



**INDIARA CAROL LOPES PINHEIRO**

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE  
*Alternaria alternata* PATÓTIPO TANGERINA A TRIAZÓIS,  
ESTROBILURINAS E CARBOXAMIDA**

**LAVRAS-MG  
2021**

**INDIARA CAROL LOPES PINHEIRO**

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Alternaria alternata*  
PATÓTIPO TANGERINA A TRIAZÓIS, ESTROBILURINAS E CARBOXAMIDA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Eduardo Alves  
Orientador

Dr. Silvino Intra Moreira  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2021**

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

Pinheiro, Indiara Carol Lopes.  
patótipo tangerina a triazóis, estrobilurinas e carboxamida /  
Indiara Carol Lopes Pinheiro. - 2021.  
63 p.

Orientador(a): Eduardo Alves.  
Coorientador(a): Silvino Intra Moreira.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.  
Bibliografia.

1. Mancha marrom de Alternaria. 2. Resistência. 3. Fungicidas.  
I. Alves, Eduardo. II. Moreira, Silvino Intra. III. Título.

**INDIARA CAROL LOPES PINHEIRO**

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Alternaria alternata*  
PATÓTIPO TANGERINA A TRIAZÓIS, ESTROBILURINAS E CARBOXAMIDA**

**EVALUATION OF THE SENSITIVITY OF ISOLATES OF *Alternaria alternata*  
TANGERINE PATHOTYPE TO TRIAZOLES, STROBILURINES AND  
CARBOXAMIDE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de Abril de 2021

Dra. Ana Cláudia Costa	UFLA
Dra. Deila Magna dos Santos Botelho	UFLA
Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves  
Orientador

Dr. Silvino Intra Moreira  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2021**

A meus pais José e Cátia por todo amor, carinho e apoio.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, pelo sustento e por me guiar em todos os momentos até aqui. Agradeço ainda pelos pais que tenho, pela família e amigos que me acompanharam nessa jornada.

Aos meus pais, José e Cátia pela educação, apoio, auxílio e amor, sem os quais eu não conseguiria chegar ao meu objetivo.

Ao meu namorado, Felipe, por todo carinho e apoio incondicional.

À Universidade Federal de Lavras por me proporcionar a realização de um sonho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Alves, por toda orientação, paciência e confiança, durante o desenvolvimento deste trabalho e de todo o curso.

Ao meu coorientador, Dr. Silvino Intra Moreira, por toda atenção, disponibilidade, orientação no decorrer dessa dissertação.

À Patrícia Ricardino, por toda amizade, auxílio e orientação no decorrer dessa dissertação.

À Sarah Guimarães, por todo auxílio e disponibilidade.

À Ariane e a Zenóbia por me auxiliarem sempre que precisei, sem medir esforços.

Às amigas feitas no Departamento de Fitopatologia (DFP).

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, Aline, Adriano, Dérica, Yaya.

Aos membros do Núcleo de Estudos em Fitopatologia – NEFIT.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia.

**Muito Obrigada!**

## RESUMO

A mancha marrom de alternaria é uma doença causada pelo fitopatógeno *Alternaria alternata* patótipo tangerina, que causa danos severos em pomares de tangerina e seus híbridos. No Brasil os relatos de ocorrência do patógeno são verificados desde 2001, e hoje o patógeno é detectado em diversos estados produtores da fruta. Objetivou-se nesse trabalho avaliar a sensibilidade de trinta isolados de diferentes localidades, os quais foram identificados como *A. alternata* por meio de análises morfológicas e teste de patogenicidade. Os mesmos foram avaliados quanto à sensibilidade à triazóis (DMI – inibidores da demetilação), estrobilurinas (QoI – inibidores da quinona oxidase) e carboxamida (SDHI – inibidores da enzima succinato desidrogenase), além de possíveis custos adaptativos. Os isolados apresentam resistência aos fungicidas DMI e SDHI, com valores de  $EC_{50}$  entre  $4,47 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $27,22 \mu\text{g mL}^{-1}$  (difenoconazol),  $7,42 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $15,53 \mu\text{g mL}^{-1}$  (tebuconazol) e  $2,68 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $28,72 \mu\text{g mL}^{-1}$  (boscalida). Todos os isolados oriundos de Campanha-MG apresentaram resistência a fungicidas QoI, sendo insensíveis tanto a azoxistrobina quanto a piraclostrobina com  $EC_{50}$  superiores a  $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Não foram observadas reduções na esporulação dos fenótipos de resistência a SDHI e DMI. O crescimento micelial dos isolados DMI resistentes sofreu redução e indicam a possibilidade de custo adaptativo. Isolados SDHI resistentes apresentaram hipersensibilidade ao *stress* oxidativo. A ocorrência de fenótipos de resistência a fungicidas triazóis, estrobilurinas e carboxamida nas áreas amostradas sugerem uma pressão de seleção a indivíduos resistentes.

**Palavras-chave:** Resistência. SDHI. QoI. DMI. Mancha marrom de alternaria.

## ABSTRACT

The alternaria brown spot is the disease caused by the pathogen *Alternaria alternata* pathotype tangerine, that has caused severe damage in tangerine and hybrids in orchards. In Brazil, reports of the pathogen occurrence have been verified since 2001, and today the pathogen is detected in several fruit-producing states. The objective of this work was to evaluate the sensitivity of thirty isolates from different locations, which were identified as *A. alternata* through morphological analysis and pathogenicity test. They were evaluated for sensitivity to triazoles (DMI – demethylation inhibitors), strobilurins (QoI – quinone oxidase inhibitors) and carboxamide (SDHI – succinate dehydrogenase enzyme inhibitors), in addition to possible adaptive costs. The isolates show resistance to the fungicides DMI and SDHI, with  $EC_{50}$  values between  $4.47 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $27.22 \mu\text{g mL}^{-1}$  (difenoconazole),  $7.42 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $15.53 \mu\text{g mL}^{-1}$  (tebuconazole) and  $2.68 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $28.72 \mu\text{g mL}^{-1}$  (boscalide). All isolates from Campanha-MG showed resistance to QoI fungicides, being insensitive to both azoxystrobin and pyraclostrobin with  $EC_{50}$  higher than  $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. No reductions in sporulation of SDHI and DMI resistance phenotypes were observed. The mycelial growth of resistant DMI isolates was reduced and indicate the possibility of adaptive cost. Resistant SDHI isolates showed hypersensitivity to oxidative stress. The occurrence of resistance phenotypes to triazoles, strobilurins and carboxamide fungicides in the sampled areas suggest a selection pressure for resistant individuals.

**Keywords:** Resistance. SDHI. QoI. DMI. Alternaria brown spot.



## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1 O cultivo da Tangerina .....	13
2.2 O gênero <i>Alternaria</i> e suas características .....	13
2.3 A mancha marrom de <i>Alternaria</i> (MMA) .....	15
2.4 Controle químico da MMA .....	16
2.5 Resistência à SDHI, DMI e QoI .....	17
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	18
REFERÊNCIAS .....	19
CAPÍTULO 2 SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE <i>Alternaria alternata</i> À FUNGICIDAS SDHI, DMI e QoI .....	25
1 INTRODUÇÃO .....	27
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
2.1 Obtenção dos isolados .....	29
2.1.1 Identificação e testes de patogenicidade dos isolados .....	31
2.2 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade dos isolados .....	32
2.2.1 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade à fungicidas SDHI .....	32
2.2.2 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade à fungicidas DMI .....	33
2.2.3 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade à fungicidas QoI .....	33
2.3 AVALIAÇÃO DO CUSTO ADAPTATIVO .....	34
2.3.1 Crescimento micelial .....	34
2.3.2 Esporulação <i>in vitro</i> .....	34
2.3.3 Sensibilidade osmótica (SOS) e Sensibilidade oxidativa (SOX) .....	34
3 VARIÁVEIS ANALISADAS .....	35
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
5 RESULTADOS .....	37
5.1 Identificação dos isolados e teste de patogenicidade .....	37
5.2 Caracterização <i>in vitro</i> da sensibilidade de isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina .....	43
5.2.1 Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade à fungicidas SDHI .....	43

5.2.2	Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade à fungicidas DMI .....	44
5.2.3	Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade à fungicidas QoI.....	45
5.3	Avaliação do custo adaptativo .....	46
5.3.1	Crescimento micelial .....	46
5.3.2	Esporulação .....	46
5.3.3	Sensibilidade osmótica (SOS) e Sensibilidade oxidativa (SOX) .....	47
6	DISCUSSÃO .....	50
6.1	Caracterização <i>in vitro</i> da sensibilidade de isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina .....	50
6.1.1	Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade à fungicidas SDHI.....	50
6.1.2	Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade à fungicidas DMI .....	50
6.1.3	Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade à fungicidas QoI.....	51
6.2	Avaliação do custo adaptativo .....	51
6.2.1	Crescimento micelial .....	51
6.2.2	Esporulação .....	52
6.2.3	Sensibilidade osmótica (SOS) e Sensibilidade oxidativa (SOX) .....	52
7	CONCLUSÕES .....	54
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	55
	REFERÊNCIAS .....	56

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* é composto por grupos e, entre eles, destaca-se o das tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) e seus híbridos (FERREIRA et al., 2016). Os frutos são caracterizados pela casca alaranjada e pela polpa composta por gomos de fácil separação.

Segundo a FAO (2019), o Brasil é o sétimo maior produtor mundial de tangerina, entretanto, o volume de exportações ainda é pequeno, pois a maior parte da produção visa o abastecimento do mercado interno com o consumo de frutas *in natura*, em sua maior parte a cultivar Ponkan, não apreciada por consumidores do mercado externo. A produção dessa fruta está concentrada na região sudeste do país e o estado de Minas Gerais se destaca, por ser o segundo maior produtor, respondendo por aproximadamente 21% da produção brasileira (IBGE, 2019).

As tangerineiras podem ser acometidas por diversas pragas e doenças, e dentre as doenças destaca-se a Mancha Marrom de Alternaria (MMA), cujo agente etiológico é o fungo *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl patótipo tangerina (PEEVER et al., 2004), que acomete cultivares de tangerina e seus híbridos (TIMMER et al., 2003). Entre as cultivares comerciais suscetíveis a MMA estão: ‘Ponkan’, ‘Dancy’, tangor ‘Murcott’ e tangelos (FERREIRA et al., 2016).

A mancha marrom de alternaria foi relatada pela primeira vez na Austrália (COBB, 1903). Outros registros de sua disseminação ocorreram na Espanha (VICENT et al., 2000), China (WANG et al., 2010), Turquia (CANIHOS et al., 1997) e Argentina (PERES et al., 2003). O primeiro relato no Brasil ocorreu em 2001 no estado do Rio de Janeiro (GÓES et al., 2001) e dois anos após, houve relatos em diversos outros estados brasileiros, incluindo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraíba (SPÓSITO et al., 2003; LOPES et al., 2009).

Os sintomas da infecção pelo patógeno podem ser visualizados em frutos, folhas e galhos, em órgãos jovens pode ser observado 24 horas após o contato entre o fungo e a planta, apresentando pequenas lesões ovais e circulares de coloração marrom escura. Em folhas e frutos amadurecidos a lesão de coloração marrom é circundada por um halo amarelo (TIMMER et al., 1998; FERREIRA et al., 2016; AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003).

No cenário atual os danos aos plantios comerciais de tangerineiras var. “Dancy”, “Ponkan” e tangor “Murcott” são severos, com redução da produtividade e qualidade dos frutos, resultando na inviabilidade da manutenção dos pomares. Em epidemias, o patógeno

causa abortamento de frutos e seca de ramos e ponteiros (TIMMER et al., 1998; FERREIRA et al., 2016; AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). Para o manejo da MMA recomenda-se a utilização de mudas sadias e sempre que possível, de cultivares resistentes, implantação do pomar em área com boa aeração e em espaçamento adequado, realização de podas de limpeza e utilização de fungicidas durante o início de brotações, florações e frutificação, a fim de evitar a disseminação do patógeno no pomar (ZAMPRONIO et al., 2013; FERREIRA et al., 2016).

Entre os grupos químicos recomendados para o controle da MMA estão as carboxamidas (FRAC código 7) , triazóis (FRAC código 3) e estrobilurinas (FRAC código 11) (FRAC, 2018). As carboxamidas atuam nas mitocôndrias, no complexo II na cadeia de transporte de elétrons, como inibidoras da enzima succinato desidrogenase (SDHI), impedindo a oxidação do succinato a fumarato (FRAC, 2014). Os triazóis, por sua vez, atuam como inibidores da demetilação (DMI) durante a formação do ergosterol (ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015). As estrobilurinas atuam como inibidoras da quinona oxidase (QoI), mais especificamente nas mitocôndrias, no complexo III da cadeia de transporte de elétrons (FRAC, 2012). Em consequência não ocorre a formação de ATP, necessário para manutenção e desenvolvimento do fitopatógeno.

A diminuição da sensibilidade de fungos à fungicidas DMI foi relatada em *Alternaria alternata*, *Uncinula necator*, *Venturia inaequalis*, *Monilinia fructicola*, *Zymoseptoria tritici*, *Didymella bryoniae* (AVENOT et al., 2016; DÉLYE; LAIGRET; CORIO-COSTET, 1997; KÖLLER; WILCOX, 2001; LUO; SCHNABEL, 2008; MILGATE et al., 2016; THOMAS; LANGSTON JR; STEVENSON, 2012), à fungicidas SDHI em *Botrytis cinerea*, *Didymella bryoniae*, *Alternaria alternata* (FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2017; THOMAS; LANGSTON JR; STEVENSON, 2012; AVENOT; MICHAILIDES, 2007; YANG; BRANNEN; SCHNABEL, 2014) e, à fungicidas QoI em *Alternaria alternata*, *Cercospora kikuchii*, *Plasmopara viticola* (VEGA; DEWDNEY, 2014; SAUTUA et al., 2020; SANTOS et al., 2020).

Até o presente estudo não há, disponível para conhecimento público, relato sobre a detecção de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina, coletados em pomares brasileiros, resistentes à fungicidas SDHI e DMI. Além disso, até o presente, não há relato sobre a sensibilidade de isolados prospectados do município de Campanha-MG à fungicidas QoI.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O cultivo da Tangerina

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de tangerina (FAO, 2019). A produção dessa fruta ocupa o segundo lugar de importância em relação à produção nacional de espécies cítricas, ficando atrás apenas da produção de Laranja. Segundo dados do IBGE (2019), foram produzidas 984.897 toneladas de tangerina no ano agrícola de 2019, sendo que 61,3% do total produzido está concentrado na região sudeste do país. Por sua vez, o Estado de Minas Gerais se destaca por ser o segundo maior produtor nacional, respondendo por aproximadamente 21% da produção brasileira. No ano de 2019 a área plantada de tangerina no Brasil era de 52.928 hectares, desse total, 11.433 em Minas Gerais.

O gênero *Citrus* é composto por grupos, como exemplos: laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck.), limões (*Citrus limon* L. Burmann f.) e tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), sendo as tangerinas e seus híbridos o segundo grupo de maior importância comercial (FERREIRA et al., 2016). Entre os híbridos das tangerinas estão os tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macfad) e tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis* (L.) Osb). São características dos frutos desse grupo a casca alaranjada, frutos de tamanho grande e polpa composta por gomos de fácil separação.

A Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), cujo agente etiológico é o fungo *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl patótipo tangerina (PEEVER et al., 2004), é uma doença que acomete cultivares de tangerina e seus híbridos (TIMMER et al., 2003), sendo considerada de grande importância entre as cultivares comerciais suscetíveis, como: ‘Ponkan’, ‘Dancy’, tangor ‘Murcott’ e tangelos (FERREIRA et al., 2016).

### 2.2 O gênero *Alternaria* e suas características

O gênero *Alternaria* foi descrito pela primeira vez por Nees em 1816 e, a identificação das espécies pertencentes ao gênero teve como base, antes do desenvolvimento de tecnologias moleculares, características morfológicas. O maior expoente desse período foi Emory Guy Simmons, que contribuiu na identificação de novas espécies e agrupamento das espécies já existentes (LAWRENCE; ROTONDO; GANNIBAL, 2016). A identificação morfológica utilizava características dos conídios, como: cor, forma e septação (LAWRENCE;

ROTONDO; GANNIBAL, 2016) para separar as espécies, contudo, há indícios de que a condição de cultivo pode influenciar a morfologia dos conídios (LEACH; ARAGAKI, 1970). Com o avanço dos métodos moleculares, a classificação dentro do grupo passou a aliar análise de DNA e caracteres morfológicos. Segundo Lawrence, Rotondo e Gannibal. (2016) os estudos envolvendo filogenia causaram mudanças na taxonomia e sistemática, devido a isso os autores propuseram que o número de seções dentro do gênero fosse elevado para 27, o que vigora atualmente. Para possibilitar a identificação das espécies dentro do gênero *Alternaria* foram estabelecidos marcadores moleculares, são eles: *gpd*, *Alt a1*, *actina*, *ATPase*, *calmodulina* (LAWRENCE et al., 2013).

O agente etiológico da mancha marrom de alternaria foi identificado pela primeira vez como *A. citri* Ellis e Pierce (WHITESIDE, 1976), devido a semelhanças morfológicas entre o agente etiológico da MMA e a Podridão Negra de Alternaria (PNA). Posteriormente o agente etiológico da doença foi caracterizado como *Alternaria alternata* (KOHMOTO; SCHEFFER; WHITESIDE, 1979), e passou a ser associado ao “patótipo” citri (SOLEL, 1991). O termo patótipo foi empregado, pois apesar das semelhanças morfológicas os patógenos apresentam diferenças na patogenicidade (TSUGE et al., 2013).

Associados a doenças em citros tem-se dois patótipos de *A. alternata*, os mesmos utilizam como base para a separação, a especificidade quanto ao hospedeiro e a produção de toxinas hospedeiro-específicas (HSTs). O patótipo especificamente associado a limão-rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) e limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) produz a toxina hospedeiro-específica ACRL (*Alternaria Citri Rough Lemon*) e causa a doença conhecida como mancha foliar de alternaria (MFA), enquanto o patótipo tangerina, específico a tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macfad.) e tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis* (Linnaeus) Osbeck), produz a toxina ACT (*Alternaria Citri Tangerine*), sendo o agente causal da MMA (HUANG et al., 2014; TSUGE et al., 2013; AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003; KOHMOTO; AKIMITSU; OTANI, 1991).

O patógeno *Alternaria alternata*, anteriormente classificado como pertencente à seção *Alternata* (WOUDENBERG et al., 2013), e atualmente pertencente a seção *Alternaria*, constituída por aproximadamente 60 espécies, que na literatura são frequentemente chamadas de *Alternaria* de esporos pequenos (LAWRENCE; ROTONDO; GANNIBAL, 2016). Essa seção inclui diversos fitopatógenos, tanto produtores quanto não produtores de HSTs, entre os produtores são conhecidos os patótipos “maçã”, “morango”, “pera japonesa”, “tomate”, “tabaco”, “limão-rugoso” e “tangerina” (TSUGE et al., 2013; AKIMITSU et al., 2014).

### 2.3 A mancha marrom de *Alternaria* (MMA)

A mancha marrom de alternaria é uma doença que acomete tangerineiras e seus híbridos, reduz a produtividade e a qualidade dos frutos (CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999), causada pelo fungo *Alternaria alternata*, devido à distribuição mundial dos cultivos de citros (FAO, 2019), a importância desse patógeno torna-se global. O primeiro relato da MMA ocorreu na Austrália (COBB, 1903), outros registros de sua disseminação foram feitos na Espanha (VICENT et al., 2000), China (WANG et al., 2010), Turquia (CANIHOS et al., 1997), Argentina (PERES et al., 2003). No Brasil, a primeira detecção da doença foi feita por (GÓES et al., 2001), em plantas no estado do Rio de Janeiro e nos anos seguintes a doença foi relatada em outros Estados produtores, incluindo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraíba (SPÓSITO et al., 2003; LOPES et al., 2009).

Os danos aos plantios comerciais de tangerineiras var. “Dancy”, var. “Ponkan” e o tangor “Murcott” são severos, inviabilizando, por muitas vezes, a manutenção dos pomares. A sintomatologia da doença pode ser visualizada em frutos e folhas tanto jovens quanto maduras. Em órgãos jovens a doença causa lesões marrons, pode causar queda precoce e seca de ramos e ponteiros (TIMMER et al., 1998; FERREIRA et al., 2016; AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). Em folhas e frutos amadurecidos a lesão de coloração marrom é circundada por um halo amarelo (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003).

O agente etiológico causador da mancha marrom de alternaria é *A. alternata* patótipo tangerina, o qual possui como característica morfológica, grandes conídios de cor marrom-escuro dotados de septos transversais e longitudinais dispostos em cadeias acropetais (ELLIS, 1971). A esporulação é estimulada por mudanças bruscas de umidade e impacto de gotas na superfície da folha. Além disso, os conídios podem ser disseminados pelo vento ou água, infectando outros órgãos da mesma planta ou de outras plantas suscetíveis presentes no pomar (FERREIRA et al., 2016; AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). O patógeno necessita de determinadas condições ambientais que favoreçam sua dispersão, temperaturas entre 20 e 30 °C e molhamento foliar por um período de 10 a 12 horas (FERREIRA et al., 2016), contudo a temperatura ótima para a infecção é 27°C (CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999).

Em condições ótimas e na presença de umidade os conídios iniciam a germinação e liberam, antes mesmo de penetrarem no tecido vegetal, a toxina hospedeiro-específica ACT, a qual causa a morte da célula antes mesmo da infecção, pois afeta a integridade da membrana plasmática, induzindo o vazamento de eletrólitos das células (KOHMOTO et al., 1993; WANG et al., 2020; AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). De acordo com o observado

por Solel; Kimchi (1998) o patógeno penetra de maneira direta, formando apressório, já segundo Akimitsu; Peever; Timmer (2003) a penetração ocorre através dos estômatos.

## 2.4 Controle químico da MMA

O manejo da mancha marrom de alternaria inclui várias práticas que devem ser adotadas a fim de evitar a entrada ou disseminação do fitopatógeno no pomar. Recomenda-se a utilização de mudas saudáveis, cultivares resistentes e a utilização de fungicidas para o controle da MMA, em épocas favoráveis à doença como, durante o início de brotações, florações e frutificação (FERREIRA et al., 2016). De acordo com Timmer et al. (2003), o número de pulverizações visando o controle da MMA pode chegar a 15, devido à isso, o custo de produção torna-se inviável, levando a erradicação de pomares (AZEVEDO et al., 2010).

Entre os grupos químicos recomendados para o controle da MMA estão os fungicidas protetores, a base de cobre (*Fungicide Resistance Action Committee* [FRAC] código M1), ditiocarbamatos (FRAC código M3), dicarboximidas (FRAC código 2), estrobilurinas (FRAC código 11), carboxamidas (FRAC código 7) e triazóis (FRAC código 3) (FRAC, 2018).

Os triazóis atuam como inibidores da demetilação (DMI) durante a formação do ergosterol (ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015). Os fungicidas DMI inibem a biossíntese de ergosterol, sendo essa molécula, presente na membrana plasmática, um importante componente para o crescimento fúngico (ZARN; BRÜSCHEWEILER; SCHLATTER, 2003). Devido a seu mecanismo de ação, os triazóis são recomendados na rotação com outros fungicidas (AVENOT et al., 2016).

As carboxamidas atuam nas mitocôndrias, no complexo II na cadeia de transporte de elétrons, como inibidoras da enzima succinato desidrogenase (SDHI), impedindo a oxidação do succinato a fumarato, em consequência não ocorre a formação de ATP, necessário para manutenção e desenvolvimento do fitopatógeno (FRAC, 2014). A boscalida atua na atividade de redução de quinino, isso é, de maneira e em local diferente das demais moléculas SDHI (AVENOT; MICHAILIDES, 2007; ZHANG et al., 2009). O complexo II está dividido em quatro subunidades proteicas (A, B, C e D), o local de atuação de SHDI compreende as subunidades B, C e D (FRAC, 2014; FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2017; HÄGERHÄLL, 1997).

As estrobilurinas atuam na respiração mitocondrial, mais especificamente como inibidoras da quinona oxidase (QoI) (BRENT; HOLLOMON, 2007). Ao se ligarem no sítio



Qo, as estrobilurinas impedem a transferência de elétrons entre o citocromo *b* e o citocromo *c* (BARTLETT et al., 2002). Essa interação ocorre no complexo III da cadeia de transporte de elétrons, em consequência não ocorre a síntese de ATP (FERNÁNDEZ-ORTUÑO, 2008; FRAC, 2012).

Entre os produtos registrados no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), para o controle de doenças em Citros encontram-se: três moléculas do grupo químico DMI, três moléculas do QoI e uma molécula de SDHI. As estrobilurinas totalizam 96 produtos registrados, os triazóis 50, e a carboxamida 10 produtos.

## 2.5 Resistência à SDHI, DMI e QoI

Segundo HE et al. (2019), os fungicidas DMI possuem um baixo risco de seleção de resistência. Contudo a resistência ou diminuição da sensibilidade a triazóis tem sido notificada em diversos fungos como, *Uncinula necator*, *Venturia inaequalis*, *Monilinia fructicola*, *Zymoseptoria tritici*, *Didymella bryoniae* (DÉLYE; LAIGRET; CORIO-COSTET, 1997; KÖLLER; WILCOX, 2001; LUO; SCHNABEL, 2008; MILGATE et al., 2016; THOMAS; LANGSTON JR; STEVENSON, 2012). A resistência a DMIs está ligada ao acúmulo de diversas substituições de códons em vários genes, também chamada de resistência quantitativa (HE et al., 2019).

Mutações no gene CYP51 tem sido relatada na literatura como relacionadas a diminuição da sensibilidade de *Parastagonospora nodorum*, *Zymoseptoria tritici*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* a fungicidas triazóis (PEREIRA, MCDONALD, BRUNNER, 2017; HEICK, JUSTESEN, JØRGENSEN, 2017; TUCKER et al., 2020).

Casos de resistência ou redução da sensibilidade à SDHI foram observados em *Botrytis cinerea*, *Didymella bryoniae*, *Alternaria alternata* (FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2017; THOMAS; LANGSTON JR; STEVENSON, 2012; AVENOT; MICHAILIDES, 2007; YANG; BRANNEN; SCHNABEL, 2014). As mutações relatadas na literatura como relacionadas à resistência à carboxamidas ocorrem em qualquer uma das três subunidades na qual o fungicida atua. Na subunidade B as mutações não sinônimas ocorrem na posição 277, na qual uma histidina pode ser mutada por uma tirosina ou arginina. Nas subunidades C e D as mutações mais frequentes são: H134R e D133R, nas quais uma histidina e um ácido aspártico, respectivamente, são mutados em arginina (AVENOT et al., 2008a; AVENOT;

SELLAM; MICHAILIDES, 2009; YANG; BRANNEN; SCHNABEL, 2014; FAN et al., 2015; MALANDRAKIS et al., 2018).

Resistências aos fungicidas QoI foram relatadas em *Pyricularia grisea*, *Alternaria alternata*, *Cercospora kikuchii*, *Plasmopara viticola*, *Venturia inaequalis* (VINCELLI; DIXON, 2002; VEGA; DEWDNEY, 2014; SAUTUA et al., 2020; SANTOS et al., 2020; GUR et al., 2021; CHITOLINA et al., 2021). A mutação pontual não sinônima que confere resistência a estrobilurinas, amplamente relatada na literatura, é caracterizada pela substituição de uma glicina por uma alanina na posição 134 no gene do citocromo *b* mitocondrial (GISI et al., 2002; FERNÁNDEZ-ORTUÑO, 2008; VEGA; DEWDNEY, 2014).

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Estudos a fim de subsidiar informações sobre a sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina são uma importante ferramenta no manejo da doença. Dados sobre a eficácia de moléculas para o controle da MMA são necessários para um correto manejo dos grupos químicos, de forma a possibilitar a manutenção da capacidade de controle do patógeno e a redução da pressão de seleção de indivíduos resistentes.

## REFERÊNCIAS

- AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 435, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00189.x>
- AKIMITSU, K.; TSUGE, T.; KODAMA, M.; YAMAMOTO, M.; OTANI, H. *Alternaria* host-selective toxins: determinant factors of plant disease. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 109, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0498-7>
- AVENOT, H. F.; MICHAILIDES, T. J. Resistance to Boscalid Fungicide in *Alternaria alternata* Isolates from Pistachio in California. **Plant Disease**, v. 91, p. 1345, 2007. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1345>
- AVENOT, H. F.; SELLAM, A.; KARAOGLANIDIS, G.; MICHAILIDES, T. J. Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. **Phytopathology**, v. 98, n. 6, p. 736-742, 2008a.
- AVENOT, H. F.; SOLORIO, C.; MORGAN, D. P.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity and cross-resistance patterns to demethylation-inhibiting fungicides in California populations of *Alternaria alternata* pathogenic on pistachio. **Crop Protection**, v. 88, p. 72, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.05.012>
- AVENOT, H.; SELLAM, A.; MICHAILIDES, T. Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. **Plant Pathology**, v. 58, n. 6, p. 1134-1143, 2009.
- AZEVEDO, F. A.; POLYDORO, D. A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K. C.; STUART, R. M.; COSTA, F. P.; PIO, R. M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação in vitro e in vivo de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, p.1-10, 2010.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ps.520>
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? 2 ed. rev. Bruxelas, Bélgica: **FRAC Monograph**, 2007.
- CANIHOS, Y.; ERKILIC A.; TIMMER, L. W. First report of *Alternaria* Brown Spot of Minneola Tangelo in Turkey. **Plant Disease**, v. 81, p. 1214, 1997. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.10.1214B>
- CANIHOS, Y.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Temperature, Leaf Wetness, and Isolate Effects on Infection of Minneola Tangelo Leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, v. 83, p. 429, 1999. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.429>
- CHITOLINA, G. M.; SILVA-JUNIOR, G. J.; FEICHTENBERGER, E.; PEREIRA, R. G.; AMORIM, L. Distribution of *Alternaria alternata* isolates with resistance to quinone outside

inhibitor (QoI) fungicides in Brazilian orchards of tangerines and their hybrids. **Crop Protection**, v. 141, p. 105493, 2021.

COBB, N. A. Letters on the diseases of plants – *Alternaria* of the citrus tribe. **Agricultural Gazette N.S.W.** v. 14, p. 955, 1903.

DÉLYE, C.; LAIGRET, F.; CORIO-COSTET, M. F. A mutation in the 14 alpha demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2966, 1997.

ELLIS, M. B. Dematiaceous hyphomycetes (1971).

FAN, Z.; YANG, J. H.; FAN, F.; LUO, C. X.; SCHNABEL, G. 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.

FERNANDEZ-ORTUÑO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; CHAMORRO, M.; DE LA PEÑA, E.; DE VICENTE, A.; TORÉS, J. A. Resistance to the SDHI Fungicides Boscalid, Fluopyram, Fluxapyroxad, and Penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from Commercial Strawberry Fields in Spain. **Plant Disease**, v. 101, p. 1306, 2017. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0067-RE>

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; TORÉS, J. A.; DE VICENTE, A.; & PÉREZ-GARCÍA, A. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2008.

FERREIRA, E. A.; MOREIRA, S. I.; PERINA, F. J.; ALVES, E. **Mancha-marrom-de-Alternaria em tangerineiras e seus híbridos: identificação e manejo**. EPAMIG. Circular Técnica, n. 244, p. 1–7, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 10 fevereiro 2021.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). Introduction and General Information. **WORKING GROUPS – SDHI Fungicides**. 2014. Disponível em: <<https://www.frac.info/working-group/sdhi-fungicides/introduction-and-general-information>>. Acesso em: 08/10/2019.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). **List of Plant Pathogenic Organisms Resistant to Disease Control Agents**. May, 2018. Disponível em: <[https://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-resistant-plant-pathogenic-organisms\\_may\\_2018.pdf?sfvrsn=a2454b9a\\_2&sfvrsn=a2454b9a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-resistant-plant-pathogenic-organisms_may_2018.pdf?sfvrsn=a2454b9a_2&sfvrsn=a2454b9a_2)>. Acesso em: 08/10/2019.

GISI, U.; SIEROTZKI, H.; COOK, A.; MCCAFFERY, A. 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.
- GUR, L.; LEVY, K.; FARBER, A.; FRENKEL, O.; REUVENI, M. Delayed Development of Resistance to QoI Fungicide in *Venturia inaequalis* in Israeli Apple Orchards and Improved Apple Scab Management Using Fungicide Mixtures. **Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 396, 2021.
- HÄGERHÄLL, C. Succinate: quinone oxidoreductases: Variations on a conserved theme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v. 1320, p. 107, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00019-4)
- HE, M. H.; WANG, Y. P.; WU, E. J.; SHEN, L. L.; YANG, L. N.; WANG, T.; SHANG, L. P.; ZHU, W.; ZHAN, J. Constraining Evolution of *Alternaria alternata* Resistance to a Demethylation Inhibitor (DMI) Fungicide Difenconazole. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01609
- HEICK, T. M.; JUSTESEN, A. F.; JØRGENSEN, L. N. Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicides in the Nordic-Baltic region-a status. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, n. 3, p. 669-682, 2017.
- HUANG, F.; FU, Y.; NIE, D.; STEWART, J. E.; PEEVER, L.; LI, H. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. **Fungal Biology**, v. 119, p. 320, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.09.006>
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal – PAM**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 01 Março 2021.
- 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, 1991.
- KOHMOTO, K.; ITOH, Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S.; NAKATSUKA, S. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathology** 83, no. 5 (1993): 495-502.
- KÖLLER, W.; WILCOX, W. F. Evidence for the predisposition of fungicide-resistant phenotypes of *Venturia inaequalis* to a preferential selection for resistance to other fungicides. **Phytopathology** v. 91, p. 776, 2001.
- LAWRENCE, D. P.; GANNIBAL, P. B.; PEEVER, T. L.; PRYOR, B. M. 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.

- LEACH, C. M.; ARAGAKI, M. Effects of temperature on conidium characteristics of *Ulocladium chartarum* and *Stemphylium floridanum*. **Mycologia**, v. 62, p. 1071, 1970.
- 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.
- LUO, C. X.; SCHNABEL, G. The cytochrome P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, p. 359, 2008. doi:10.1128/AEM.02159-07
- MALANDRAKIS, A. A.; APOSTOLIDOU, Z. A.; LOUKA, D.; MARKOGLOU, A.; FLOURI, F. Biological and molecular characterization of field isolates of *Alternaria alternata* with single or double resistance to respiratory complex II and III inhibitors. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, n. 1, p. 199-211, 2018.
- MILGATE, A.; ADORADA, D.; ORCHARD, B.; PATTEMORE, J. First report of resistance to DMI fungicides in Australian populations of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Disease notes**, v. 100, p. 522, 2016. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0704-PDN>
- PEEVER, T. L.; SU, G.; CARPENTER-BOGGS, L.; TIMMER, L. W. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, 96(1), 119-134 (2004).
- PEREIRA, D. A.; MCDONALD, B. A.; BRUNNER, P. C. Mutations in the CYP51 gene reduce DMI sensitivity in *Parastagonospora nodorum* populations in Europe and China. **Pest management Science**, v. 73, n. 7, p. 1503-1510, 2017.
- 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. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.6.750C>
- SANTOS, R. F.; FRAAIJE, B. A.; GARRIDO, L. D. R.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; AMORIM, L. Multiple resistance of *Plasmopara viticola* to QoI and CAA fungicides in Brazil. **Plant Pathol.** 2020; 69: 1708– 1720. <https://doi.org/10.1111/ppa.13254>
- SAUTUA, F. J.; DOYLE, V. P.; PRICE, P. P.; PORFIRI, A.; FERNANDEZ, P.; SCANDIANI, M. M.; CARMONA, M. A. Fungicide resistance in *Cercospora* species causing cercospora leaf blight and purple seed stain of soybean in Argentina. **Plant Pathol.** 2020; 69: 1678– 1694. <https://doi.org/10.1111/ppa.13261>
- SOLEL, Z. *Alternaria* brown spot on *Minneola* tangelos in Israel. **Plant Pathology**, v. 40, p. 145–147, 1991.
- SOLEL, Z.; KIMCHI, M. Histopathology of Infection of *Minneola* tangelo by *Alternaria alternata* pv. *dtri* and the Effect of Host and Environmental Factors on Lesion Development. **Journal of Phytopathology**, v. 146, n. 11-12, p. 557-561, 1998.
- SPÓSITO, M.B.; JÚNIOR, J.B.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T. Risco marrom. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, abril/maio, n.19, 2003.

- THOMAS, A.; LANGSTON JR, D. B.; STEVENSON, K. L. Baseline Sensitivity and Cross-Resistance to Succinate-Dehydrogenase-Inhibiting and Demethylation-Inhibiting Fungicides in *Didymella bryoniae*. **Plant Disease**, v. 96, p. 979, 2012. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-11-0744-RE>
- TIMMER, L. W.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T. R.; IBAÑEZ, A. M.; ZITKO, S. E. Environmental Factors Affecting Production, Release, and Field Populations of Conidia of *Alternaria alternata*, the Cause of Brown Spot of Citrus. **Phytopathology**, v. 88, p. 1218, 1998. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.11.1218>
- TIMMER, L.W.; PEEVER, T. L.; SOLEL, Z.; AKIMITSU, K. *Alternaria* diseases of citrus - Novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 42, n. 2, p. 99–112, 2003.
- TSUGE, T.; HARIMOTO, Y.; AKIMITSU, K.; OHTANI, K.; KODAMA, M.; AKAGI, Y.; EGUSA, M.; YAMAMOTO, M.; OTANI, H. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 44, 2013.
- TUCKER, M. A.; LOPEZ-RUIZ, F.; COOLS, H. J.; MULLINS, J. G.; JAYASENA, K.; OLIVER, R. P. Analysis of mutations in West Australian populations of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* CYP51 conferring resistance to DMI fungicides. **Pest management science**, v. 76, n. 4, p. 1265-1272, 2020.
- 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. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-13-0449-re>
- VICENT, A.; ARMENGOL, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ALFARO-LASSALA F. First report of *Alternaria* Brown Spot of Citrus in Spain. **Plant Disease**, v.84, p. 1044, 2000. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1044B>
- VINCELLI, P.; DIXON, E. Resistance to QoI (strobilurin-like) fungicides in isolates of *Pyricularia grisea* from perennial ryegrass. **Plant Disease**, v. 86, n. 3, p. 235-240, 2002.
- WANG, P. H.; WU, P.C.; HUANG, R.; CHUNG, K. R. The Role of a Nascent Polypeptide-Associated Complex Subunit Alpha in Siderophore Biosynthesis, Oxidative Stress Response, and Virulence in *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 33(4), pp.668-679, 2020.
- WANG, X. F.; LI, Z. A.; TANG, K. Z.; ZHOU, C. Y.; YI, L. First report of *Alternaria* Brown Spot of Citrus caused by *Alternaria alternata* in Yunnan Province, China. **Plant Disease**, v. 94, p. 375, 2010. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0375C>
- WHITESIDE, J. O. A newly recorded *Alternaria* induced Brown Spot disease on Dancy tangerines in Florida. **Plant Disease Reporter**, v. 60, p. 326, 1976.
- WOUTENBERG, J. H. C.; GROENEWALD, J. Z.; BINDER, M.; CROUS, P. W. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v. 75, n. May, p. 171–212, 2013. <https://doi.org/10.3114/sim0015>

YANG, J. H.; BRANNEN, P. M.; SCHNABEL, G. Resistance in *Alternaria alternata* to SDHI Fungicides Causes Rare Disease Outbreak in Peach Orchards. **Plant Disease**, v. 99, p. 65, 2014. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0387-RE>

ZARN, J. U.; BRÜSCHWEILER, B. J.; SCHLATTER, J. R. Azole Fungicides Affect Mammalian Steroidogenesis by Inhibiting Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase and Aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 255, 2003. <https://doi.org/10.1289/ehp.5785>

ZHANG, C. Q.; LIU, Y. H.; MA, X. Y.; FENG, G.; MA, Z. H. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight, to mepronil and boscalid. **Crop Protection**, v. 28, p. 381, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.12.004>

ZIOGAS, B. N.; MALANDRAKIS A. A. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs). In: Ishii H., Hollomon D. (eds) **Fungicide Resistance in Plant Pathogens**. Springer, Tokyo, 2015. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_13)

ZAMPRONIO, J. P., AZEVEDO, F. A., MILANEZE, T. F., ROMA, M. M., SCHINOR, E. H. Poda de inverno para o manejo da mancha marrom de alternária em tangor Murcott. VII **Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**. Campinas, São Paulo, 2013.



## CAPÍTULO 2

### **SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Alternaria alternata* À FUNGICIDAS SDHI, DMI e QoI**

#### **RESUMO**

A mancha marrom de alternaria é uma doença causada pelo fitopatógeno *Alternaria alternata* patótipo tangerina, que causa danos severos em pomares de tangerina e seus híbridos. No Brasil os relatos de ocorrência do patógeno são verificados desde 2001, sendo hoje a doença detectada em diversos Estados produtores. Objetivou-se nesse trabalho avaliar a sensibilidade de trinta isolados, identificados como *A. alternata*, por meio de análises morfológicas e teste de patogenicidade, de diferentes localidades. Estes foram avaliados quanto à sensibilidade à triazóis, estrobilurinas e carboxamida, além de possíveis custos adaptativos. Os isolados apresentam resistência aos fungicidas DMI e SDHI, com valores de  $EC_{50}$  entre  $4,47 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $27,22 \mu\text{g mL}^{-1}$  (difenoconazol),  $7,42 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $15,53 \mu\text{g mL}^{-1}$  (tebuconazol) e  $2,68 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $28,72 \mu\text{g mL}^{-1}$  (boscalida). Todos os isolados oriundos de Campanha-MG apresentam resistência a fungicidas QoI, sendo insensíveis tanto a azoxistrobina quanto a piraclostrobina com  $EC_{50}$  superiores a  $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Não foram observadas reduções na esporulação dos fenótipos de resistência a SDHI e DMI. O crescimento micelial dos isolados DMI resistente sofreram penalidades e indicam a possibilidade de custo adaptativo. Isolados SDHI resistentes apresentaram hipersensibilidade a stress oxidativo. A ocorrência de fenótipos de resistência a fungicidas triazóis, estrobilurinas e carboxamida nas áreas amostradas sugerem uma pressão de seleção a indivíduos resistentes.

**Palavras-chave:** Tangerina. Boscalida. Estrobilurina. Triazol.

## ABSTRACT

The brown spot of alternaria is the disease caused by the phytopathogen *Alternaria alternata* pathotype tangerine, the damage caused in tangerine orchards and hybrids is severe. In Brazil, reports of the occurrence of the pathogen have occurred since 2001, being subsequently detected in several producing states. The objective of this study was to evaluate the sensitivity of thirty isolates from different locations were identified as *A. alternata* by means of morphological analysis and pathogenicity test, they were evaluated for sensitivity to triazoles, strobilurins and carboxamide, in addition to possible adaptive costs. The isolates have resistance to fungicides DMI and SDHI, with  $EC_{50}$  values between  $4.47 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $27.22 \mu\text{g mL}^{-1}$  (difenoconazole),  $7.42 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $15.53 \mu\text{g mL}^{-1}$  (tebuconazole) and  $2.68 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $28.72 \mu\text{g mL}^{-1}$  (boscalide). All isolates from Campanha-MG are resistant to QoI fungicides, being insensitive to both azoxystrobin and pyraclostrobin with  $EC_{50}$  greater than  $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. No penalties were observed in the sporulation of SDHI and DMI resistance phenotypes. The mycelial growth of resistant DMI isolates suffered penalties and indicate the possibility of adaptive cost. Resistant SDHI isolates showed hypersensitivity to oxidative stress. The occurrence of resistance phenotypes to triazole, strobilurin and carboxamide fungicides in the sampled areas suggests a selection pressure on resistant individuals.

**Keywords:** Tangerine. Boscalida. Strobilurin. Triazole.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* é composto por grupos, como exemplos: laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck.), limões (*Citrus limon* L. Burmann f.) e tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), sendo as tangerinas e seus híbridos o segundo grupo de maior importância comercial (FERREIRA et al., 2016). Entre os híbridos de tangerinas estão os tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macfad) e tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis* (L.) Osb).

Segundo a FAO (2019), o Brasil é o sétimo maior produtor mundial de tangerina. A produção dessa fruta ocupa o segundo lugar de importância em relação a produção nacional de espécies cítricas, ficando atrás apenas da produção de Laranja. Segundo dados do IBGE (2019) o estado de Minas Gerais se destaca por ser o segundo maior produtor nacional, respondendo por aproximadamente 21% da produção brasileira.

Entre as doenças capazes de causar danos aos cultivos de tangerina, destaca-se a Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), cujo agente etiológico é o fungo *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl patótipo tangerina (PEEVER et al., 2004). Esse patógeno produz a toxina hospedeiro-específica ACT, dessa forma, sendo capaz de causar doença apenas em tangerineiras e seus híbridos. (TSUGE et al., 2013; AKIMITSU et al., 2014).

Entre os grupos químicos recomendados para o controle da MMA estão as carboxamidas (FRAC código 7), triazóis (FRAC código 3) e estrobilurinas (FRAC código 11) (FRAC, 2018). As carboxamidas atuam nas mitocôndrias, no complexo II na cadeia de transporte de elétrons, como inibidoras da enzima succinato desidrogenase (SDHI), impedindo a oxidação do succinato a fumarato (FRAC, 2014). Os triazóis, por sua vez, atuam como inibidores da demetilação (DMI) durante a formação do ergosterol (ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015). As estrobilurinas atuam como inibidoras da quinona oxidase (QoI), mais especificamente nas mitocôndrias, no complexo III da cadeia de transporte de elétrons (FRAC, 2012) Em consequência não ocorre a formação de ATP, necessário para manutenção e desenvolvimento do fitopatógeno.

Para fungicidas DMI mutações no gene CYP51 têm sido relatadas na literatura como relacionadas à diminuição da sensibilidade (PEREIRA, MCDONALD, BRUNNER, 2017; HEICK, JUSTESEN, JØRGENSEN, 2017; TUCKER et al., 2020). As mutações relatadas na literatura como relacionadas à resistência à fungicidas SDHI ocorrem em qualquer uma das três subunidades na qual ele atua. Na subunidade B ocorrem as mutações H277R e H277Y, já nas subunidades C e D as mutações mais frequentes são: H134R e D133R (AVENOT et al., 2008a; AVENOT; SELLAM; MICHAILIDES, 2009; YANG; BRANNEN; SCHNABEL,

2014; FAN et al., 2015; MALANDRAKIS et al., 2018). Já mutação associada a elevados níveis de resistência à QoI, amplamente relatada na literatura é a G134A no gene do citocromo b mitocondrial (GISI et al., 2002; FERNÁNDEZ-ORTUÑO, 2008; VEGA; DEWDNEY, 2014).

Até o presente estudo não há, disponível para conhecimento público, relato sobre a detecção de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina, coletados em pomares brasileiros, resistentes aos fungicidas SDHI e DMI. Além disso, até o presente, não há relato sobre a sensibilidade de isolados prospectados do município de Campanha-MG aos fungicidas QoI.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados

Isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina foram obtidos de folhas e frutos infectados de cultivares de tangerina Ponkan e Dancy e seus híbridos tangelo BRS Piemonte (*C. reticulata* x *C. paradisi* Macf.) e tangor Murcott (*C. sinensis* L. Osbeck x *C. reticulata* L. Blanco). Amostras foram coletadas no município de Campanha–Minas Gerais, delas obtiveram-se doze isolados. Além deles, foram utilizados oito isolados previamente obtidos em Perdões-MG e três isolados de Poços de Caldas-MG, os últimos cedidos pela Coleção Micológica de Lavras (CML). Isolados representantes das cidades Santa Adélia-SP, Monte Alto-SP, Sorocaba-SP, Araruama-RJ, Itaboraí-RJ e Silva Jardim-RJ foram cedidos pelo Professor Antônio de Góes da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) Campus Jaboticabal (Tabela 1).

Os isolamentos e obtenção das culturas monospóricas dos isolados do município de Campanha-MG foram realizados como descrito a seguir. Folhas e frutos infectados foram lavados em água corrente e secos em papel, fragmentos com cerca de 4 mm<sup>2</sup> foram retirados das folhas e casca dos frutos. O processo de desinfestação superficial consistiu em colocar os fragmentos por 30 segundos em álcool etílico 70%, seguido por 1 minuto em hipoclorito de sódio 2%, posteriormente foram lavados em água destilada esterilizada para retirada do excesso de hipoclorito, os fragmentos foram colocados em placa de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acrescido de Cloranfenicol e incubados a 25°C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Após o crescimento das colônias, discos de micélio foram cortados com um canudo plástico e retirados com palito de dente, ambos estéreis, os discos foram cultivados em placas de Petri com meio ágar-água a 25°C com fotoperíodo 24 h de escuro por 14 dias para induzir a produção de conídios. Uma alíquota de 5mL de água destilada esterilizada foi adicionada a placa e conídios foram desalojados com alça de Drigalski esterilizada, 1mL da suspensão foi pipetado e espalhado em placa de Petri contendo meio ágar-água e incubados a 25°C por 12 h. Um conídio germinado de cada isolado foi coletado e transferido para placa de Petri contendo meio BDA e incubado a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 5 dias para obtenção da cultura monospórica.

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

<b>Isolado</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>
PE1*	Tangerina Ponkan	Perdões, MG
PE2*	Tangerina Ponkan	Perdões, MG
PE4*	Tangerina Ponkan	Perdões, MG
PE9*	Tangerina Ponkan	Perdões, MG
PE13*	Tangerina Ponkan	Perdões, MG
PE14*	Tangerina Ponkan	Perdões, MG
PE15*	Tangerina Ponkan	Perdões, MG
PE16*	Tangerina Ponkan	Perdões, MG
13FR*	Tangerina Dancy	Araruama, RJ
6FR*	Tangerina Dancy	Silva Jardim, RJ
5FR*	Tangerina Dancy	Itaboraí, RJ
33M*	Mexerica	Monte Alto, SP
15M*	Tangor Murcott	Santa Adélia, SP
15HM*	Tangor Murcott	Santa Adélia, SP
CML44**	Tangerina Ponkan	Pouso Alegre, MG
CML45**	Tangerina Ponkan	Pouso Alegre, MG
CML46**	Tangerina Ponkan	Pouso Alegre, MG
MS*	Tangor Murcott	Sorocaba, SP
CP1	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP2	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP3	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP4	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP5	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP6	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP7	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP8	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP12	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP20	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP26	Tangerina Ponkan	Campanha, MG
CP27	Tangerina Ponkan	Campanha, MG

\* Isolados obtidos e descritos por Condé (2018). \*\* Isolados fornecidos pela Coleção Micológica de Lavras-CML.

Fonte: Do autor (2021).

### **2.1.1 Identificação e testes de patogenicidade dos isolados**

Com o objetivo de avaliar a macromorfologia das colônias, discos de cultura monospórica dos isolados foram colocados em placas de Petri com meio de cultivo BDA (Kasvi) a 25°C com fotoperíodo de 12 horas durante 7 dias. Depois foram observados aspectos como coloração e textura do micélio aéreo. Para avaliar a micromorfologia, discos de cultura monospórica foram cultivados em meio SNA (LESLIE; SUMMERELL, 2006) com pequenos pedaços de celofane esterilizado em sua superfície. As culturas foram incubadas em B.O.D. a 25 °C no escuro por 14 dias. Pedaços de celofane contendo esporulação do fungo foram posicionados em lâminas no microscópio de campo claro Zeiss Primo Star do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, para observação do tamanho, forma e coloração dos conídios.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada por meio da inoculação dos isolados em folhas destacadas de tangelo cv. BRS Piemonte, híbrido sensível a Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), e folhas de laranja Bahia, utilizadas como controle negativo. Discos miceliais de 5 mm foram repicados em placas de Petri contendo Ágar-água e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 24h de escuro por 14 dias para induzir a produção de conídios. Uma alíquota de 5mL de água destilada esterilizada foi adicionada a placa e conídios foram desalojados com alça de Drigalski esterilizada, o número de conídios foi avaliado utilizando câmara de Neubauer, as suspensões foram calibradas para a concentração de  $2 \times 10^4$  conídios por mL. As inoculações foram realizadas na face abaxial das folhas destacadas com cotonete embebido na suspensão, as folhas foram acondicionadas sobre folha de papel filtro em caixas Gerbox com pedaços de algodão embebido em água estéril para manutenção da umidade. Decorridas 72 horas após a inoculação, as folhas foram avaliadas quanto a presença de sintomas característicos da doença. Isolados de Campanha-MG que causaram sintomas apenas nas folhas de tangelo cv. BRS Piemonte foram considerados como pertencentes ao patótipo tangerina.

## 2.2 Avaliação *in vitro* da sensibilidade dos isolados

Testes *in vitro* para a avaliação da sensibilidade dos isolados à fungicidas DMI, SDHI e QoI para determinação da  $EC_{50}$  (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento micelial) foram realizados. Os isolados foram cultivados em meio BDA (Kasvi) acrescido de cloranfenicol e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias para a produção de inóculo. Os fungicidas Cantus<sup>®</sup> (Boscalida a 500 g kg<sup>-1</sup>; Basf), Folicur<sup>®</sup> (Tebuconazol a 200 g L<sup>-1</sup>; Bayer), Score<sup>®</sup> (Difenoconazol a 250 g L<sup>-1</sup>; Syngenta), Amistar WG<sup>®</sup> (Azoxistrobina a 500 g kg<sup>-1</sup>; Syngenta) e Comet<sup>®</sup> (Piraclostrobina a 250 g L<sup>-1</sup>; Basf) foram diluídos em água destilada para obterem-se soluções estoque de 1 g L<sup>-1</sup>.

Todos os experimentos descritos a seguir foram montados em delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com seis repetições. Os experimentos foram repetidos ao menos uma vez.

### 2.2.1 Avaliação *in vitro* da sensibilidade à fungicidas SDHI

Nesse experimento o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 6 repetições. As doses de 0 (controle); 5; 50; 100; 150; 300; 450 e 600 µg mL<sup>-1</sup> do fungicida Cantus<sup>®</sup> (boscalida) foram utilizadas para determinar a  $EC_{50}$  dos isolados. Para a montagem dos experimentos *in vitro* utilizou-se o meio de cultivo BDA e, aos mesmos foram acrescidos cloranfenicol e ácido salicilhidroxâmico (SHAM) a 0,05 mM. O SHAM foi adicionado ao meio de cultivo para suprimir a rota alternativa da respiração do fungo. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados de inóculos com 7 dias de crescimento e transferidos para placas contendo meio de cultivo BDA acrescido com as doses de cada tratamento. Em cada placa foram repicados quatro isolados. As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 6 dias.

De acordo com a sensibilidade a boscalida, os isolados de *A. alternata* foram separados em quatro classes, sendo elas: isolados sensíveis (S) quando os valores de  $EC_{50}$  variaram entre 0 e 1 µg mL<sup>-1</sup>, isolados com sensibilidade reduzida (SR) com valores de  $EC_{50}$  entre 1 e 15 µg mL<sup>-1</sup>, isolados com resistência intermediária (RI) quando os valores de  $EC_{50}$  variaram entre 15 e 100 µg mL<sup>-1</sup>, e isolados altamente resistentes (AR) quando os valores de  $EC_{50}$  foram superiores a 100 µg mL<sup>-1</sup> (MATIĆ et al., 2019; AVENOT; MORGAN; MICHAILIDES, 2008b).



### 2.2.2 Avaliação *in vitro* da sensibilidade à fungicidas DMI

Nesses experimentos o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 6 repetições. As doses de 0 (controle); 1; 10; 50; 100; 150 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do fungicida Folicur<sup>®</sup> (tebuconazol) e 0 (controle); 10; 25; 50; 100; 150 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do fungicida Score<sup>®</sup> (difenoconazol) foram utilizadas para determinar a  $EC_{50}$  dos isolados. Para a montagem dos experimentos *in vitro* utilizou-se o meio de cultivo BDA e, aos mesmos foi adicionado cloranfenicol a 0,05 mM. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados de inóculos com 7 dias de crescimento e transferidos para placas contendo meio de cultivo BDA acrescido com as doses de cada tratamento. Em cada placa foram repicados quatro isolados. As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 6 dias.

De acordo com os valores de  $EC_{50}$  e baseado nas escalas de Edgington; Khew; Barron (1971); Tavares; Souza (2005) os isolados foram classificados em 4 classes de sensibilidade aos fungicidas, a saber:  $EC_{50} < 1 \mu\text{g mL}^{-1}$  - alta sensibilidade (AS);  $EC_{50} > 1$  e  $< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$  - moderada sensibilidade (MS);  $EC_{50} > 10$  e  $< 50 \mu\text{g mL}^{-1}$  - baixa sensibilidade (BS);  $EC_{50} > 50 \mu\text{g mL}^{-1}$  - insensibilidade (I).

### 2.2.3 Avaliação *in vitro* da sensibilidade à fungicidas QoI

Nesse experimento o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 6 repetições. As doses de 0 (controle); 100; 200; 400; 800; 1200 e 1600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do fungicida Amistar WG<sup>®</sup> (azoxistrobina) e 0 (controle); 1; 10; 40; 80; 100 e 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do fungicida Comet<sup>®</sup> (piraclostrobina) foram utilizadas para determinar a  $EC_{50}$  dos isolados. Para a montagem dos experimentos *in vitro* utilizou-se o meio de cultivo BDA e, ao mesmo foram acrescidos cloranfenicol e ácido salicilhidroxâmico (SHAM) a 0,05 mM. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados de inóculos com 7 dias de crescimento e transferidos para placas contendo meio de cultivo BDA acrescido com as doses de cada tratamento. Em cada placa foram repicados quatro isolados. As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 6 dias.

## 2.3 AVALIAÇÃO DO CUSTO ADAPTATIVO

Os isolados com fenótipos de resistência e sensibilidade aos fungicidas foram selecionados de acordo com os resultados de  $EC_{50}$ . Dessa forma, foram selecionados quatro isolados compreendendo dois SDHI-resistentes e dois SDHI-sensíveis à Cantus<sup>®</sup>; cinco isolados compreendendo dois DMI-resistentes e um DMI-sensível à Folicur<sup>®</sup> e dois isolados compreendendo DMI-resistentes e um DMI-sensível à Score<sup>®</sup>.

Os parâmetros avaliados quanto ao custo adaptativo foram: crescimento micelial, esporulação *in vitro*, stress oxidativo e *stress* osmótico. Todos os experimentos descritos a seguir foram montados em delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com quatro repetições por isolado. Os experimentos foram repetidos ao menos uma vez.

### 2.3.1 Crescimento micelial

Para montagem do experimento de crescimento micelial, discos de micélio de cada um dos isolados foram transferidos para meio BDA e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias.

### 2.3.2 Esporulação *in vitro*

Para a avaliação da produção de conídios os isolados foram cultivados em meio de cultivo Ágar-água e incubados a 25 °C no escuro por 14 dias. Decorrido esse tempo, 5 mL de água destilada estéril foi adicionada em cada placa e, com uma alça de Drigalski os conídios foram desalojados da placa, logo em seguida a solução obtida foi acondicionada em béqueres. A quantificação dos conídios foi realizada utilizando câmara de Neubauer.

### 2.3.3 Sensibilidade osmótica (SOS) e Sensibilidade oxidativa (SOX)

O herbicida Gramoxone 200<sup>®</sup> (Paraquate a 200 g L<sup>-1</sup>; Syngenta) foi utilizado como indicador de stress oxidativo. Para a montagem dos experimentos *in vitro* utilizou-se o meio de cultivo BDA e Gramoxone 200<sup>®</sup> nas doses de: 0 (controle); 50; 100 e 200 µg mL<sup>-1</sup>. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados de colônias com 7 dias de crescimento e

transferidos para placas contendo meio de cultivo BDA acrescido com as doses de cada tratamento. Em cada placa foram repicados quatro isolados. As placas foram incubadas a 25 °C no escuro por 5 dias.

O Cloreto de Sódio (NaCl) foi utilizado como indicador de stress osmótico. Para a montagem dos experimentos *in vitro* utilizou-se o meio de cultivo BDA e NaCl nas doses de: 0 (controle); 4 e 8 µg mL<sup>-1</sup>. Discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados de inóculos com 7 dias de crescimento e transferidos para placas contendo meio de cultivo BDA acrescido com as doses de cada tratamento. Em cada placa foram repicados quatro isolados. As placas foram incubadas a 25 °C no escuro por 5 dias.

### 3 VARIÁVEIS ANALISADAS

Para a avaliação da sensibilidade *in vitro* dos isolados à fungicidas, os diâmetros da colônia foram obtidos com um paquímetro digital e deles foi subtraído o tamanho do disco de micélio original (5 mm). Esses valores de crescimento micelial foram convertidos em crescimento relativo (CR), por meio da seguinte fórmula:

$$CR = \left( \frac{MDC}{MDT} \right) * 100$$

Sendo:

CR: crescimento relativo, em porcentagem;

MDC: média do diâmetro do controle;

MDT: média do diâmetro do tratamento.

Após a conversão do crescimento micelial em CR, determinou-se as EC<sub>50</sub> por meio de regressões não lineares do CR pelo *log* das doses dos fungicidas usando o software ED50plus v1.0 (Vargas, 2000).

Nos testes de SOX e SOS, os valores de crescimento micelial também foram convertidos em CR.

O crescimento micelial foi avaliado aos 5 dias após incubação. Foram determinados os diâmetros da colônia em duas direções perpendiculares com um paquímetro digital e deles foi subtraído o tamanho do disco de micélio original (5 mm). Utilizou-se a média dos valores obtidos nas duas direções para determinar o crescimento micelial de cada isolado.

Nos experimentos de esporulação *in vitro* foi quantificado o número de conídios.

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis analisadas em cada experimento foram submetidas ao teste de ShapiroWilk ( $p > 0,05$ ) para verificar a normalidade dos dados.

Atendida a normalidade, os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F  $p \leq 0,05$ ) e quando significativo, as variáveis qualitativas foram comparadas por Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Quando não atendido o pressuposto da normalidade, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Realizou-se a análise conjunta dos experimentos repetidos no tempo para verificar se houve diferença entre os mesmos.

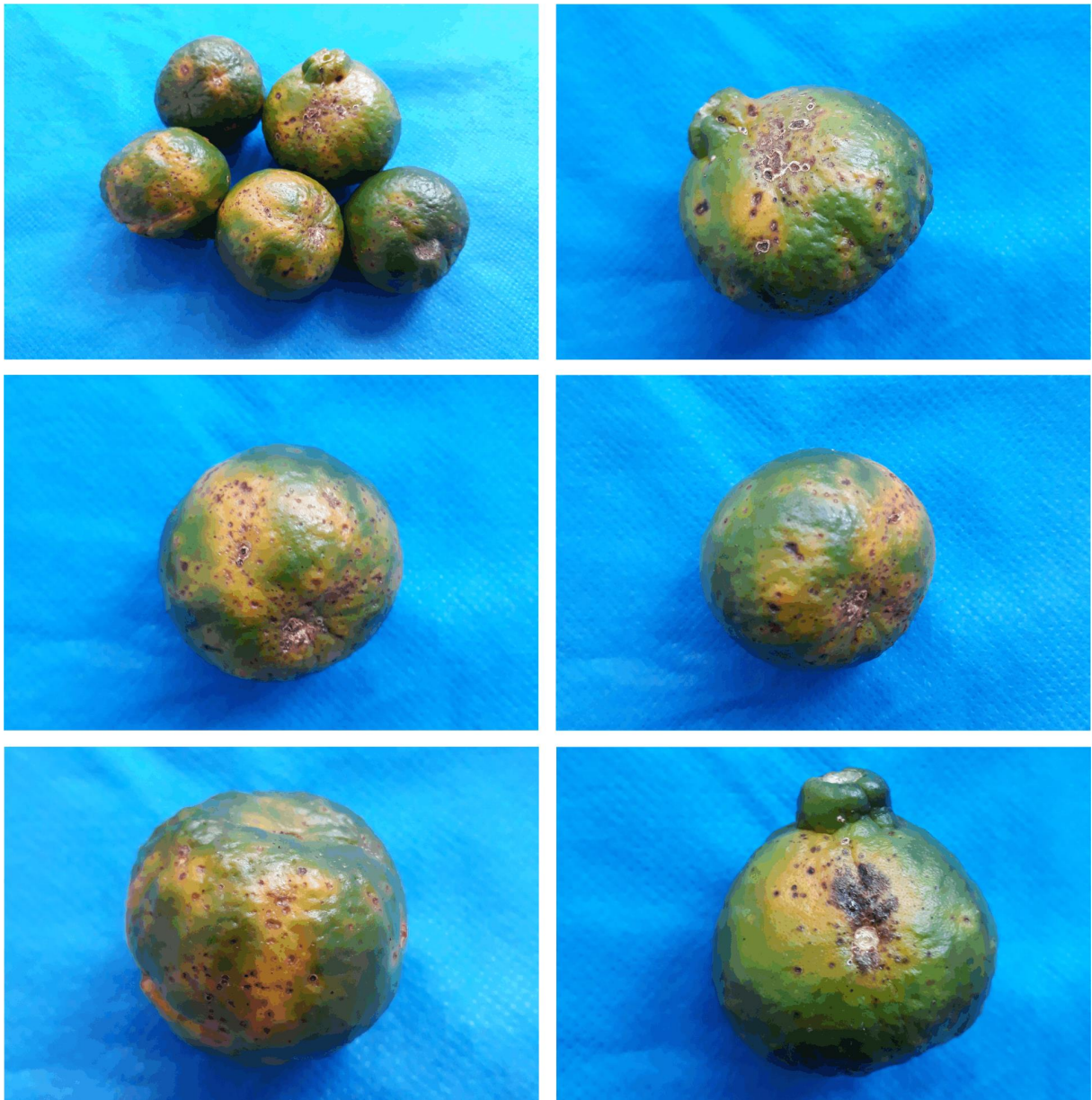
Para todas as análises foi utilizado o software R Core Team (2021).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação dos isolados e teste de patogenicidade

As colônias obtidas dos isolamentos dos materiais vegetais de Campanha-MG (Figura 1) apresentam características condizentes com o gênero *Alternaria*.

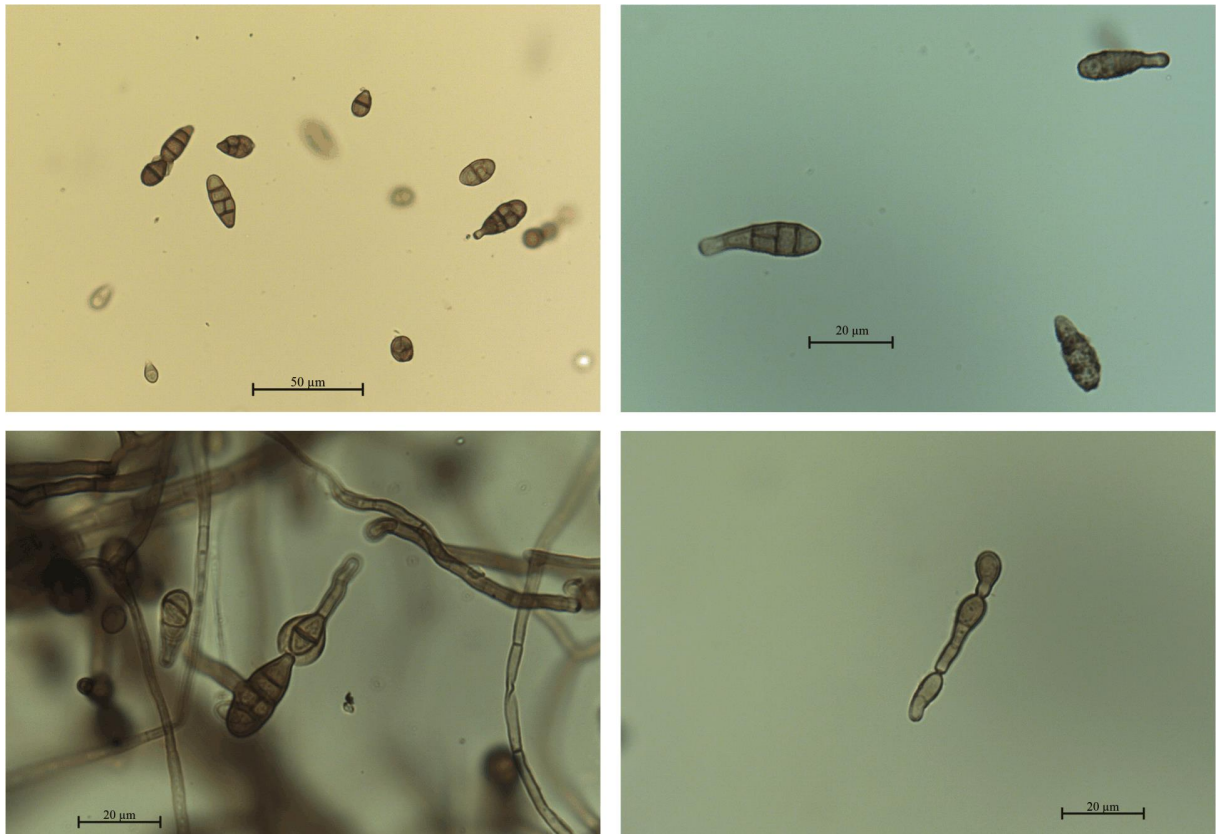
**Figura 1** - Frutos sintomáticos obtidos no município de Campanha-MG.



Fonte: Do autor (2021).

A identidade foi confirmada por meio da micromorfologia e macromorfologia das colônias. Na micromorfologia foi possível observar conídios pigmentados, fragmosporos e dictiosporos, com formato variando entre conídios ovóides à elipsóides, de tamanho pequeno à médio (Figura 2).

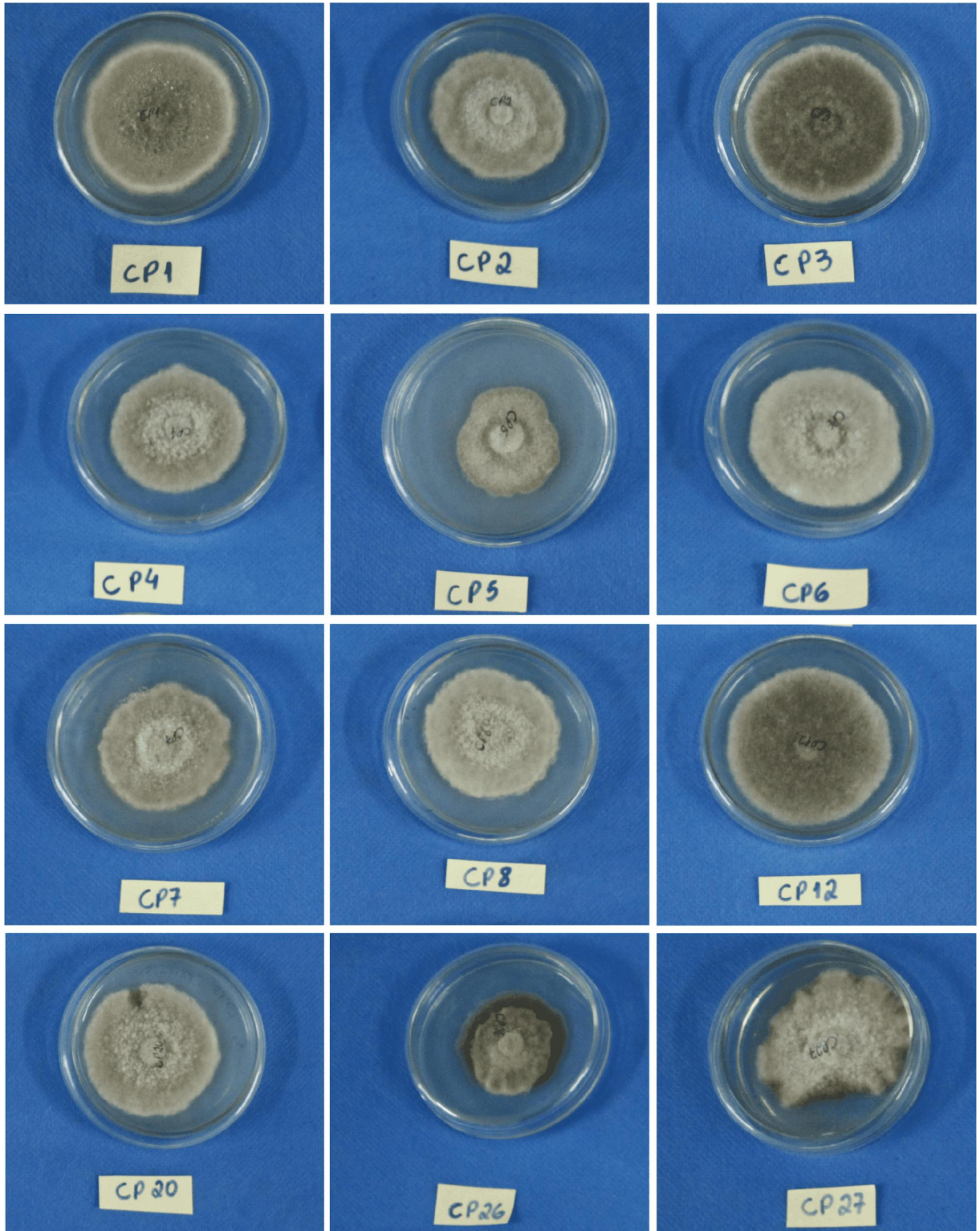
**Figura 2** - Conídios de *Alternaria alternata* de tangerina.



Fonte: Do autor (2021).

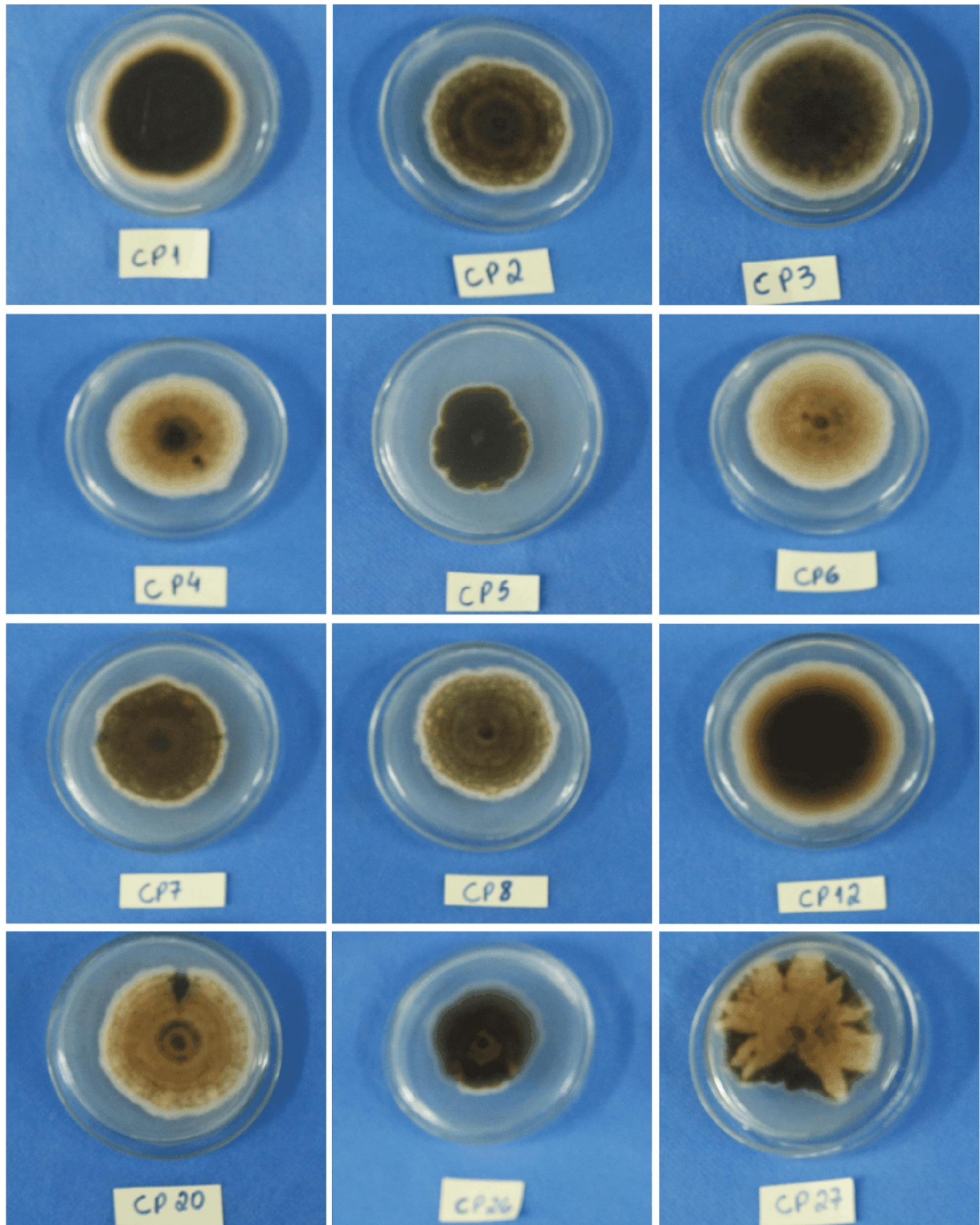
Já na macromorfologia observou-se formação de micélio aéreo abundante de coloração branca, acinzentado-claro à acinzentado-escuro (Figura 3) com reverso variando de marrom-claro à marrom-escuro com bordas brancas (Figura 4). Essas características estão em concordância com o que foi descrito em trabalhos anteriores (ELLIS, 1993; LAWRENCE et al., 2013; WOUDEBERG et al., 2015).

**Figura 3** - Placas de isolados de *Alternaria alternata* obtidos de tangerinas de Campanha-MG.



Fonte: Do autor (2021).

**Figura 4** – Reverso das placas de isolados *Alternaria alternata* obtidos de tangerinas de Campanha-MG.



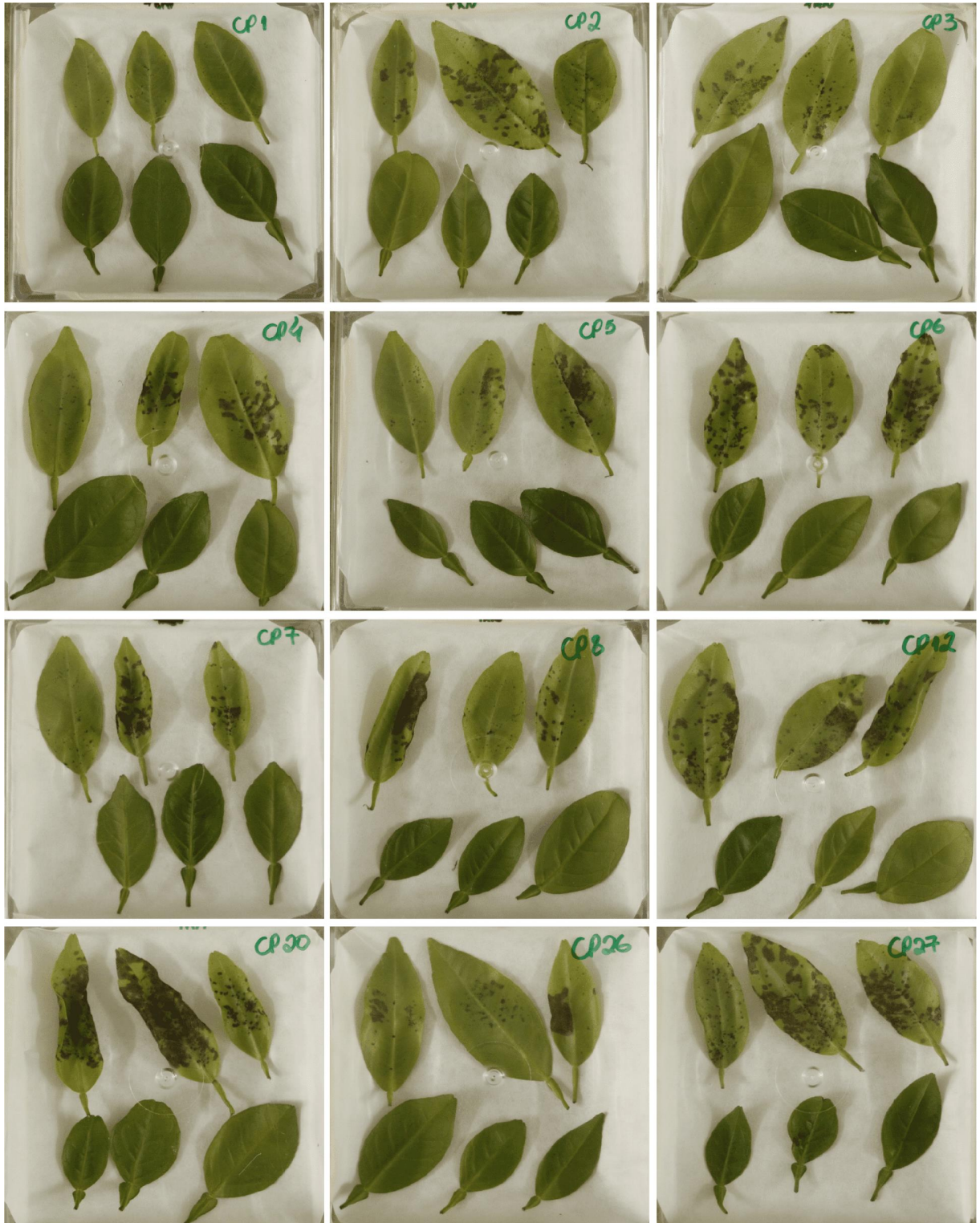
Fonte: Do autor (2021).

A patogenicidade dos isolados de Campanha-MG foi confirmada. Decorridas 72 horas após a inoculação observou-se sintomas em folhas de tangelo cv. BRS Piemonte. Em



contrapartida, nas folhas de laranja cv. Bahia não ocorreu reprodução de sintomas (Figura 5). Os demais isolados utilizados nesse estudo foram identificados e caracterizados em trabalho anterior realizado por Condé (2018).

**Figura 5** - Teste de patogenicidade dos isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina prospectados de Campanha-MG.



Fonte: Do autor (2021).

## 5.2 Caracterização *in vitro* da sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina

Não houve diferença significativa entre os experimentos repetidos no tempo para as variáveis analisadas ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, utilizou-se a média dos valores desses experimentos.

### 5.2.1 Avaliação *in vitro* da sensibilidade à fungicidas SDHI

Os valores de  $EC_{50}$  para a boscalida variaram entre  $2,68 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $28,72 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 2).

**Tabela 2** - Valores médios da concentração efetiva que inibe o crescimento micelial em 50% ( $EC_{50}$ ) para boscalida em isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina.

Isolado	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Sensibilidade*
PE1	3,70 l	SR
PE2	19,57 b	RI
PE4	19,80 b	RI
PE9	4,31 k	SR
PE13	2,68 m	SR
PE14	11,71 e	SR
PE15	4,65 k	SR
PE16	9,73 g	SR
13FR	9,59 g	SR
6FR	3,19 m	SR
5FR	4,43 k	SR
33M	6,06 i	SR
15M	6,27 i	SR
15HM	7,35 h	SR
CML44	7,63 h	SR
CML45	7,88 h	SR
CML46	7,13 h	SR
MS	3,72 l	SR
CP1	28,55 a	RI
CP2	10,61 f	SR
CP3	28,72 a	RI
CP4	19,67 b	RI
CP5	5,91 i	SR
CP6	5,29 j	SR
CP7	10,72 f	SR
CP8	9,35 g	SR
CP12	12,19 e	SR

CP20	10,40 f	SR
CP26	16,83 c	RI
CP27	12,92 d	SR
<b>Média</b>	<b>10,35</b>	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). \* Isolados sensíveis (S), isolados com sensibilidade reduzida (SR), isolados com resistência intermediária (RI), e isolados altamente resistentes (AR), baseado nas classes propostas por Matic et al. (2019); Avenot; Morgan; Michailides (2008b).

Fonte: Do autor (2021).

### 5.2.2 Avaliação *in vitro* da sensibilidade à fungicidas DMI

Os valores de  $EC_{50}$  para o difenoconazol variaram entre  $4,47 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $27,22 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 3).

**Tabela 3** - Valores médios da concentração efetiva que inibe o crescimento micelial em 50% ( $EC_{50}$ ) para difenoconazol e tebuconazol em isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina.

Isolado	Difenoconazol		Tebuconazol	
	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Sensibilidade *	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Sensibilidade *
PE1	6,85 i	MS	11,25 e	BS
PE2	12,26 d	BS	14,07 b	BS
PE4	11,07 e	BS	10,83 e	BS
PE9	11,10 e	BS	11,70 d	BS
PE13	27,22 a	BS	11,25 e	BS
PE14	13,98 b	BS	15,53 a	BS
PE15	8,90 g	MS	11,91 d	BS
PE16	14,41 b	BS	12,48 c	BS
13FR	11,15 e	BS	12,08 d	BS
6FR	5,75 j	MS	9,72 f	MS
5FR	7,66 h	MS	14,92 a	BS
33M	12,20 d	BS	11,33 e	BS
15M	5,54 j	MS	8,38 g	MS
15HM	4,47 k	MS	7,42 h	MS
CML44	8,27 g	MS	11,03 e	BS
CML45	12,85 c	BS	11,41 e	BS
CML46	6,97 i	MS	11,84 d	BS
MS	11,07 e	BS	12,74 c	BS
CP1	8,48 g	MS	11,64 d	BS
CP2	11,58 e	BS	12,13 d	BS
CP3	8,85 g	MS	12,09 d	BS
CP4	12,47 d	BS	12,82 c	BS
CP5	12,88 c	BS	14,48 b	BS
CP6	11,02 e	BS	10,57 e	BS
CP7	8,56 g	MS	12,51 c	BS
CP8	13,81 b	BS	11,23 e	BS

CP12	10,42 f	BS	10,70 e	BS
CP20	11,14 e	BS	11,76 d	BS
CP26	11,37 e	BS	11,73 d	BS
CP27	9,95 f	MS	12,66 c	BS
<b>Média</b>	10,74		11,81	

Legenda: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). \*Alta sensibilidade (AS), Moderada sensibilidade (MS), Baixa sensibilidade (BS), Insensível (I), baseado nas escalas de Edgington; Khew; Barron (1971); Tavares; Souza (2005).

Fonte: Do autor (2021).

### 5.2.3 Avaliação *in vitro* da sensibilidade à fungicidas QoI

Os isolados foram insensíveis à presença da azoxistrobina, com valores de  $EC_{50}$  superiores à  $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ , os valores de  $EC_{50}$  observados para piraclostrobina, com exceção do isolado CP5, foram superiores à  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 4).

**Tabela 4** - Valores médios da concentração efetiva que inibe o crescimento micelial em 50% ( $EC_{50}$ ) para azoxistrobina e piraclostrobina em isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina.

Isolado	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	Azoxistrobina	Piraclostrobina
CML44	> 1600	> 120
CML45	> 1600	> 120
CML46	> 1600	> 120
CP1	> 1600	> 120
CP2	> 1600	> 120
CP3	> 1600	> 120
CP4	> 1600	> 120
CP5	> 1600	43,61
CP6	> 1600	> 120
CP7	> 1600	> 120
CP8	> 1600	> 120
CP12	> 1600	> 120
CP20	> 1600	> 120
CP26	> 1600	> 120
CP27	> 1600	> 120
<b>Média</b>	-	-

Fonte: Do autor (2021).

### 5.3 Avaliação do custo adaptativo

#### 5.3.1 Crescimento micelial

Quando comparados os fenótipos de resistência e sensibilidade à SDHI, os isolados CP1 e 6FR apresentaram a maior média de crescimento micelial, diferindo-se significativamente ( $p < 0,05$ ) dos isolados CP3 e PE13, tais isolados também diferiram entre si (Tabela 5). Já para os fenótipos de resistência e sensibilidade à DMI, o isolado 15HM apresentou maior média diferindo-se significativamente ( $p < 0,05$ ) dos isolados PE14 e 5FR (para tebuconazol) e PE13 (para difenoconazol) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Tabela comparativa do crescimento micelial dos isolados representativos SDHI resistentes e SDHI sensíveis; DMI resistente e DMI sensíveis de *Alternaria alternata* patótipo tangerina.

Isolado	Crescimento micelial (mm) após 5 dias		
	Boscalida	Tebuconazol	Difenoconazol
<b>Resistente</b>			
CP1	49,16 a <sup>1</sup>	-	-
CP3	47,13 b	-	-
PE14	-	38,54 b	-
5FR	-	42,72 b	-
PE13	-	-	39,23 b
<b>Sensível</b>			
6FR	50,69 a	-	-
PE13	39,23 c	-	-
15HM	-	58,69 a	58,69 a

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor (2021).

#### 5.3.2 Esporulação

Os dados de esporulação para tebuconazol e difenoconazol possuem uma alta frequência de valores iguais, como consequência ocorre o afastamento dos pressupostos da ANAVA mesmo aplicando transformação, não possibilitando a realização de teste de média. Devido a isso os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Quando comparados os fenótipos de resistência e sensibilidade à SDHI, o isolado CP1 apresentou a maior média de esporulação diferindo-se significativamente dos demais isolados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6), para os fenótipos de resistência e sensibilidade à tebuconazol, o isolado PE14 foi diferente ( $p < 0,05$ ) dos isolados 15HM e 5FR. Para difenoconazol foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre os isolados PE13 e 15HM (Tabela 6).

**Tabela 6** - Tabela comparativa da esporulação dos isolados representativos SDHI resistentes e SDHI sensíveis; DMI resistente e DMI sensíveis de *Alternaria alternata* patótipo tangerina.

Isolado	Esporulação (conídios mL <sup>-1</sup> )		
	Boscalida	Tebuconazol*	Difenoconazol*
<b>Resistente</b>			
CP1	36,59 x 10 <sup>4</sup> a <sup>1</sup>	-	-
CP3	26,50 x 10 <sup>4</sup> b	-	-
PE14	-	1,6 x 10 <sup>5</sup> a	-
5FR	-	0 x 10 <sup>5</sup> b	-
PE13	-	-	1,62 x 10 <sup>4</sup> a
<b>Sensível</b>			
6FR	0,37 x 10 <sup>4</sup> d	-	-
PE13	1,68 x 10 <sup>4</sup> c	-	-
15HM	-	0 x 10 <sup>5</sup> b	0 x 10 <sup>5</sup> b

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). \*Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Dunn's, a 5% de probabilidade. As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as medianas.

Fonte: Do autor (2021).

### 5.3.3 Sensibilidade osmótica (SOS) e Sensibilidade oxidativa (SOX)

Hipersensibilidade ao stress osmótico foi observada nos isolados com fenótipo de resistência à boscalida quando comparados aos sensíveis na dose de 4% ( $p < 0,05$ ) (Tabela 7), os isolados com fenótipo de resistência a tebuconazol e difenoconazol sofreram penalidades (Tabelas 8 e 9), apresentando redução ( $p < 0,05$ ) no crescimento relativo (CR) quando comparados com os fenótipos sensíveis.

Em relação à sensibilidade oxidativa, os isolados com fenótipo de resistência a boscalida apresentaram CR inferior ( $p < 0,05$ ) em todas as doses quando comparados aos isolados sensíveis (Tabela 7), por outro lado, não foram observadas diferenças entre os

isolados com fenótipo de resistência e sensibilidade a tebuconazol e difenoconazol ( $p < 0,05$ ) (Tabelas 8 e 9).

**Tabela 7** - Tabela comparativa da SOS e SOX dos isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina dos fenótipos de resistência e sensibilidade à SDHI.

Isolado	Crescimento relativo (%)				
	Sensibilidade Osmótica (NaCl)		Sensibilidade Oxidativa (Paraquate)		
	4%	8%	50 ppm	100 ppm	200 ppm
<b>Boscalida Resistente</b>					
CP1	51,54 d <sup>1</sup>	48,28 a	85,64 b	62,93 d	31,90 c
CP3	53,51 c	35,49 c	83,96 c	73,81 b	42,88 b
<b>Boscalida Sensível</b>					
6FR	61,56 b	42,08 b	82,02 d	65,34 c	31,92 c
PE13	84,64 a	31,08 d	92,82 a	78,88 a	56,07 a
CV (%)	1,71	2,4	0,59	0,70	0,99

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor (2021).

**Tabela 8** - Tabela comparativa da SOS e SOX dos isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina dos fenótipos de resistência e sensibilidade à DMI (Tebuconazol).

Isolado	Crescimento relativo (%)				
	Sensibilidade Osmótica (NaCl)		Sensibilidade Oxidativa (Paraquate)		
	4%	8%	50 ppm	100 ppm	200 ppm
<b>Tebuconazol Resistente</b>					
PE14	49,26 b <sup>1</sup>	40,56 b	85,53 a	75,82 a	69,23 a
5FR	32,81 c	32,34 c	82,78 b	62,07 b	33,86 b
<b>Tebuconazol Sensível</b>					
15HM	75,97 a	41,51 a	76,95 c	54,67 c	22,98 c
CV (%)	0,99	0,74	0,46	0,89	1,11

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor (2021).



**Tabela 9** - Tabela comparativa da SOS e SOX dos isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina dos fenótipos de resistência e sensibilidade à DMI (Difenoconazol).

Isolado	Crescimento relativo (%)				
	Sensibilidade Osmótica (NaCl)		Sensibilidade Oxidativa (Paraquate)		
	4%	8%	50 ppm	100 ppm	200 ppm
<b>Difenoconazol Resistente</b>					
PE13	84,64 a	31,08 b	92,82 a	78,88 a	56,07 a
<b>Difenoconazol Sensível</b>					
15HM	75,97 b	41,51 a	76,95 b	54,67 b	22,98 b
CV (%)	1,12	1,59	0,54	0,83	1,36

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor (2021).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização *in vitro* da sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina

#### 6.1.1 Avaliação *in vitro* da sensibilidade à fungicidas SDHI

Os valores de  $EC_{50}$  para a boscalida variaram entre  $2,68 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $28,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em contrapartida, Vega e Dewdney (2015) em estudo com isolados de *Alternaria alternata* proveniente de plantas de citros observaram valores de  $EC_{50}$  entre  $0,07 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $5,84 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Já Avenot et al. (2014) em estudo com isolados *A. alternata* obtidos de plantas de pistache sem histórico de pulverização com fungicidas SDHI, descreveram valores de  $EC_{50}$   $2,184 \mu\text{g mL}^{-1}$  à  $4,357 \mu\text{g mL}^{-1}$  em isolados com sensibilidade reduzida. Já em áreas com histórico de aplicação de fungicidas SDHI os autores observaram valores de  $EC_{50} >100 \text{ mL}^{-1}$  para isolados de resistência alta. Matic' et al. (2019) observaram resultado semelhante em estudo com isolados de *Alternaria* spp. obtidos de hortaliças, com valores de  $EC_{50}$  entre  $4,51 \mu\text{g mL}^{-1}$  para isolados com sensibilidade reduzida e  $34,32 \mu\text{g mL}^{-1}$  para isolados com resistência intermediária.

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, é possível levantar duas hipóteses: a de que apesar de moléculas de SDHI não serem registradas no Brasil para esse patossistema, fungicidas do grupo químico das carboxamidas estão sendo utilizados à campo em pomares de tangerina. A outra hipótese diz respeito à existência de indivíduos resistentes na população mesmo antes dessa ser exposta ao fungicida.

De acordo com os valores de  $EC_{50}$  observados e as classes propostas por Matic' et al. (2019); Avenot; Morgan; Michailides (2008b) pode-se inferir que entre os isolados utilizados no presente estudo não se tem isolados sensíveis (S), mas sim isolados com sensibilidade reduzida (SR) e resistência intermediária (RI).

#### 6.1.2 Avaliação *in vitro* da sensibilidade à fungicidas DMI

Os valores de  $EC_{50}$  para o difenoconazol variaram entre  $4,47 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $27,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em contrapartida, Ishii et al. (2021) observaram valores de  $EC_{50}$  entre  $1,880 \text{ mg L}^{-1}$  e  $>10 \text{ mg L}^{-1}$  em estudo com isolados resistentes de *Cercospora beticola*. Reuveni e Sheglov (2002)

observaram o valor médio de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em experimentos de germinação e 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em experimento de crescimento micelial com isolados de *A. alternata* obtidos de macieiras.

Para tebuconazol, os valores de  $\text{EC}_{50}$  variaram entre 7,42  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 15,53  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 3). Em áreas com histórico de aplicação de fungicida Ishii et al. (2021) observaram valores de  $\text{EC}_{50}$  entre 1,243  $\text{mg L}^{-1}$  à 2,675  $\text{mg L}^{-1}$  para isolados de *A. alternata*. Já Avenot et al. (2016) observaram em isolados de *A. alternata* provenientes de plantas de pistache valores de  $\text{EC}_{50}$  entre 0,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 2,99  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kayamori et al. (2021) verificaram valores médios de  $\text{EC}_{50}$  de 5,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em isolados de *Cercospora beticola*. Em isolados de *Colletotrichum truncatum* Zang et al. (2017) descreveram valor de  $\text{EC}_{50} > 40 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Com base nos valores obtidos para os fungicidas difenoconazol e tebuconazol e as escalas de Edgington; Khew; Barron (1971); Tavares; Souza (2005) pode-se inferir que entre os isolados utilizados no presente estudo não se tem isolados altamente sensíveis, mas sim isolados com sensibilidade moderada e baixa.

### 6.1.3 Avaliação *in vitro* da sensibilidade à fungicidas QoI

No presente estudo todos os isolados foram insensíveis à presença da azoxistrobina, com valores de  $\text{EC}_{50}$  superiores à 1600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , esse valor é duas vezes a dose de ingrediente ativo presente na dose recomendada do produto. Em contrapartida, Vega et al. (2012) descreveram valores de  $\text{EC}_{50}$  superiores a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para azoxistrobina, já Chitolina et al. (2021) observaram  $\text{EC}_{50}$  superiores a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em isolados de *A. alternata* patótipo tangerina. Em isolados de *A. alternata* obtidos de plantas de pistache foram observados valores de  $\text{EC}_{50}$  superiores a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para azoxistrobina (KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILEDIS, 2011a).

Mondal et al. (2005) descreveram a dose discriminatória de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para piraclostrobina em isolados de *A. alternata* patótipo tangerina, já os valores de  $\text{EC}_{50}$  observados nesse trabalho, com exceção do isolado CP5, foram superiores à 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Chitolina et al. (2021) observaram  $\text{EC}_{50}$  superiores a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para piraclostrobina.

## 6.2 Avaliação do custo adaptativo

### 6.2.1 Crescimento micelial

O fenótipo de resistência à SDHI não sofreu redução de crescimento micelial em BDA, concordando com o observado por Fan et al. (2015) e Avenot, Sellam e Michailides (2016) em isolados de *A. alternata* e Chen et al. (2021) em isolados de *Fusarium asiaticum*. Esse resultado indica que o isolado com fenótipo de resistência pode competir de forma efetiva com isolados com fenótipo de sensibilidade. Por outro lado os fenótipos de resistência à DMI sofreram redução no crescimento micelial, resultado semelhante foi observado por Karaoglanidis et al. (2011b) em isolados de *Penicillium expansum*, já Malandrakis et al. (2015) não observaram penalidades em isolados de *A. alternata*. He et al. (2019) hipotetiza que as penalidades que acometem isolados resistentes a DMI diminuem a frequência dos mesmos em populações.

### 6.2.2 Esporulação

O isolado CP1 apresentou a maior média de esporulação ( $p < 0,05$ ), em concordância, Malandrakis et al. (2018) observaram que isolados resistentes de *A. alternata* exibiram maior esporulação quando comparados com sensíveis. Em contrapartida, Fan et al. (2015) não descreveram diferenças na esporulação de isolados de *A. alternata*, Cox, Bryson e Schnabel (2007) observaram resultado semelhante em *Monilinia fructicola*.

Os fenótipos de resistência a tebuconazol e difenoconazol apresentaram as maiores medianas, o contrário foi descrito por Zhang et al. (2017) que descreveram reduções na esporulação de isolados de *C. truncatum* com resistência à fungicidas DMI, por outro lado, Malandrakis et al. (2015) não observaram diferenças na esporulação de isolados de *A. alternata*.

### 6.2.3 Sensibilidade osmótica (SOS) e Sensibilidade oxidativa (SOX)

Isolados com fenótipo de resistência à boscalida foram mais sensíveis ao stress osmótico quando comparados aos isolados fenotipicamente sensíveis na dose de 4%, em contrapartida Fan et al. (2015) não observou penalidade em isolados de *A. alternata* na mesma dose. Malandrakis et al. (2017) observou redução no crescimento micelial em um mutante de *Penicillium expansum* à 5% de NaCl. Já os isolados com fenótipo de resistência a tebuconazol e difenoconazol sofreram penalidades no crescimento relativo (CR) quando comparados com os fenótipos sensíveis, tal resultado está em concordância com o relato de

Gao et al. (2018) e Liu et al. (2009) em *Colletotrichum acutatum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, respectivamente.

Quanto a sensibilidade oxidativa, os isolados com fenótipo de resistência a boscalida apresentaram CR inferior em todas as doses quando comparados aos isolados sensíveis, concordando com o observado em isolados de *A. alternata* por Avenot, Sellam e Michailides (2017) e Fan et al. (2015).

## 7 CONCLUSÕES

Os isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina obtidos de material vegetal oriundo de Campanha-MG apresentam resistência a fungicidas QoI.

Isolados utilizados nesse estudo apresentam resistência à fungicidas DMI e SDHI.

Não foram observadas reduções na esporulação dos fenótipos de *Alternaria alternata* de tangerinas, com resistência a SDHI e DMI. Isolados SDHI resistentes apresentaram hipersensibilidade a stress oxidativo.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Estudos com maior abrangência geográfica são de suma importância para avaliar a sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina em pomares brasileiros.

O emprego de ferramentas de biologia molecular é necessário para verificar a existência de mutações nos fenótipos de resistência do presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 435, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00189.x>
- AKIMITSU, K.; TSUGE, T.; KODAMA, M.; YAMAMOTO, M.; OTANI, H. *Alternaria* host-selective toxins: determinant factors of plant disease. **Journal of General Plant Pathology**, v. 80, p. 109, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0498-7>
- AVENOT, H. F.; MICHAILIDES, T. J. Resistance to Boscalid Fungicide in *Alternaria alternata* Isolates from Pistachio in California. **Plant Disease**, v. 91, p. 1345, 2007. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1345>
- AVENOT, H. F.; SELLAM, A.; KARAOGLANIDIS, G.; MICHAILIDES, T. J. Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. **Phytopathology**, v. 98, n. 6, p. 736-742, 2008a.
- AVENOT, H. F.; SOLORIO, C.; MORGAN, D. P.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity and cross-resistance patterns to demethylation-inhibiting fungicides in California populations of *Alternaria alternata* pathogenic on pistachio. **Crop Protection**, v. 88, p. 72, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.05.012>
- AVENOT, H. F.; VAN DEN BIGGELAAR, H.; MORGAN, D. P.; MORAL, J.; JOOSTEN, M. H. A. J.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivities of baseline isolates and boscalid-resistant mutants of *Alternaria alternata* from pistachio to fluopyram, penthiopyrad, and fluxapyroxad. **Plant Disease**, 98(2), 197-205 (2014).
- AVENOT, H.; MORGAN, D. P.; MICHAILIDES, T. J. Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine®(pyraclostrobin+ boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternaria late blight of pistachios in California. **Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 135-140, 2008b.
- AVENOT, H.; SELLAM, A.; MICHAILIDES, T. Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. **Plant Pathology**, v. 58, n. 6, p. 1134-1143, 2009.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002. <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ps.520>
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? 2 ed. rev. Bruxelas, Bélgica: **FRAC Monograph**, 2007.
- CANIHOS, Y.; ERKILIC A.; TIMMER, L. W. First report of *Alternaria* Brown Spot of *Minneola* Tangelo in Turkey. **Plant Disease**, v. 81, p. 1214, 1997. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.10.1214B>



CANIHOS, Y.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Temperature, Leaf Wetness, and Isolate Effects on Infection of Minneola Tangelo Leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, v. 83, p. 429, 1999. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.429>

CHEN, W.; WEI, L.; ZHAO, W.; WANG, B.; ZHENG, H.; ZHANG, P.; LOU, T.; DUAN, Y.; HOU, Y.; ZHOU, M.; CHEN, C. Resistance risk assessment for a novel succinate dehydrogenase inhibitor pydiflumetofen in *Fusarium asiaticum*. **Pest Management Science**, 77: 538-547 (2021). <https://doi.org/10.1002/ps.6053>

CHITOLINA, G. M.; SILVA-JUNIOR, G. J.; FEICHTENBERGER, E.; PEREIRA, R. G.; AMORIM, L. Distribution of *Alternaria alternata* isolates with resistance to quinone outside inhibitor (QoI) fungicides in Brazilian orchards of tangerines and their hybrids. **Crop Protection**, v. 141, p. 105493, 2021.

COBB, N. A. Letters on the diseases of plants – *Alternaria* of the citrus tribe. **Agricultural Gazette N.S.W.** v. 14, p. 955, 1903.

CONDÉ, T. O. **Diversidade e caracterização da resistência de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina a estrobilurinas**. 2018. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2018.

DÉLYE, C.; LAIGRET, F.; CORIO-COSTET, M. F. A mutation in the 14 alpha demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2966, 1997.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds, **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.

ELLIS, M. B. Dematiaceous hyphomycetes (1971).

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Minas Gerais é destaque na produção de citros**. Disponível em <[http://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite\\_pagina\\_interna&id=23674](http://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite_pagina_interna&id=23674)>. Acesso em: 12 agosto 2019

FAN, Z.; YANG, J. H.; FAN, F.; LUO, C. X.; SCHNABEL, G. 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.

FERNANDEZ-ORTUÑO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; CHAMORRO, M.; DE LA PEÑA, E.; DE VICENTE, A.; TORÉS, J. A. Resistance to the SDHI Fungicides Boscalid, Fluopyram, Fluxapyroxad, and Penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from Commercial Strawberry Fields in Spain. **Plant Disease**, v. 101, p. 1306, 2017. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0067-RE>

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; TORÉS, J. A.; DE VICENTE, A.; & PÉREZ-GARCÍA, A. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2008.

FERREIRA, E. A.; MOREIRA, S. I.; PERINA, F. J.; ALVES, E. **Mancha-marrom-de-Alternaria em tangerineiras e seus híbridos: identificação e manejo**. EPAMIG. Circular Técnica, n. 244, p. 1–7, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 10 fevereiro 2021.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). Introduction and General Information. **WORKING GROUPS – SDHI Fungicides**. 2014. Disponível em: <<https://www.frac.info/working-group/sdhi-fungicides/introduction-and-general-information>>. Acesso em: 08/02/2021.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (FRAC). **List of Plant Pathogenic Organisms Resistant to Disease Control Agents**. May, 2018. Disponível em: <[https://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-resistant-plant-pathogenic-organisms\\_may\\_2018.pdf?sfvrsn=a2454b9a\\_2&sfvrsn=a2454b9a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/list-of-resistant-plant-pathogens/list-of-resistant-plant-pathogenic-organisms_may_2018.pdf?sfvrsn=a2454b9a_2&sfvrsn=a2454b9a_2)>. Acesso em: 08/02/2021.

GAO, Y.; HE, L.; MU, W.; LI, B.; LIN, J.; LIU, F. Assessment of the baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum acutatum* to fludioxonil. **European Journal of Plant Pathology**, 150(3), 639-651 (2018).

GISI, U.; SIEROTZKI, H.; COOK, A.; MCCAFFERY, A. 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.

GUR, L.; LEVY, K.; FARBER, A.; FRENKEL, O.; REUVENI, M. Delayed Development of Resistance to QoI Fungicide in *Venturia inaequalis* in Israeli Apple Orchards and Improved Apple Scab Management Using Fungicide Mixtures. *Agronomy*, v. 11, n. 2, p. 396, 2021.

HÄGERHÄLL, C. Succinate: quinone oxidoreductases: Variations on a conserved theme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v. 1320, p. 107, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00019-4)

HE, M. H.; WANG, Y. P.; WU, E. J.; SHEN, L. L.; YANG, L. N.; WANG, T.; SHANG, L. P.; ZHU, W.; ZHAN, J. Constraining Evolution of *Alternaria alternata* Resistance to a Demethylation Inhibitor (DMI) Fungicide Difenconazole. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01609

HEICK, T. M.; JUSTESEN, A. F.; JØRGENSEN, L. N. Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicides in the Nordic-Baltic region—a status. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, n. 3, p. 669-682, 2017.

HUANG, F.; FU, Y.; NIE, D.; STEWART, J. E.; PEEVER, L.; LI, H. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. **Fungal Biology**, v. 119, p. 320, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.09.006>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal – PAM**. Disponível em: <

<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 01 Março 2021.

ISHII, H.; BRYSON, P. K.; KAYAMORI, M.; MIYAMOTO, T.; YAMAOKA, Y.; SCHNABEL, G. Cross-resistance to the new fungicide mefentrifluconazole in DMI-resistant fungal pathogens. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 104737 (2020).

KARAOGLANIDIS, G. S.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Competitive ability and fitness of *Alternaria alternata* isolates resistant to QoI fungicides. **Plant disease**, v. 95, n. 2, p. 178-182, 2011a.

KARAOGLANIDIS, G. S.; MARKOGLU, A. N.; BARDAS, G. A.; DOUKAS, E. G.; KONSTANTINO, S.; KALAMPOKIS, J. F. Sensitivity of *Penicillium expansum* field isolates to tebuconazole, iprodione, fludioxonil and cyprodinil and characterization of fitness parameters and patulin production. **International journal of food microbiology**, 145(1), 195-204 (2011b).

KAYAMORI, M.; ZAKHARYCHEVA, A.; SAITO, H.; KOMATSU, K. Resistance to demethylation inhibitors in *Cercospora beticola*, a pathogen of sugar beet in Japan, and development of unique cross-resistance patterns. **European Journal of Plant Pathology**, 1-14 (2021).

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, 1991.

KOHMOTO, K.; ITOH, Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S.; NAKATSUKA, S. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathology** 83, no. 5 (1993): 495-502.

KÖLLER, W.; WILCOX, W. F. Evidence for the predisposition of fungicide-resistant phenotypes of *Venturia inaequalis* to a preferential selection for resistance to other fungicides. **Phytopathology** v. 91, p. 776, 2001.

LAWRENCE, D. P.; GANNIBAL, P. B.; PEEVER, T. L.; PRYOR, B. M. 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.

LEACH, C. M.; ARAGAKI, M. Effects of temperature on conidium characteristics of *Ulocladium chartarum* and *Stemphylium floridanum*. **Mycologia**, v. 62, p. 1071, 1970.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. 1. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2006.

LIU, X.; YIN, Y.; YAN, L.; MICHAELIDES, T. J.; MA, Z. Sensitivity to iprodione and boscalid of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates collected from rapeseed in China. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 95(2), 106-112 (2009).

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.

LUO, C. X.; SCHNABEL, G. The cytochrome P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, p. 359, 2008.  
doi:10.1128/AEM.02159-07

MALANDRAKIS, A. A.; APOSTOLIDOU, Z. A.; LOUKA, D.; MARKOGLOU, A.; FLOURI, F. Biological and molecular characterization of field isolates of *Alternaria alternata* with single or double resistance to respiratory complex II and III inhibitors. **European Journal of Plant Pathology**, 152(1), 199-211 (2018).

MALANDRAKIS, A. A.; APOSTOLIDOU, Z. A.; MARKOGLOU, A.; FLOURI, F. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. **European Journal of Plant Pathology**, 142(3), 489-499 (2015).

MALANDRAKIS, A. A.; VATTIS, K. N.; MARKOGLOU, A. N.; KARAOGLANIDIS, G. S. Characterization of boscalid-resistance conferring mutations in the SdhB subunit of respiratory complex II and impact on fitness and mycotoxin production in *Penicillium expansum* laboratory strains. **Pesticide biochemistry and physiology**, 138, 97-103 (2017).

MATIĆ, S.; GILARDI, G.; VARVERI, M.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Molecular diversity of *Alternaria* spp. from leafy vegetable crops, and their sensitivity to azoxystrobin and boscalid. **Phytopathologia Mediterranea**, 58(3), 519-533 (2019).

MILGATE, A.; ADORADA, D.; ORCHARD, B.; PATTEMORE, J. First report of resistance to DMI fungicides in Australian populations of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Disease notes**, v. 100, p. 522, 2016. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0704-PDN>

MONDAL, S. N.; BHATIA, A.; SHILTS, T.; TIMMER, L. W. 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.

PEREIRA, D. A.; MCDONALD, B. A.; BRUNNER, P. C. Mutations in the CYP51 gene reduce DMI sensitivity in *Parastagonospora nodorum* populations in Europe and China. **Pest management Science**, v. 73, n. 7, p. 1503-1510, 2017.

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.

<https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.6.750C>

R Core Team (2021). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. **Crop protection**, 21(10), 951-955 (2002).

SANTOS, R. F.; FRAAIJE, B. A.; GARRIDO, L. D. R.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; AMORIM, L. Multiple resistance of *Plasmopara viticola* to QoI and CAA fungicides in Brazil. **Plant Pathol.** 2020; 69: 1708– 1720. <https://doi.org/10.1111/ppa.13254>

SAUTUA, F. J.; DOYLE, V. P.; PRICE, P. P.; PORFIRI, A.; FERNANDEZ, P.; SCANDIANI, M. M.; CARMONA, M. A. Fungicide resistance in *Cercospora* species causing cercospora leaf blight and purple seed stain of soybean in Argentina. **Plant Pathol.** 2020; 69: 1678– 1694. <https://doi.org/10.1111/ppa.13261>

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

SOLEL, Z.; KIMCHI, M. Histopathology of Infection of *Minneola* tangelo by *Alternaria alternata* pv. *dtri* and the Effect of Host and Environmental Factors on Lesion Development. **Journal of Phytopathology**, v. 146, n. 11-12, p. 557-561, 1998.

SPÓSITO, M.B.; JÚNIOR, J.B.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T. Risco marrom. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, abril/maio, n.19, 2003.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2005.

THOMAS, A.; LANGSTON JR, D. B.; STEVENSON, K. L. Baseline Sensitivity and Cross-Resistance to Succinate-Dehydrogenase-Inhibiting and Demethylation-Inhibiting Fungicides in *Didymella bryoniae*. **Plant Disease**, v. 96, p. 979, 2012. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-11-0744-RE>

TIMMER, L. W.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T. R.; IBAÑEZ, A. M.; ZITKO, S. E. Environmental Factors Affecting Production, Release, and Field Populations of Conidia of *Alternaria alternata*, the Cause of Brown Spot of Citrus. **Phytopathology**, v. 88, p. 1218, 1998. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.11.1218>

TIMMER, L.W.; PEEVER, T. L.; SOLEL, Z.; AKIMITSU, K. *Alternaria* diseases of citrus - Novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 42, n. 2, p. 99–112, 2003.

TSUGE, T.; HARIMOTO, Y.; AKIMITSU, K.; OHTANI, K.; KODAMA, M.; AKAGI, Y.; EGUSA, M.; YAMAMOTO, M.; OTANI, H. Host-selective toxins produced by the plant

pathogenic fungus *Alternaria alternata*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 44, 2013.

TUCKER, M. A.; LOPEZ-RUIZ, F.; COOLS, H. J.; MULLINS, J. G.; JAYASENA, K.; OLIVER, R. P. Analysis of mutations in West Australian populations of *Blumeria graminis* f. sp. hordei CYP51 conferring resistance to DMI fungicides. **Pest management science**, v. 76, n. 4, p. 1265-1272, 2020.

VARGAS, M. H. **ED50plus v1.0**. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias [Computer software]. Mexico, DF, Mexico (2000).

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.  
<https://doi.org/10.1094/pdis-04-13-0449-re>

VEGA, B.; DEWDNEY, M. M. Sensitivity of *Alternaria alternata* from citrus to boscalid and polymorphism in iron-sulfur and in anchored membrane subunits of succinate dehydrogenase. **Plant disease**, v. 99, n. 2, p. 231-239, 2015.

VEGA, B.; LIBERTI, D.; HARMON, P. F.; DEWDNEY, M. M. 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.

VICENT, A.; ARMENGOL, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ALFARO-LASSALA F. First report of *Alternaria* Brown Spot of Citrus in Spain. **Plant Disease**, v.84, p. 1044, 2000.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1044B>

VINCELLI, P.; DIXON, E. Resistance to QoI (strobilurin-like) fungicides in isolates of *Pyricularia grisea* from perennial ryegrass. **Plant Disease**, v. 86, n. 3, p. 235-240, 2002.

WANG, P. H.; WU, P.C.; HUANG, R.; CHUNG, K. R. The Role of a Nascent Polypeptide-Associated Complex Subunit Alpha in Siderophore Biosynthesis, Oxidative Stress Response, and Virulence in *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 33(4), pp.668-679, 2020.

WANG, X. F.; LI, Z. A.; TANG, K. Z.; ZHOU, C. Y.; YI, L. First report of *Alternaria* Brown Spot of Citrus caused by *Alternaria alternata* in Yunnan Province, China. **Plant Disease**, v. 94, p. 375, 2010. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0375C>

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

WOUDENBERG, J. H. C.; GROENEWALD, J. Z.; BINDER, M.; CROUS, P. W. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v. 75, n. May, p. 171–212, 2013.  
<https://doi.org/10.3114/sim0015>

WOUDENBERG, J. H. C.; SEIDL, M. F.; GROENEWALD, J. Z.; DE VRIES, M.; STIELOW, J. B.; THOMMA, B. P. H. J.; CROUS, P. W. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes?. **Studies in mycology**, 82, 1-21 (2015).

- YANG, J. H.; BRANNEN, P. M.; SCHNABEL, G. Resistance in *Alternaria alternata* to SDHI Fungicides Causes Rare Disease Outbreak in Peach Orchards. **Plant Disease**, v. 99, p. 65, 2014. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0387-RE>
- ZARN, J. U.; BRÜSCHWEILER, B. J.; SCHLATTER, J. R. Azole Fungicides Affect Mammalian Steroidogenesis by Inhibiting Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase and Aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 255, 2003. <https://doi.org/10.1289/ehp.5785>
- ZHANG, C. Q.; LIU, Y. H.; MA, X. Y.; FENG, G.; MA, Z. H. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight, to mepronil and boscalid. **Crop Protection**, v. 28, p. 381, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.12.004>
- ZHANG, C.; DIAO, Y.; WANG, W.; HAO, J.; IMRAN, M.; DUAN, H.; LIU, X. Assessing the risk for resistance and elucidating the genetics of *Colletotrichum truncatum* that is only sensitive to some DMI fungicides. **Frontiers in microbiology**, 8, 1779 (2017).
- ZIOGAS, B. N.; MALANDRAKIS A. A. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs). In: Ishii H., Hollomon D. (eds) **Fungicide Resistance in Plant Pathogens**. Springer, Tokyo, 2015. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_13)