brasil foi realizado em 2001 (GÓES, A.; MONTES DE OCA, A. G.; REIS, 2001), com posteriores relatos em outros estados do país causando prejuízos à produção de tangerinas e seus híbridos (SPÓSITO et al., 2003; LOPES, E. D. ALBUQUERQUE, I. C. ARAÚJO, 2009; STUART et al., 2009; FERREIRA et al., 2016).

Dentre os fungicidas recomendados para o controle da MMA estão os do grupo estrobilurinas que atuam na inibição da respiração mitocondrial (GISI et al., 2002). As moléculas deste grupo químico agem bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo *b* e citocromo *c* se ligando ao sítio Qo (quinona oxidase), sendo conhecidos como fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI) (BARTLETT et al., 2002b). Mutações nucleotídicas não-sinônimas no gene citocromo *b* de fungos e oomicetos são responsáveis pela resistência destes à fungicidas QoI. (GRASSO et al., 2006). A mutação caracterizada pela substituição do aminoácido glicina para alanina na posição 143 (G143A) têm sido amplamente relatada na literatura em fungos resistentes à fungicidas QoI e é associada a elevados níveis de resistência (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

Análises filogenéticas do fungo *A. alternata* associados à MMA utilizando o gene *endopoligalacturonase (endoPG)* revelaram que isolados amostrados em diferentes países agruparam-se em três linhagens filogenéticas distintas, e que foram correlacionadas à sua origem geográfica (PEEVER et al., 2004; HUANG et al., 2015). De acordo com essas linhagens, especula-se que pelo menos três independentes introduções do patógeno ocorreram em diferentes partes do mundo e, possivelmente, essas introduções tenham sido feitas através de material propagativo do hospedeiro (PEEVER et al., 2002).

Até o presente estudo não relato sobre a ocorrência de populações de *Alternaria alternata* patótipo tangerina resistentes a fungicidas. Dessa maneira, este estudo tem como

objetivo caracterizar a resistência de isolados causadores da mancha marrom de alternaria em tangerinas e seus híbridos à fungicidas QoI.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Dezessete isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina foram obtidos de folhas infectadas de cultivares de tangerina Ponkan e Dancy, e dos híbridos tangelo BRS Piemonte (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macf.) e tangor Murcott (*C. sinensis* L. Osbeck x *C. reticulata* L. Blanco). Oito isolados foram amostrados no município de Perdões, Minas Gerais, e nove isolados foram provenientes dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (Tabela 1). Os isolamentos e obtenção das culturas monospóricas dos isolados do município de Perdões MG foram realizados como descrito a seguir. Folhas infectadas foram lavadas em água corrente, secas em papel absorvente, e fragmentos com cerca de 4 mm² foram retirados para desinfestação superficial por 30 s em álcool etílico 70% e 1 min em hipoclorito de sódio 2%. Em seguida, os fragmentos foram lavados em água destilada esterilizada e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro por 5 d em meio BDA (Himedia) acrescido de cloranfenicol. Após o crescimento das colônias, discos de micélio foram retirados e cultivados em meio V8-ágar (100 mL de suco v8; 15 g de CaCO₃; 20 g de ágar; 900 mL de água destilada) a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz ultravioleta e 12 h de escuro por 14 d para induzir a produção de conídios. Conídios foram coletados em água destilada esterilizada, espalhados em meio ágar-água e incubados a 25 °C por 8 h. Um conídio germinado foi coletado e transferido para placa de Petri contendo meio BDA e incubado a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro por 5 d. Os isolados representantes dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo foram cedidos pelo Professor Antônio de Góes da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) Campus Jaboticabal.

2.2 Identificação dos isolados

A macro morfologia das colônias foi avaliada após sete dias de crescimento em meio de cultivo BDA a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro por cinco dias para observação da coloração e textura do micélio aéreo. Para avaliar a micro morfologia, os isolados foram cultivados em meio SNA (LESLIE; SUMMERELL, 2006) com pequenos pedaços de papel filtro esterilizados em sua superfície. As culturas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 24 h de escuro por quatorze dias.

Tabela 1 Isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina utilizados nesse estudo.

Isolado	Hospedeiro	Localidade	Linhagem ^a	Número de acesso <i>GenBank</i>	Referência
PE1	Tangerina Ponkan	Perdões, MG	2	-	Este estudo
PE2	Tangerina Ponkan	Perdões, MG	2	-	Este estudo
PE4	Tangerina Ponkan	Perdões, MG	2	-	Este estudo
PE9	Tangelo	Perdões, MG	1	-	Este estudo
PE13	Tangerina Ponkan	Perdões, MG	2	-	Este estudo
PE14	Tangerina Ponkan	Perdões, MG	2	-	Este estudo
PE15	Tangerina Ponkan	Perdões, MG	2	-	Este estudo
PE16	Tangerina Ponkan	Perdões, MG	2	-	Este estudo
5D	Tangerina Dancy	Itaboraí, RJ	3	-	Este estudo
5FR	Tangerina Dancy	Itaboraí, RJ	3	-	Este estudo
6FR	Tangerina Dancy	Silva Jardim, RJ	3	-	Este estudo
8M	Tangor Murcott	Araruama, RJ	3	-	Este estudo
13FR	Tangerina Dancy	Araruama, RJ	3	-	Este estudo
15M	Tangor Murcott	Santa Adélia, SP	3	-	Este estudo
15HM	Tangor Murcott	Santa Adélia, SP	3	-	Este estudo
33M	Mexerica	Monte Alto, SP	1	-	Este estudo
SM	Tangor Murcott	Sorocaba, SP	1	-	Este estudo
EGS 44-159	Tangelo Minneola	Turquia	3	AY295022	(PEEVER et al., 2004)
EGS 44-160	Tangelo Minneola	Turquia	3	AY295023	(PEEVER et al., 2004)
H1	Tangerina Ponkan	China	3	KF863979	(HUANG et al., 2015)
PR320	Tangerina Dancy	Flórida, EUA	1	AY295027	(PEEVER et al., 2004)
C24	Tangerina	China	1	KF863966	(HUANG et al., 2015)
SH-MIL-4S	Tangelo Minneola	Flórida, EUA	2	AY295032	(PEEVER et al., 2004)
EV-MIL-2S	Tangelo Minneola	Flórida, EUA	2	AY295031	(PEEVER et al., 2004)
EGS 30-033	<i>Nicotiana tabacum</i>	Carolina do Norte, EUA	2	AY629232	(PEEVER et al., 2004)
EGS 37-1321	Pera asiática	Japão	4	AY629231	(PEEVER et al., 2005)
0-187	Morango	Japão	4	AY629222	(PEEVER et al., 2005)
D10	Tangor	China	4	KF863977	(HUANG et al., 2015)

Legenda: a = linhagens filogenéticas descritas por HUANG et al., (2015) e PEEVER et al., (2004).

Fonte: Do autor (2018).

Fragmentos de meio de cultura com papel contendo esporulação do fungo foram posicionados em lamínulas para observação em microscópio de campo claro invertido Zeiss Axio Observer Z1 com Contraste Diferencial de Interferência (DIC) do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA. As imagens obtidas foram editadas e pranchas foram preparadas utilizando Corel Draw X7.

2.3 Testes de patogenicidade

A patogenicidade dos isolados foi avaliada através da inoculação em folhas destacadas de tangelo cv. BRS Piemonte sensível à MMA. Discos miceliais de 5 mm foram retirados de culturas com sete dias de crescimento em meio BDA a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, e inoculados na face abaxial de folhas destacadas de tangelo cv BRS Piemonte. Folhas destacadas de limão-cravo e laranja também foram inoculadas e utilizadas como controle negativo. Após três dias da inoculação as folhas foram avaliadas a fim de se verificar a reprodução de sintomas. Isolados de *A. alternata* que causaram sintomas somente em folhas de tangelo foram considerados como pertencentes ao patótipo tangerina.

2.4 Avaliação *in vitro* da sensibilidade dos isolados a fungicidas QoI

Testes *in vitro* para a avaliação da sensibilidade dos isolados à fungicidas QoI e determinação da EC₅₀ (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento micelial) foram realizados. Os isolados foram cultivados em meio BDA (Himedia) contendo cloranfenicol e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro por sete dias para a produção de inóculo. Os fungicidas Amistar WG® (azoxistrobina a 500 g kg⁻¹; Syngenta) e Comet® (piraclostrobina a 250 g l⁻¹; Basf) foram diluídos em água destilada para obter-se uma solução estoque de 1 g L⁻¹. Os meios de cultivo utilizados para a montagem do ensaio *in vitro* (BDA) foram acrescidos de cloranfenicol, estreptomicina e ácido salicilhidroxâmico (SHAM) a 0,05 mM. SHAM foi adicionado ao meio de cultivo para suprimir a rota alternativa da respiração do fungo. As diferentes doses utilizadas para a determinação da EC₅₀ foram de 0 (controle); 0,1; 5; 10; 100 e 200 µg mL⁻¹ para cada fungicida. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados dos inóculos com 7 d de crescimento e transferidos para placas de BDA com as doses de cada fungicida citadas anteriormente. Três isolados foram repicados em cada placa, replicadas quatro vezes cada. Placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro por 5 d. O diâmetro da colônia foi medido ao final desse período subtraindo o

tamanho do disco de micélio original (5 mm) para cada isolado. O crescimento micelial foi convertido em crescimento relativo (CR), para cada isolado, comparando o tamanho da colônia do controle com o tamanho da colônia na presença de fungicida através da seguinte fórmula: $100 \times (\text{média do diâmetro da colônia da placa sem fungicida} / \text{média do diâmetro da colônia da placa com fungicida})$. O CR foi utilizado para as análises estatísticas e determinação da EC_{50} . O experimento foi conduzido duas vezes em delineamento de blocos casualizados. A EC_{50} foi calculada através de regressões não-lineares do CR pelo log das doses de cada fungicida usando o software GraphPad Prism v.7.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Análise de variância (ANAVA) e teste de médias para a EC_{50} dos isolados utilizando Scott-Knott foram realizados com o software SISVAR v. 5.6 (FERREIRA, 2011).

2.5 Avaliação do custo adaptativo da mutação G143A

Quatro isolados compreendendo dois QoI-resistentes e dois QoI-sensíveis de acordo com a determinação da EC_{50} e genótipo foram selecionados para avaliar o custo adaptativo da mutação G143A. Os parâmetros avaliados foram: crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios *in vitro*. A avaliação dos dados e testes para comparar os valores médios de cada isolado utilizando Scott-Knott foi realizada com o software SISVAR v.5.6

2.5.1 Crescimento micelial

Discos miceliais de cada isolado foram transferidos para meio BDA e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro por 5 d. Após incubação o diâmetro das colônias foi medido com o auxílio de um paquímetro digital. O teste compreendeu quatro replicatas por isolado sendo executado uma vez.

2.5.2 Germinação *in vitro*

Para a produção de conídios os isolados foram cultivados em meio de cultivo SNA e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 24 h de escuro por 14 dias. Após a produção dos conídios, 5 mL de água destilada estéril foi adicionado a cada placa e os conídios foram desalojados da placa através do uso de uma alça de Drigalski. A solução obtida foi filtrada em uma dupla camada de gaze estéril e acondicionada em tubos Falcon de 15 mL. Duas placas por

isolado foram utilizadas. A concentração de conídios foi medida através de câmara de Neubauer e ajustada a um valor de $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. Uma mistura de 100 μL da suspensão de conídios e 100 μL de meio de cultivo líquido batata-dextrose (Sigma-Aldrich) contendo o fungicida piraclostrobina nas concentrações de 0 (controle); 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados em uma placa de 24 poços estéril. A placa foi incubada a 25 °C no escuro e alíquotas de 50 μL foram retiradas nos tempos 6 e 12 h. Conídios que possuíam o tubo germinativo com tamanho igual ou superior ao seu próprio tamanho foram considerados germinados. Um total de 100 conídios por concentração foi avaliado e cada tratamento possuiu três repetições. A germinação foi avaliada em microscópio de luz.

2.5.3 Esporulação *in vitro*

Para avaliar a esporulação *in vitro* dos isolados, suspensões conidiais foram obtidas da mesma forma como descrito acima. O número de conídios produzidos foi estimado em câmara de Neubauer e para cada isolado cinco placas foram preparadas. O experimento foi repetido uma vez.

2.6 Avaliação da germinação conidial *in vivo* utilizando microscopia eletrônica de varredura

A avaliação da germinação *in vivo* de conídios de *A. alternata* patótipo tangerina em folhas destacadas do híbrido tangelo foi realizada. A observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi feita com suspensões conidiais preparadas como descrito acima. As concentrações de 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina foram utilizadas. Os isolados analisados no ensaio compreenderam um QoI-resistente e um QoI-sensível de acordo com a detecção da mutação G143A. Microgotas de 20 μL das misturas entre suspensão conidial e dose do fungicida na proporção de 1:1 foram aplicadas em diversos pontos na face abaxial das folhas. Ao total oito folhas destacadas foram inoculadas para cada tratamento e o experimento foi realizado uma vez. Fragmentos de 5 mm foram retirados das folhas após 6 e 18 h posterior à inoculação com o auxílio de um furador. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (pH 7,2) e desidratadas em série de acetona (BOZZOLA; RUSSELL, 1999). A secagem dos espécimes foi realizada em aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030 Balzers) seguido de recobrimento com ouro em evaporador Sputter Coater (Bal-tec SCD 050 Balzers). A aquisição das imagens foi feita em MEV Zeiss LEO EVO 40 XVP no Laboratório de Microscopia

Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, utilizando o software Smart Sem, a 20 Kv e distância de trabalho de 6 mm. As imagens obtidas foram editadas e pranchas foram preparadas utilizando Corel Draw X7.

2.7 Avaliação das espécies reativas de oxigênio e morte celular

As análises de fluorescência foram realizadas em microscópio Laser Confocal LSM780 Zeiss Observer Z.1 e software Zen 2010 no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutura da Universidade Federal de Lavras. Suspensões de conídios para os isolados PE9 e PE15 foram obtidas da forma como descrito acima. Para cada amostra, blocos de ágar com conídios depositados foram tratados com 10uL do fluorocromo 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Sigma (R)) 10 uM em dimetil sulfóxido (DMSO) por 5 min no escuro para evidenciar espécies reativas de oxigênio nas células fúngicas (BENELOUJAEPAJRI et al., 2013; ORTEGA-VILLASANTE et al., 2016). Os blocos de ágar foram posicionados sobre lamínula em microscópio invertido, e foi utilizada objetiva EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27. As observações foram realizadas utilizando o detector ChS1, Beam splitter MBS 488 nm, pinhole 34 µm, laser Argon 488 nm 5%, Master Gain 500, Digital Offset 0.0, Digital Gain 1.0, e Filtro de Emissão para 500 a 550 nm. Para imagens de campo claro foram adquiridas utilizando o detector TPMT ChD, com Master Gain 270, Digital Offset 0.0, e Digital Gain 1.0.

Para estudos de morte celular das células fúngicas foi utilizado Iodeto de Propídio (Sigma (R)) (FIRSTENCEL; BUTT; CARRUTHERS, 1990). Aos blocos de ágar com conídios aplicou-se 10 uL de Iodeto de Propídio 1 µg mL⁻¹ em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,2 com incubação de 5 m no escuro. Para visualização de células mortas foi usado o detector Ch2, Beam splitter MBS 543 nm, pinhole 42 µm, laser HeNe 543 nm 20%, Master Gain 530, Digital Offset 0.0, Digital Gain 1.0, e Filtro de Emissão para 625 a 665 nm. Imagens de campo claro foram adquiridas utilizando o detector TPMT ChD, com Master Gain 230, Digital Offset 23, e Digital Gain 1.0. As imagens obtidas foram editadas e pranchas foram preparadas utilizando Corel Draw X7.

2.8 Extração de DNA, amplificação dos genes alvo e sequenciamento.

O DNA de cada isolado foi extraído do micélio crescido em placas de BDA incubadas por 7 d a 25 °C com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. O método utilizado para extração do DNA dos isolados foi o CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980). Sequências

parciais do gene *EndoPG* foram utilizados para a análise filogenética utilizando os primers EPG-specific e EPG-3b (PEEVER et al., 2005). Para a identificação da mutação G143A do gene citocromo *b* foram utilizados os primers *cytb2f* e *DTRcytb2-INTr* (VEGA; DEWDNEY, 2014). O volume final da reação foi de 20 μ L, contendo 10 μ L de GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega); 0,3 μ L de cada primer (forward e reverse); 8,4 μ L de água livre de nucleases e 1 μ L de DNA. As condições de amplificação para os genes *endoPG* e citocromo *b* podem ser encontradas em (PEEVER et al., 2004; VEGA; DEWDNEY, 2014), respectivamente. Os produtos de PCR foram visualizados sob luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose 0,8% com Tris-acetato-EDTA 1X e corado com 1 μ L de Sybr DNA gel stain (Sigma-Aldrich). Produtos de PCR foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante e visualizados novamente em gel de agarose 0,8% para a confirmação da presença de DNA após purificação. O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) e as sequências obtidas foram primariamente editadas utilizando o software Geneious v11.1.3 (KEARSE et al., 2012).

2.9 Análise filogenética e detecção da mutação G143A

Para a detecção da mutação G143A as sequências foram alinhadas utilizando o software Geneious v11.1.3 e o sítio contendo a mutação foi identificada visualmente para cada sequência dentro do alinhamento. Foi considerado como genótipo resistente os que apresentavam a mutação G143A, ou seja, a substituição do nucleotídeo glicina (G) pelo nucleotídeo citosina (C). Sequências dos isolados *A. alternata* EV-3-1S (VEGA et al., 2012) e *A. alternata* MSAH5 (ROSENZWEIG et al., 2017) foram utilizadas como referências, sendo o primeiro possuindo genótipo sensível e o segundo genótipo resistente (números de acesso no *Genbank* JQ446323 e MF001503.1).

As sequências geradas para o gene *endoPG* foram alinhadas utilizando a ferramenta MUSCLE implementada no software MEGA v.7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). As filogenias foram enraizadas com o isolado *Alternaria eichorniae* ATCC 22255 (*Genbank* EU314714). Onze isolados foram utilizados como referência com a finalidade de verificar o posicionamento dos isolados testados em relação às quatro linhagens filogenéticas já estabelecidas por (HUANG et al., 2015; PEEVER et al., 2002) (Tabela 1). Análises de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) foram realizadas utilizando o software MEGA v.7. Na análise de MP, gaps foram tratados como deleção parcial e o método heurístico

de busca selecionado foi o TBR branching com 1000 adições de sequências aleatórias e o número máximo de árvores retidas foi de 100. Para a análise filogenética de MV, o modelo evolucionário empregado para a substituição de bases foi escolhido através do software MEGA v.7 utilizando o Akaike Information Criterion (AIC) como parâmetro de escolha. Em ambas as análises o teste de bootstrap foi realizado e incluiu 1000 pseudo replicatas para determinar o suporte dos clados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

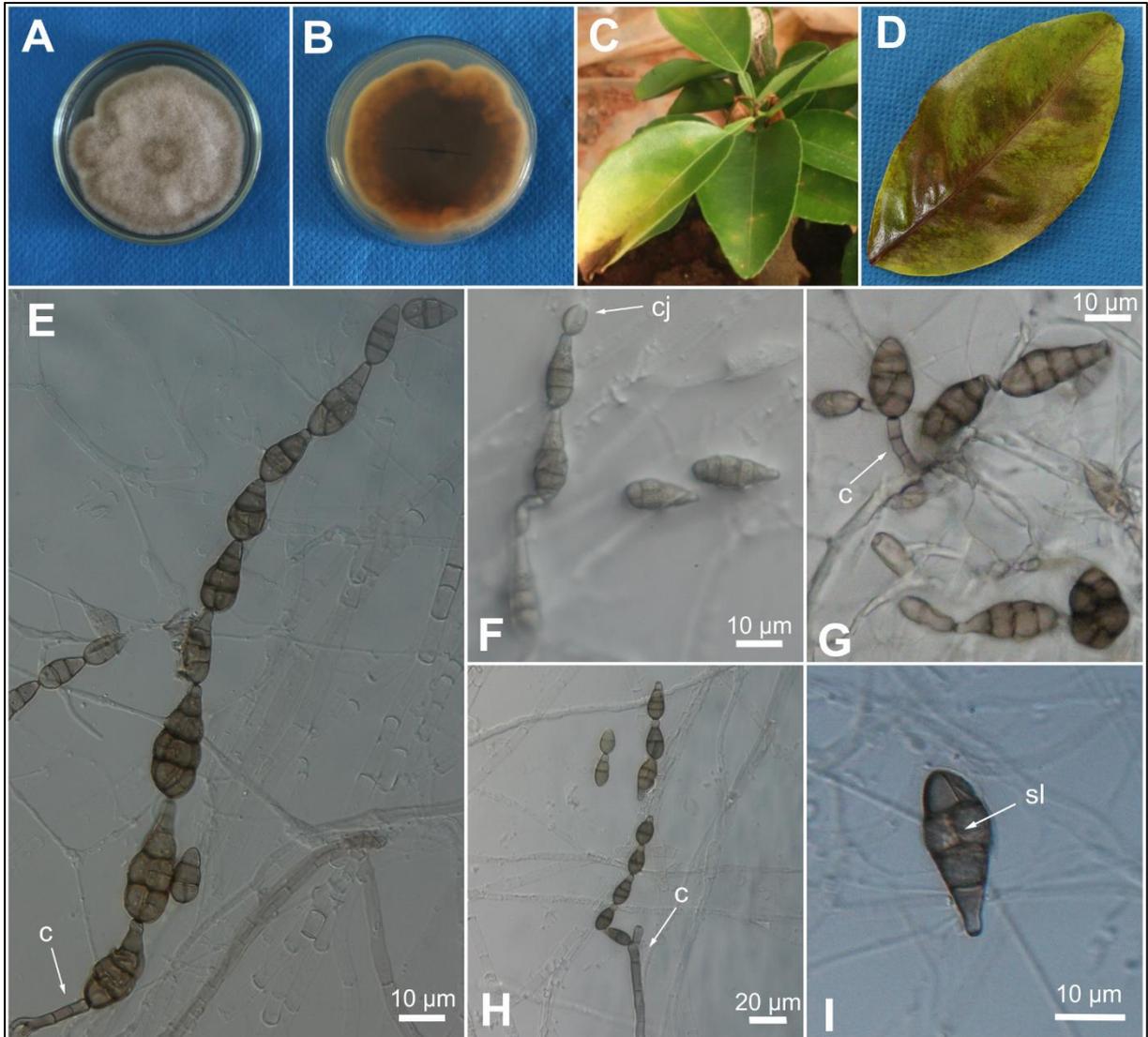
3.1 Identificação dos isolados

Os isolados de *Alternaria alternata* obtidos tiveram sua identidade confirmada através da morfologia das colônias em meio BDA (Figuras 1 A e B), visualização de conídios e conidióforos produzidos em meio SNA (Figuras 1 E-I) e estudo filogenético utilizando sequências do gene *endoPG* de isolados de referência de *A. alternata* (Figura 2).

Colônias cultivadas em meio de cultivo BDA apresentaram micélio aéreo abundante, de coloração branca, e marrom-claro a marrom-escuro (Figura 1A), com reverso marrom-escuro com bordas marrom-claro (Figura 1B). Em meio SNA foram observados conidióforos eretos (Figura 1E) ou ligeiramente curvos (Figura 1G), com produção de um conídio (Figura 1G) ou conídios desenvolvidos em cadeias (Figuras 1E e 1H). Conídios formados em cadeias longas ou moderadamente longas. Havia conídios jovens fragmosporos, pequenos e ovoides (Figura 1F) a elipsoides, e conídios maduros dictiosporos, elipsoides longos, moderados ou pequenos em tamanho, septados, com ou sem septos longitudinais (Figuras 1E-I). Conídios ligeiramente constrictos próximos ao septo. O corpo do conídio pode se estreitar gradualmente em um conidióforo secundário. Conidióforos secundários formados apicalmente ou lateralmente (Figura 1H). Estas são características comuns à seção *Alternaria* (LAWRENCE et al., 2013).

A patogenicidade dos isolados foi confirmada através da inoculação em folhas destacadas de tangelo cv. BRS Piemonte, limão-cravo e laranja. Folhas destacadas de tangelo apresentaram sintomas 3 d após a inoculação (Figura 3D) enquanto que folhas de limão-cravo e laranja não apresentaram a reprodução de sintomas após a inoculação. Dessa forma, a especificidade de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina foi confirmada.

Figura 1 Caracterização morfológica dos isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina.



Legenda: Fotografias de: colônia em meio de cultivo BDA a 25 °C com fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro por 5 d (A-B); sintoma natural de mancha marrom de alternaria em folíolos de tangerina (C); sintoma em folha de tangelo cv. BRS Piemonte destacada após inoculação (D); Fotomicrografias mostrando a morfologia dos conídios de *A. alternata* cultivados em meio SNA a 25 °C com fotoperíodo de 24 h de escuro por 14 d (E-I). Letras minúsculas nas imagens representam: c, conidióforos; cj, conídios jovens; sl, septo longitudinal.

Fonte: Do autor (2018).

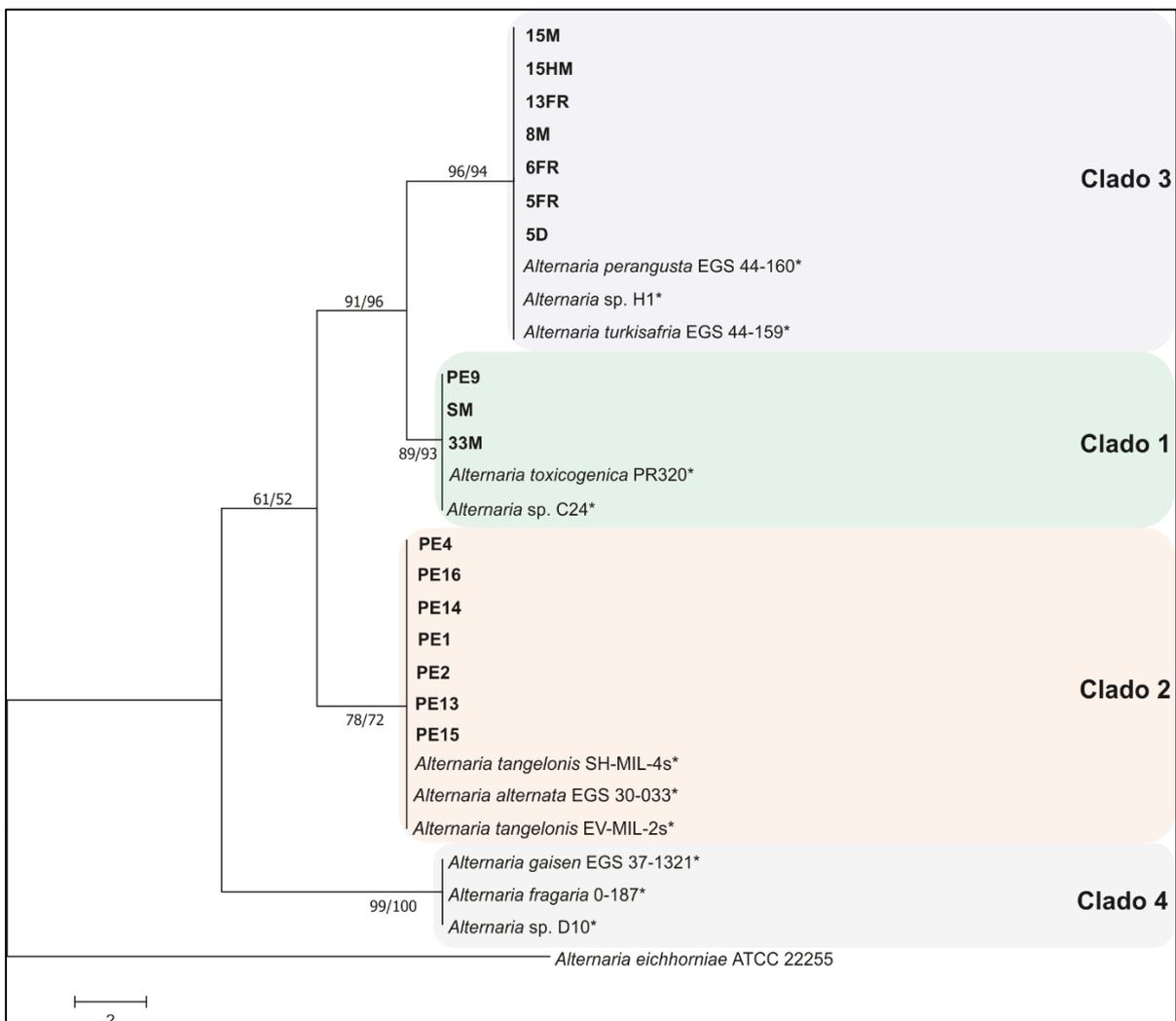
3.1.1 Análise filogenética do gene *endoPG*

O alinhamento das sequências *endoPG* consistiu de 425 caracteres, dos quais 386 sítios foram constantes, 39 variáveis e 17 parcimônia-informativos. O modelo evolucionário selecionado para os dados foi o de Kimura-2-parameter. Os isolados de *A. alternata* patótipo

tangerina foram agrupados com sequências de isolados referência de *A. alternata* para auxiliar na confirmação da identidade dos isolados (Figura 2).

As análises filogenéticas geradas utilizando máxima-parcimônia (MP) e máxima-verossimilhança (MV) apresentaram topologias semelhantes e com a presença de quatro principais clados (Figura 2).

Figura 2 Filogenia gene *endoPG* estimada utilizando máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV).



Legenda: Suporte dos ramos é dado em valores de bootstrap (MP >50%/MV >50%). Isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina analisados neste estudo estão indicados em negrito. Clados 1,2,3 e 4 e isolados identificados em estudos anteriores (PEEVER et al., 2004; HUANG et al., 2015) estão indicados por caixas coloridas e asterisco (*), respectivamente. O isolado *Alternaria eichhorniae* ATCC 22255 foi usado como outgroup na análise.

Fonte: Do autor (2018).

Os isolados do estado do Rio de Janeiro (5D, 5FR, 6FR, 8M e 13FR) e do estado de São Paulo (15M e 15HM) foram relacionados com os isolados referência das morfoespécies *A.*

perangusta EGS 44-160 e *A. turkisafrica* EGS 44-159 amostradas na Turquia, além do isolado referência *Alternaria* sp. H1 coletado na China (Figura 2) (PEEVER et al., 2002; HUANG et al., 2015). As morfoespécies *A. perangusta* e *A. turkisafrica* foram sinonimizadas como *A. alternata* por Woudenberg et al. (2015). Essa linhagem foi identificada como pertencente ao clado 3 no estudo de Peever et al., (2004) sobre a filogeografia de *Alternaria alternata* com isolados representativos de diferentes regiões produtoras de citros no mundo. Três isolados (PE9, SM e 33M) agruparam-se com a morfoespécie *A. toxicogenica* PR320 identificada na Flórida, EUA, e *Alternaria* sp. C24 amostrada na China e pertencentes ao clado 1 em estudos anteriores (Figura 2) (PEEVER et al., 2004; HUANG et al., 2015). Os isolados PE1, PE2, PE4, PE13, PE14, PE15 e PE16 provenientes de Perdões foram agrupados no clado 2 junto às morfoespécies *Alternaria tangelonis* SH-MIL-4S e EV-MIL-2s e *Alternaria longipes* EGS 30-033, provenientes da Flórida e Carolina do Norte, EUA (Figura 2) (PEEVER et al., 2004). Neste clado somente isolados provenientes das Américas do Norte e do Sul foram relatados até o momento. Em contrapartida, os cladogramas 1 e 3 possuem uma maior abrangência mundial com isolados obtidos de diferentes países. Nenhum dos isolados estudados agruparam no clado 4 descrito por HUANG et al., (2015), que inclui o isolado *Alternaria* sp. D10 relacionado à mancha-marrom de *Alternaria* em citros na China, além dos isolados *Alternaria gaisen* (37-1321) e *Alternaria fragaria* (O-187) responsáveis por doenças na pera japonesa e morango, respectivamente (PEEVER et al., 2005; HUANG et al., 2015).

Através da filogenia utilizando o gene *endoPG* foi possível verificar que os isolados apresentaram uma tendência de agrupamento de acordo com a sua origem geográfica. Os isolados obtidos na cidade de Perdões foram agrupados, predominantemente, no clado 2. Nenhum dos isolados amostrados em Perdões foi agrupado no clado 3. Os isolados provenientes do estado do Rio de Janeiro e São Paulo agruparam-se majoritariamente no clado 3, no qual estão os cinco isolados pertencentes ao Rio de Janeiro e dois isolados de São Paulo. Somente os isolados SM e 33M, ambos amostrados em São Paulo, e o isolado PE9 de Perdões se agruparam no clado 1.

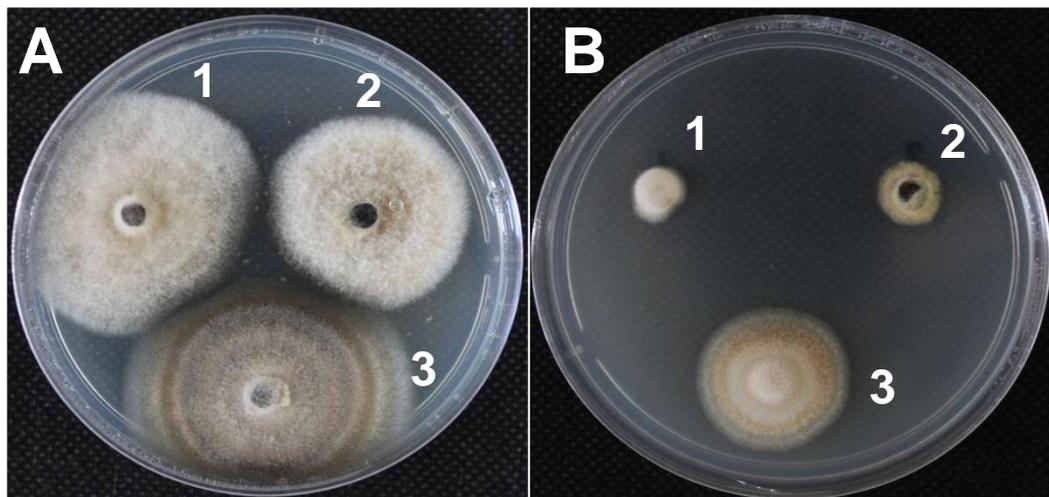
Os isolados amostrados neste trabalho se agruparam nas três linhagens filogenéticas descritas por Peever et al. (2004). O mesmo foi observado por Stewart et al. (2014) onde entre isolados amostrados no Brasil foram identificadas três linhagens filogenéticas. A distribuição dos isolados desse trabalho nos três cladogramas filogenéticos anteriormente descritos pode sugerir que as linhagens do patógeno causador da MMA poderiam ter sido introduzidas de forma independente nas áreas de cultivo de citros através de material propagativo advindo de outros locais. Entretanto, cabe-se salientar a necessidade de uma amostragem mais numerosa e

representativa das regiões produtoras da cultura de citros no país com a finalidade de averiguar a distribuição dessas linhagens filogenéticas nas diferentes regiões citricultoras do país.

3.2 Caracterização *in vitro* da sensibilidade dos isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina à piraclostrobina

A dose discriminatória observada para classificar os isolados com fenótipo resistente à piraclostrobina foi de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3). Não foi possível estabelecer uma dose discriminatória para azoxistrobina em nenhuma delas houve inibição total do crescimento micelial. Os isolados que tiveram o crescimento micelial inibido na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina tiveram o fenótipo considerado como sensível.

Figura 3 Fotografias mostrando a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Alternaria alternata* ao fungicida inibidor externo da quinona (QoI) piraclostrobina.



Legenda: A, isolados de *Alternaria alternata* em meio batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido com ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do fungicida piraclostrobina. B, isolados de *Alternaria alternata* em meio BDA acrescido com SHAM e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do fungicida piraclostrobina. Isolado 3 (SM) possui a mutação no gene *cytB* (QoI-resistente), já isolados 1 (8M) e 2 (13FR) não possuem a mutação no gene *cytB* (QoI-sensível).

Fonte: Do autor (2018).

Em relação à concentração que inibe o crescimento micelial em 50% (EC_{50}), os isolados foram insensíveis à presença do fungicida azoxistrobina e os valores da EC_{50} calculados foram superiores a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os isolados, exceto PE2 e PE15 (Tabela 2). Entretanto, o fungicida piraclostrobina apresentou maior eficiência na inibição do crescimento micelial do fungo com valores da EC_{50} entre $0,7831$ a $45,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2). Mondal et al. (2005)

estabeleceram valores para concentrações discriminatórias dos fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina para isolados de *A. alternata* patótipo tangerina amostrados nos EUA. Para o fungicida piraclostrobina, a dose discriminatória estabelecida por Mondal et al. (2005) foi de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diferindo da dose observada neste trabalho, de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Isolados de *A. alternata* obtidos de plantas de pêsego nos EUA apresentaram crescimento micelial elevado mesmo na dose de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina (FAN et al., 2015). Também foi observado por Mondal et al. (2005) que o crescimento micelial de isolados de *A. alternata* também foram insensíveis a presença de azoxistrobina e a EC_{50} foi superior a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Possiede et al. (2009) também constatou que azoxistrobina mesmo em concentrações altas não inibiu o crescimento micelial de isolados de *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) causador da mancha preta do citros.

Tabela 2 Valores médios da concentração efetiva que inibe o crescimento micelial em 50% (EC_{50}) para azoxistrobina e piraclostrobina e presença da mutação G143A em isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina.

Isolado	EC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Mutação G143A
	Azoxistrobina	Piraclostrobina	
PE1	>200	9,41 b	-
PE2	33,04	1,07 a	-
PE4	>200	9,80 b	-
PE9	>200	45,96 d	+
PE13	>200	2,96 a	-
PE14	>200	2,94 a	-
PE15	14,98	0,78 a	-
PE16	>200	7,13 b	-
5D	>200	3,42 a	-
5FR	>200	2,45 a	-
6FR	>200	0,84 a	-
8M	>200	2,47 a	-
13FR	>200	2,62 a	-
15M	>200	8,01 b	-
15HM	>200	1,25 a	-
33M	>200	4,30 a	-
SM	>200	14,63 c	+
Média	-	7,11	

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra não diferem-se entre si de acordo com teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

O crescimento micelial observado mesmo em altas concentrações dos fungicidas testados poderiam ser explicados pelo uso da respiração alternativa pelo fungo para evitar os efeitos dos fungicidas QoI no complexo enzimático mitocondrial *bc1*, ou pela ineficiência do micélio em absorver essas moléculas (MONDAL et al., 2005). Entretanto, o ácido salicilhidroâmico (SHAM) inibidor dessa via alternativa foi adicionado aos meios de cultivos excluindo essa hipótese. Avaliações da sensibilidade *in vitro* utilizando a germinação de conídios poderiam ser mais eficientes para a determinação da EC₅₀. Foi observado em outros trabalhos menores valores de EC₅₀ para germinação de conídios quando comparados a avaliações de crescimento micelial (MONDAL et al., 2005; POSSIEDE et al., 2009). No entanto, a produção de conídios para alguns isolados deste trabalho demandou muito tempo e, em certos casos, isolados perderam a capacidade de esporulação inviabilizando esse tipo de teste.

3.3 Detecção da substituição G143A nos isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina

Um fragmento de 351 pb do gene *cyt b* foi amplificado dos isolados testados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina. Após o alinhamento das sequências obtidas, juntamente com sequências de referência do genótipo sensível *A. alternata* EV-3-1S (VEGA et al., 2012) e resistente *A. alternata* MSAH5 (ROSENZWEIG et al., 2017), foi verificada a presença de dois isolados (PE9 e SM) possuindo a mutação G143A associada à resistência a fungicidas inibidores da QoI (Figura 4).

O isolado PE9 foi o único genótipo resistente encontrado entre os oito isolados de Perdões, MG. Dentre os isolados obtidos dos estados de RJ e SP somente o isolado SM foi identificado como resistente. O valor da EC₅₀ do fungicida piraclostrobina para o isolado PE9 foi de 45,69 µg mL⁻¹. Para o isolado SM a EC₅₀ foi de 14,63 µg mL⁻¹.

Provavelmente a baixa incidência de isolados possuindo a mutação G143A ocorreu devido à reduzida amostragem de isolados analisados neste trabalho. Entretanto, esta baixa frequência pode indicar que populações do fungo com genótipo resistente ainda não estejam estabelecidas nas áreas de cultivos de citros amostradas. Novas amostragens em diferentes regiões de cultivo de citros no Brasil devem ser realizadas para monitorar a presença de populações resistentes de *A. alternata* à fungicidas QoI.

Figura 4 Sequências do gene *cyt b* de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina.

QoI-S	EV-3-1S	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
QoI-R	MSAH5	T	A	T	G	A	G	C	T	G	C	A	A	C	A
	PE9	T	A	T	G	A	G	C	T	G	C	A	A	C	A
	SM	T	A	T	G	A	G	C	T	G	C	A	A	C	A
	PE1	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	PE2	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	PE4	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	PE13	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	PE14	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	PE15	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	PE16	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	5D	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	5FR	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	6FR	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	8M	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	13FR	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	15M	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	15HM	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A
	33M	T	A	T	G	A	G	G	T	G	C	A	A	C	A

Legenda: A mutação G143A (substituição do aminoácido glicina pela alanina) é indicada pela mutação não-sinônima do nucleotídeo guanina (G) (em azul) por citosina (C, em vermelho), conferindo resistência a estrobilurinas por meio de mudança na sítio-alvo da proteína. Sequências de isolados de referência para QoI-resistentes (QoI-R) (*A. alternata* MSAH5) e QoI-sensíveis (QoI-S) (*A. alternata* EV-3-15) foram utilizadas no alinhamento.

Fonte: Do autor (2018).

3.4 Custo adaptativo da mutação G143A

O crescimento micelial, produção de conídios e germinação de conídios *in vitro* dos isolados QoI-resistentes, PE9 e SM, e QoI-sensíveis, PE15 e 33M, sem a presença do fungicida foram avaliados.

O isolado SM apresentou a maior média de crescimento micelial diferindo-se significativamente ($p < 0,05$) dentre os quatro isolados testados (Tabela 3). Os isolados PE9, PE15 e 33M obtiveram médias semelhantes e que não foram estatisticamente diferentes entre si (Tabela 3). A média de produção dos isolados QoI-sensíveis foi maior do que os isolados QoI-resistentes ($p < 0,05$) através do teste Scott-Knott. Em relação a germinação de conídios, o isolado SM apresentou média inferior aos outros três isolados na ausência do fungicida piraclostrobina (Tabela 3). Na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ os isolados QoI-resistentes apresentaram taxas de germinação superiores quando comparados aos QoI-sensíveis (Tabela 3). A taxa de germinação foi mais baixa quando na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina.

Tabela 3 Tabela comparativa entre os componentes do custo adaptativo da mutação G143A de isolados representativos QoI-resistentes e QoI-sensíveis de *Alternaria alternata* patótipo tangerina.

Isolado	Crescimento micelial (mm)	Esporulação (conídios mL ⁻¹)	Germinação (%)	
			0 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹
QoI-resistente				
PE9	27,77 a	4,79 x 10 ⁵ a	99,16 bB	41,00 bA
SM	37,41 b	2,94 x 10 ⁵ a	44,16 aA	40,33 bA
QoI-sensível				
PE15	26,90 a	1,25 x 10 ⁶ b	88,83 bB	18,00 aA
33M	28,72 a	1,37 x 10 ⁶ b	93,83 bB	27,33 aA

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra minúscula não se diferem entre si dentro das colunas de acordo com teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não se diferem entre si entre as colunas de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2018).

Foram selecionados isolados de genótipo e fenótipo QoI-sensível e QoI-resistente de acordo com a avaliação da EC₅₀ e presença da mutação G143A. Na ausência do fungicida piraclostrobina os isolados QoI-resistentes apresentaram menor capacidade de esporulação em meio SNA e menor taxa de germinação em meio caldo BD em relação aos isolados QoI-sensíveis (Tabela 3). Entretanto, o isolado QoI-resistente SM exibiu maior crescimento micelial em meio BDA do que os outros isolados analisados (Tabela 3). Provavelmente, a menor capacidade de esporulação e germinação *in vitro* pode estar associada ao custo adaptativo da mutação presente em tais isolados. Contudo, o crescimento micelial não apresentou esse custo já que um isolado QoI-resistente apresentou maior crescimento micelial em relação aos demais. Os ensaios para se predizer o custo adaptativo da mutação abrangeram estudos *in vitro* dos isolados resistentes e sensíveis. Outros testes envolvendo análises de competição entre isolados resistentes e sensíveis *in vivo* são necessários para confirmar se os isolados QoI-resistentes sofreram alguma penalização em sua adaptabilidade. A avaliação do custo adaptativo de isolados de *A. alternata* isolados de pessegueiros e plantas de pistache, portadores da mutação G143A, mostrou que não houveram penalidades a para esses isolados em relação à esporulação e germinação *in vitro* e crescimento micelial em BDA (KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2010; FAN et al., 2015).

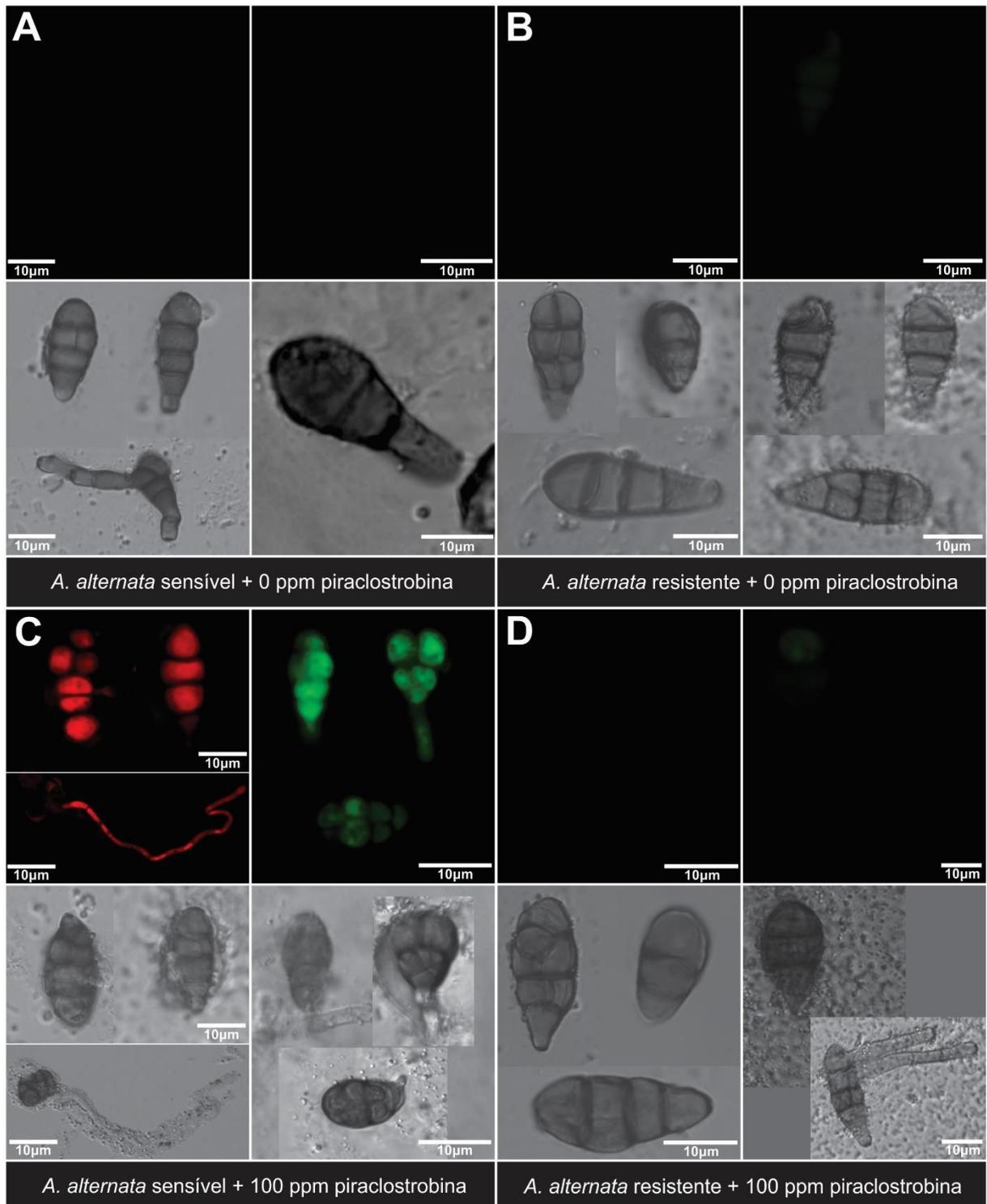
O mecanismo de resistência relacionado à fungicidas QoI dos isolados estudados nesse estudo está baseado em uma mutação pontual G143A no gene *cyt b*. Ao contrário da resistência quantitativa, que é multigênica e caracterizada por um pequeno decréscimo da sensibilidade da população em relação ao tempo, a resistência qualitativa é conferida por mutações pontuais em genes que codificam enzimas importantes ao fungo e é caracterizada por uma imediata e

significativa mudança em relação a resistência. Os altos valores para EC_{50} encontrados nesse estudo refletem tal efeito da resistência qualitativa na sensibilidade de isolados resistentes à fungicidas QoI. Portanto, esse estudo pode auxiliar em futuras avaliações da sensibilidade de isolados frente a fungicidas QoI, tendo em vista que nenhum trabalho está disponível na literatura até o momento.

3.5 Avaliação de EROS e morte celular

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e morte celular de conídios de *A. alternata* na ausência e presença do fungicida piraclostrobina foram avaliadas (Figura 5). No tratamento com $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina os dois isolados testados não emitiram fluorescência para ambos os testes de detecção de EROS e de morte celular (Figura 5A e B), mostrando que os conídios não sofreram qualquer alteração na produção de EROS e tampouco passaram pelo processo de morte celular. Entretanto, no tratamento com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina houve diferenças nos testes entre os dois isolados. O isolado PE15 QoI-sensível emitiu fluorescência verde característica do fluorocromo diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCF) devido a elevada produção de EROS causada, provavelmente, pelo estresse oxidativo gerado pela exposição ao fungicida (Figura 5C). Este mesmo isolado também emitiu uma fluorescência vermelha característica para o fluorocromo iodeto de propídio evidenciando o processo de morte celular quando exposto ao fungicida (Figura 5C), e confirmando seu fenótipo sensível. Já o isolado PE9 QoI-resistente não apresentou alteração à exposição a piraclostrobina visto a baixa emissão de fluorescência para o teste de detecção de EROS e de nenhuma emissão de fluorescência para o teste morte celular (Figura 5D), sugerindo que o fungicida não exerceu nenhuma ação sobre os conídios confirmando o seu fenótipo resistente.

Figura 5 Fotomicrografias obtidas em microscópio laser confocal da avaliação de espécies reativas de oxigênio e morte celular em conídios de *A. alternata*.

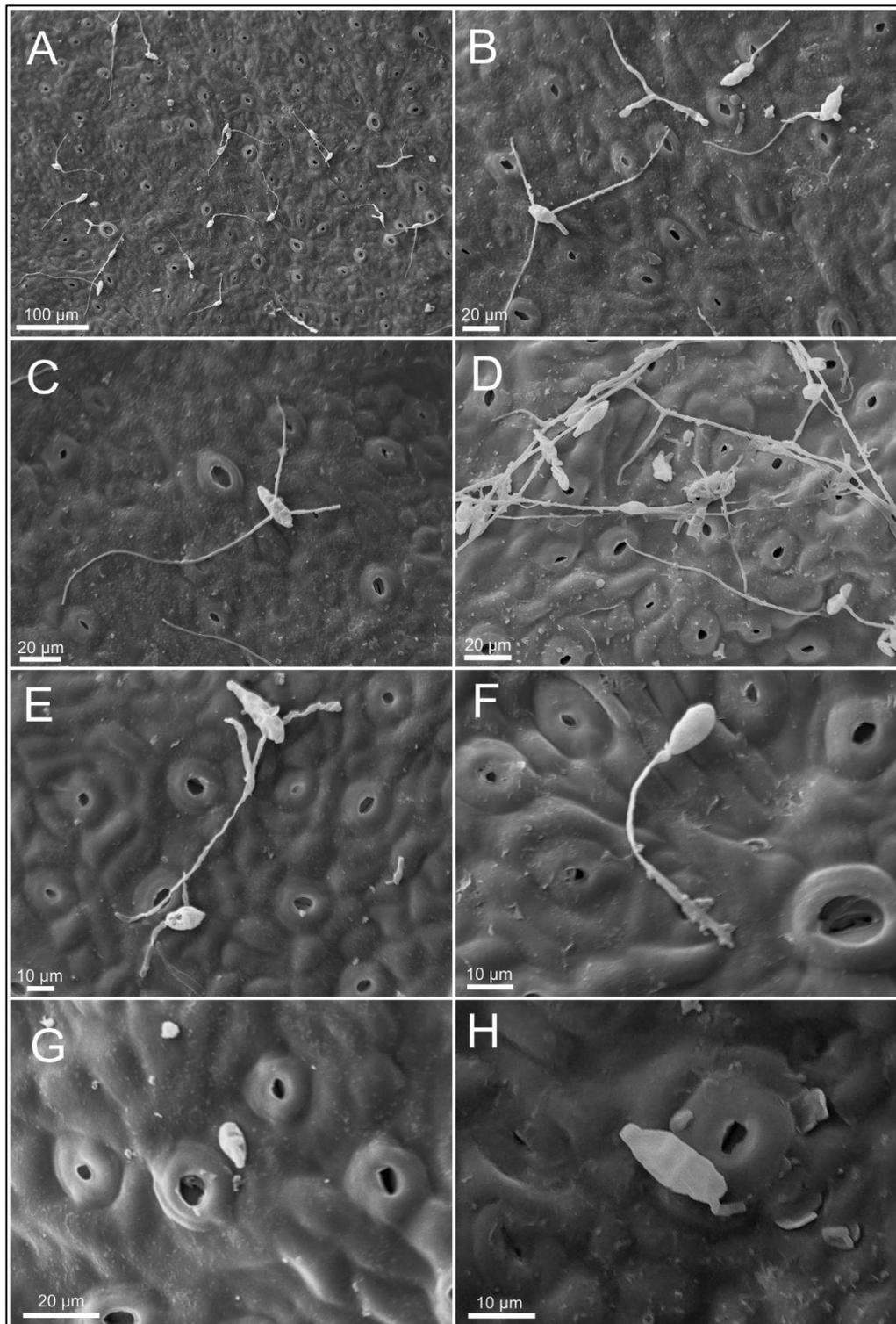


Legenda: Morte celular com iodeto de propídio (IP, vermelho) e espécies reativas de oxigênio com Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCF, verde) para conídios de *Alternaria alternata* patótipo tangerina sensível (COD-S) (A e C) e resistente (COD-R) (B e D) ao fungicida piraclostrobina, cultivados por 6 h em BDA com 0 (A e B) e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (C e D) de piraclostrobina a 25 °C no escuro. Fonte: Do autor (2018).

3.6 Germinação *in vivo* de conídios de *A. alternata*

A germinação dos conídios de *A. alternata* do isolado QoI-resistente SM e QoI-sensível PE15 foi avaliada *in vivo* em de microscopia eletrônica de varredura. No tratamento de 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina foi possível observar a germinação dos conídios para os isolados SM QoI-resistente e PE15 QoI-sensível (Figura 6A-E). Entretanto, não foi possível visualizar a formação de apressórios nem a penetração das hifas via estômatos. A germinação dos conídios foi inibida na presença de piraclostrobina a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6F-H) para os dois isolados. O isolado SM após 18 h de inoculação sem a presença do fungicida apresentou a formação de uma camada de micélio na superfície da folha (Figura 6D). Apesar de o isolado SM apresentar uma menor taxa de germinação em relação ao isolado PE15 na ausência do fungicida (Tabela 3), aparentemente não houve diferença na colonização superficial da face abaxial de folhas de tangelo. O isolado QoI-resistente exibiu maior taxa de germinação *in vitro* quando exposto à piraclostrobina na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, entretanto, não foi possível visualizar a germinação *in vivo* nas mesmas condições.

Figura 6 Eletromicrografias feitas em microscópio eletrônico de varredura com detalhes de conídios de *A. alternata* após 6 e 18h da inoculação em folhas destacadas de tangelo.



Legenda: Isolado PE15 QoI-sensível tratado com $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A-D) e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (G-H) de piraclostrobina após 6 h de inoculação, e isolado SM QoI-resistente com $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 18 h (D) e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 6 h (F).

Fonte: Do autor (2018).

4 CONCLUSÕES

Isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina obtidos de plantas oriundas de Perdões, Minas Gerais e de diferentes localidades no estado do Rio de Janeiro e São Paulo apresentam resistência a fungicidas QoI.

Isolados resistentes a piraclostrobina apresentaram valores da EC_{50} entre 0,7831 a 45,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e a maioria dos isolados foi insensível à azoxistrobina. Além disso, foi verificada a presença da mutação G143A no gene *cyt b* para dois isolados.

A aplicação de fungicidas à base de estrobilurinas nas áreas de cultivo de citros amostradas pode estar selecionando indivíduos resistentes.

A menor porcentagem de germinação *in vitro* e decréscimo na capacidade de esporulação dos isolados resistentes nesse estudo indicam a possibilidade de custo adaptativo da mutação G143A.

De acordo com os dados de sequenciamento do gene *endoPG*, os isolados foram agrupados em três linhagens filogenéticas, como já foi descrito anteriormente em estudos com isolados amostrados no Brasil.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIMITSU, K. et al. *Alternaria* host-selective toxins: Determinant factors of plant disease. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, n. 2, p. 109–122, 2014.
- AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 6, p. 435–446, 2003.
- AVENOT, H. F.; MICHAILIDES, T. J. Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. **Crop Protection**, v. 78, p. 214–221, 2015.
- BARTLETT, D. W. et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002a.
- BARTLETT, D. W. et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002b.
- BELLA, P. et al. Severe infections of *Alternaria* spp. on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 231, 2001.
- BENELOUJAEPHAJRI, E. et al. Production of reactive oxygen species and wound-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* are preceded and depend on a burst of calcium. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, 2013.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists**. 2. ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1999.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. 21. ed. Bruxelas, Bélgica: FRAC Monograph, 1998.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tanger fruits. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, n. 4, p. 173–178, 2011.
- CASTROAGUDÍN, V. L. et al. Resistance to QoI Fungicides Is Widespread in Brazilian Populations of the Wheat Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, v. 105, n. 3, p. 284–94, 2015.
- COBB, N. A. Letters on the diseases of plants - *Alternaria* of the citrus tribe. **Agricultural Gazette NSW**, v. 14, p. 955–986, 1903.
- FAN, Z. et al. Fitness and Competitive Ability of *Alternaria alternata* Field Isolates with Resistance to SDHI, QoI, and MBC Fungicides. **Plant Disease**, v. 99, n. 12, p. 1744–1750, 2015.
- FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D. et al. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

FERREIRA, E. A. et al. Mancha-marrom-de-Alternária em tangerineiras e seus híbridos: identificação e manejo. **EPAMIG. Circular Técnica**, n. 244, p. 1–7, 2016.

FIRSTENCEL, H.; BUTT, T. M.; CARRUTHERS, R. . A fluorescence microscopy method for determining viability of entomophthoralean fungal spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 55, p. 258–264, 1990.

FRAC BRASIL. **Fungicide Resistance Action Committee, Brazil.**
FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). List of Plant Pathogenic Organisms Resistant to Disease Control Agents. n. May, p. 1–75, 2017.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). FRAC Code List © * 2018: Fungicides sorted by mode of action. p. 1–10, 2018.

GISI, U. et al. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 859–867, 2002.

GÓES, A.; MONTES DE OCA, A. G.; REIS, R. F. . Ocorrência de la mancha de Alternaria en mandarina Dancy en el estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 386, 2001.

GRASSO, V. et al. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 62, n. 6, p. 465–472, jun. 2006.

HUANG, F. et al. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. **Fungal Biology**, v. 119, n. 5, p. 320–330, 2015.

KARAOGLANIDIS, G. S.; LUO, Y.; MICHAELIDES, T. J. Competitive Ability and Fitness of *Alternaria alternata* Isolates Resistant to QoI Fungicides. **Plant Disease**, v. 95, n. 2, p. 178–182, 2010.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

KOHMOTO, K.; AKIMITSU, K.; OTANI, H. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. **Phytopathology**, v. 81, p. 719–722, 1991.

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

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Evolutionary Genetics Analysis**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

- LAWRENCE, D. P. et al. The sections of *Alternaria* : formalizing species-group concepts. **Mycologia**, v. 105, n. 3, p. 530–546, 2013.
- LAWRENCE, D. P.; ROTONDO, F.; GANNIBAL, P. B. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. **Mycological Progress**, v. 15, n. 1, 2016.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. 1. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2006.
- LOPES, E. D. ALBUQUERQUE, I. C. ARAÚJO, E. Mancha-marrom-de alternária: uma grave doença nos pomares de tangerina da Paraíba. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 3, p. 23–27, 2009.
- MARÍN, J. E. et al. First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. **Phytopathology**, v. 90, n. 5, p. 686, 2006.
- MONDAL, S. N. et al. Baseline Sensitivities of Fungal Pathogens of Fruit and Foliage of Citrus to Azoxystrobin, Pyraclostrobin, and Fenbuconazole. **Plant Disease**, v. 89, n. 11, p. 1186–1194, 2005.
- MONDAL, S. N.; GODOY DA SILVA, A.; M. DEWDNEY, M. Resistance to strobilurin fungicides in a population of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* brown spot of citrus. (Abstr.). **Phytopathology**, v. 99, p. S88, 2009.
- MURRAY, M. G; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.
- ORTEGA-VILLASANTE, C. et al. In vivo ROS and redox potential fluorescent detection in plants: Present approaches and future perspectives. **Methods**, v. 109, p. 92–104, 2016.
- PEEVER, T. L. et al. Worldwide Phylogeography of the Citrus Brown Spot Pathogen, *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v. 92, n. 7, p. 794–802, 2002.
- PEEVER, T. L. et al. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, v. 96, n. 1, p. 119–134, 2004.
- PEEVER, T. L. et al. Citrus Black Rot is Caused by Phylogenetically Distinct Lineages of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v. 95, n. 5, p. 512–8, 2005.
- PERES, N. A. R.; AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L, W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, v. 87, p. 750, 2003.
- POSSIEDE, Y. M. et al. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 308–313, 2009.
- PRINGLE, A.; TAYLOR, J. W. The fitness of filamentous fungi. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 474–481, 2002.
- ROSENZWEIG, N. et al. First report of QoI resistance in *Alternaria spp* . infecting sugar beet

(*Beta vulgaris*). p. 5197, 2017.

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

SPÓSITO, M. B. et al. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 231, 2003.

SPÓSITO, M. B. Mancha-Marrom-de-Alternária. In: ZAMBOLIM, L.; BASSANEZI, R. B. (Eds.). . **Doenças Quarentenárias dos Citros**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 109–116.

STEWART, J. E. et al. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: Incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2014.

STUART, R. M. et al. *Alternaria* Brown Spot. **Laranja**, v. 30, n. 1–2, p. 29–44, 2009.

SWART, S. H. et al. Brown spot of *Minneola* tangelo and efficacy of fungicidal sprays programmes for disease control in South Africa. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v. 1, p. 379–384, 1996.

TIMMER, L. W. et al. *Alternaria* diseases of citrus - Novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 42, n. 2, p. 99–112, 2003.

TSUGE, T. et al. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 44–66, 2013.

VEGA, B. et al. A Rapid Resazurin-Based Microtiter Assay to Evaluate QoI Sensitivity for *Alternaria alternata* Isolates and Their Molecular Characterization. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p. 1262–1270, 2012.

VEGA, B.; DEWDNEY, M. M. Distribution of QoI Resistance in Populations of Tangerine-Infesting *Alternaria alternata* in Florida. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 67–76, 2014.

VICENT, A. et al. First report of *Alternaria* Brown Spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, v. 84, p. 1044, 2000.

WHITESIDE, J. O. A newly recorded *Alternaria* induced Brown Spot disease on Dancy tangerines in Florida. **Plant Disease Reporter**, v. 60, p. 326–329, 1976.

WOUDENBERG, J. H. C. et al. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v. 75, n. May, p. 171–212, 2013.

WOUDENBERG, J. H. C. et al. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, *formae speciales* or pathotypes? **Studies in Mycology**, v. 82, p. 1–21, 2015.