**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Alternaria grandis* e *Alternaria solani* a fungicidas

Shadia Katari Nossllala

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2016**

Shadia Katari Nossllala
Engenheira Agrônoma

Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Alternaria grandis* e *Alternaria solani* a fungicidas

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ OTAVIO MACHADO MENTEN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2016

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

Nosslala, Shadia Katari

Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Alternaria grandis* e *Alternaria solani* a fungicidas / Shadia Katari Nosslala. - - Piracicaba, 2016.
66p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Solanum tuberosum* 2. *Alternaria grandis* 3. Fungicidas 4. Germinação *in vitro* I. Título

Aos meus pais, Fause e Sílvia,

Dedico com muito amor

Às colegas de trabalho Annelise Tremocoldi e Paula Radaelli,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz e ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia.

Ao Prof. Dr. José Otavio Machado Menten. Obrigada por ter me recebido tão atenciosamente, pelos incentivos, e paciência durante o curso. Foi uma honra tê-lo como orientador.

À Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes (Helô) agradeço imensamente por toda sua paciência e todos os ensinamentos.

Ao Corpo Docente do PPG- Fitopatologia, o qual foi responsável pela transmissão de conhecimentos científicos durante a minha formação.

À Carla Serra, por ter cedido o isolado de *Alternaria solani* utilizado no presente trabalho.

À SGS do Brasil pela disponibilização dos produtos avaliados na dissertação e estrutura de laboratório.

Ao MSc. Marcos de Ferran por toda a paciência e compreensão sobre a minha ausência em alguns momentos importantes do trabalho para conclusão deste objetivo pessoal.

Às colegas de laboratório, MSc. Mariane Sayuri Ishizuka e MSc. Meyriele Pires de Camargo, pelos ensinamentos sobre as metodologias e toda atenção que aqui foi dedicada.

Às amigas, Paula Radaelli e Annelise Tremocoldi, pelos incentivos diários, os quais não me deixaram desistir diante das dificuldades.

Muito obrigada!

"Existe um momento absolutamente preciso para que as coisas aconteçam. Momento que muitas vezes não depende somente da nossa vontade mas de fatores externos que não podemos controlar. Acabar as emoções é a primeira forma de acelerar nosso crescimento interior. Paciência abre a visão, nos dá tempo para acessar o futuro; gentilmente, pensar. Um dia as barreiras cairão e aquilo que esperamos acontecerá."

Anthea Church

**"Se o autor não se emociona com a sua própria criação, dificilmente pode esperar que outros o façam".
Charles Spencer Chaplin Jr**

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Aspectos gerais da cultura da batata	11
2.2. A pinta preta da batata	13
2.2.1. Ocorrência e importância	13
2.2.2. Etiologia da doença	14
2.2.3. Ciclo da doença e epidemiologia	16
2.2.4. Sintomatologia	19
2.3. Técnicas de manejo e controle da doença	20
2.4. Controle químico	21
2.4.1. Sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>A. solani</i> e <i>A. grandis</i>	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Obtenção dos isolados de <i>A. grandis</i> e <i>A. solani</i>	33
3.2. Produtos utilizados	33
3.3. Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>A. solani</i> e <i>A. grandis</i> a fungicidas	34
3.3.1. Interferência <i>in vitro</i> de fungicidas no crescimento do micélio	34
3.3.2. Teste de sensibilidade sobre a germinação de conídios de <i>Alternaria spp.</i> a fungicidas	37
3.4. Análises dos dados obtidos	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Alternaria spp.</i> a fungicidas	39
5. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	59

RESUMO

Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Alternaria grandis* e *Alternaria solani* a fungicidas

Atualmente, a produtividade da cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) pode ser reduzida devido à ocorrência de doenças em todo o território nacional, destacando-se a pinta preta, causada por *Alternaria spp.* Historicamente se acreditava que *A. solani* (AS) era a principal causadora mas, atualmente, descobriram outras espécies associadas, sendo predominante hoje, em território nacional a espécie *A. grandis* (AG). O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade *in vitro* de três isolados de *A. grandis* e um isolado de *A. solani* frente a onze fungicidas amplamente utilizados no manejo desta doença em campo. Foi avaliado o efeito dos fungicidas sobre o crescimento micelial dos isolados, utilizando-se do método da incorporação do fungicida no meio de cultura fundente. As diluições dos fungicidas foram realizadas em água destilada e esterilizada, de acordo com a metodologia descrita por Camargo (2013) e Ishizuka (2016). Para os fungicidas com mistura de ingrediente ativo, considerou-se a soma das concentrações no cálculo. Inicialmente, as concentrações do meio de cultura, foram 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 mg L⁻¹. Após, as doses foram ajustadas conforme a CI₅₀ de cada fungicida. Quantificou-se também a inibição sobre a germinação dos conídios nas concentrações discriminatórias de 0; 0,1; 1; 10 e 100 mg.L⁻¹. 24 horas após o preparo do meio as placas foram observadas em microscópio óptico, determinando-se a germinação dos conídios em 300 unidades observadas por placa de Petri. Todos os isolados testados foram altamente sensíveis aos ingredientes ativos fluazinam, pirimetanil, procimidona e piraclostrobina. Não houve diferenças de comportamento de sensibilidade entre as espécies de *A. solani* e *A. grandis* que possam caracterizar uma perda de sensibilidade por conta da predominância da espécie de *A. grandis* associada à pinta preta da batata no Brasil. Encontraram-se evidências de insensibilidade dos isolados de *A. grandis* e *A. solani* aos ingredientes ativos Clorotalonil e Boscalida.

Palavras-chave: *Solanum tuberosum*; *Alternaria grandis*; Sensibilidade *in vitro*; Fungicidas; Germinação *in vitro*

ABSTRACT

In vitro sensitivity of *Alternaria grandis* and *Alternaria solani* to fungicides

Currently, the productivity of potato crop (*Solanum tuberosum* L.) may be reduced due to the occurrence of disease throughout the country, especially due to early blight, caused by *Alternaria* spp. Historically it was believed that *A. solani* (AS) was the main cause, most currently was founded others associated species, being predominant today the occurrence of the disease associated with the species *A. grandis* (AG). The objective of this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of three isolates of *A. grandis* and one isolate of *A. solani* for eleven fungicides widely used in the management of this disease in the field, was evaluated the effect of fungicides on mycelial growth using the fungicidal method that incorporate it in the medium culture. Dilutions of fungicides were performed in sterile distilled water according to the methodology described by Camargo (2013) and Ishizuka (2016). For the fungicides with active ingredient mixture, was considered the sum of the both concentrations in the calculation. The concentrations of the culture medium were 100, 10, 1, 0.1, 0.01 and 0.001 mg L⁻¹. The doses were adjusted according to the CI₅₀ of each fungicide, was quantified also the inhibition of spore germination, and the fungicides were incorporated into the agar medium - water in discriminatory concentrations of 0; 0.1; 1; 10 and 100 mg.L⁻¹. Then, 24 hours after preparation of the medium the plates were observed under an optical microscope, determining the spore germination observed at 300 units per plate. All tested isolates were highly sensitive to the active ingredients fluazinam, pyrimethanil, procymidone and pyraclostrobin. There was no sensitivity behavioral differences between species of *A. solani* and *A. grandis* which may characterize a loss of sensitivity due to the predominance of species of *A. grandis* associated with early blight in Brazil, was found evidences of insensitivity of isolates of *A. grandis* and *A. solani* to the active ingredients Chlorothalonil and Boscalida.

Keywords: *Solanum tuberosum*; *Alternaria grandis*, *in vitro* sensibility; fungicides; *in vitro* germination

1. INTRODUÇÃO

As alternarioses são reconhecidas mundialmente como doenças fúngicas comuns nas hortaliças, afetando plântulas, folhas, caules, hastes, flores e frutos de diversas hortaliças como apiáceas, aliáceas, crucíferas, curcubitáceas, chichoriáceas e solanáceas (TÖFOLI; DOMINGUES, 2006). Causada pelo gênero *Alternaria*, atualmente é representado por 710 espécies descritas na literatura (INDEX FUNGORUM, 2016). Atualmente existem três destas espécies, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* e *Alternaria grandis* que estão associadas à doença pinta preta na cultura da batata no Brasil.

Descrita por Simmons (2000), o primeiro relato da ocorrência de *Alternaria grandis* se deu no Estado da Pensilvania – US (INDEX FUNGORUM, 2016) sendo também registradas ocorrências na África (ROBERTSON, 2016) e no Brasil (RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009; RODRIGUES et al., 2010).

A doença possui um elevado potencial de danos econômicos para a cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.). O agente causal, historicamente, era descrito como sendo o fungo *Alternaria solani* Sorauer. No entanto, Simmons (2000), baseando-se em estudos morfológicos, reportou que *Alternaria tomatophila* Simmons e *Alternaria grandis* Simmons estavam também associadas à pinta preta em tomate e batata, respectivamente. No Brasil, recentemente outras espécies têm sido associadas a esta doença, sendo *Alternaria grandis* a principal delas em batata. Rodrigues (2009), em estudo realizado com 20 isolados de regiões diferentes, coletados de folhas de batateira, constatou a predominância de indivíduos da espécie *A. grandis* e, curiosamente, não se detectou a presença de *A. solani* em nenhuma das amostras.

De acordo com Cardoso (2014), *Alternaria* spp. associadas à pinta preta no Brasil podem apresentar diferenças com relação a agressividade, sendo que, em diferentes regiões do Brasil, produtores tem relatado maiores perdas de produtividade em função das epidemias. A autora explica que a distribuição do inóculo pode estar associada com a maior gama de hospedeiros dessas novas espécies.

Uma das hipóteses é que *A. grandis* apresente sensibilidade a fungicidas diferente de *A. solani*. Diversos trabalhos foram realizados para avaliar o efeito “*in vitro*” de fungicidas sobre isolados de *A. solani* (BRIGNANI; OLIVEIRA, 1980; BOVEDA, 1986; TÖFOLI; DOMINGUES; KUROSAWA, 2003; LÉLIS et al., 2006), com evidências de redução da sensibilidade a importantes fungicidas utilizados no manejo (LÉLIS et al., 2006). Entretanto, até o momento, nenhum levantamento sistemático quanto à sensibilidade diferencial de isolados de *Alternaria grandis* a diversos fungicidas foi publicado no Brasil.

Com isso a redução da eficiência do controle químico observada em campo pode estar associada à predominância de populações de *A. grandis* que apresentam menor sensibilidade aos fungicidas atualmente registrados no Brasil para *A. solani*.

A hipótese testada neste trabalho verifica a sensibilidade diferencial de três isolados de *Alternaria grandis* e um isolado de *Alternaria solani*, proveniente de regiões com representatividade para a cultura, a onze fungicidas atualmente registrados no Brasil para o controle *Alternaria solani* na cultura da batata.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da cultura da batata

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é um dos alimentos mais consumidos no mundo, devido à sua composição, versatilidade gastronômica e tecnológica (COELHO; VILELA; CHAGAS, 1999). A cultura ocupa a quarta posição entre os principais alimentos para a humanidade, sendo superada apenas por trigo, arroz e milho (JULIATTI, 2001; TÖFOLI et al., 2013b; ARAÚJO, 2015). A China se destaca como o maior produtor mundial de batata (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2014). A produção total no Brasil em 2014 foi de 3,68 milhões de toneladas, sendo que, o maior estado produtor no Brasil, Minas Gerais, com aproximadamente 33% da oferta anual, seguido por Paraná (23%), São Paulo (19%), Rio Grande do Sul (10%), Bahia (8%) e Goiás (5%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014).

Com origem nos Andes peruanos e bolivianos, recebe diferentes nomes conforme o local: araucano ou Poni (Chile), lomy (Colômbia), Papa (Império Inca e Espanha), Patata (Itália), Irish Potato ou White Potato (Irlanda) (SANTOS JUNIOR, 2013). Rica em carboidratos, a batata é uma fonte considerável de fósforo, potássio, vitaminas do complexo B e C, proteínas de boa qualidade, fibra alimentar e outros nutrientes (TÖFOLI et al., 2013b). Diante das condições nutricionais a cultura possui papel fundamental no combate à fome mundial (BANDINELLI, 2009). É plantada em pelo menos 125 países e consumida por mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo (FREIRE, 1998 apud PASTORINI et al., 2003).

A batata é cultivada nos cinco continentes, sob condições de clima temperado, subtropical e tropical e nos mais variados agro-ecossistemas, níveis tecnológicos e sistemas de produção (TÖFOLI, 2011).

A ONU (Organização das Nações Unidas) determinou o ano de 2008 como sendo o ano internacional da batata, em função da sua versatilidade e importância mundial no combate à fome, este passo servirá como uma plataforma de ações, de médio e longo prazo, que deve promover um intercâmbio de informações e pesquisas para intensificar o desenvolvimento da cultura da batata no mundo (MINARÉ, 2007).

A cultura pode ser cultivada em altitudes desde o nível do mar (Holanda) até 4.300 m (Andes e Himalaia). Não se adapta em clima quente e chuvoso (Amazônia) e possui um melhor desenvolvimento e tuberação sob temperaturas noturnas entre 10 a 18° C e diurnas entre 20 e 25° C, sendo estes os fatores limitantes para os cultivos tropicais. Leva de 90 a 140 dias para completar seu ciclo; o conhecimento da cultivar empregada é de suma importância para alcançar o máximo potencial produtivo (FILGUEIRA, 2003).

Em termos de época de produção, a colheita da batata no Brasil ocorre em três safras distintas, com a seguinte distribuição: safra das águas: com colheita de dezembro a março, corresponde a 55% da produção nacional, safra da seca: com colheita de abril a julho, responde por 30 a 32% do total e, safra de inverno: colheita de agosto a novembro participa com 13 a 18% do abastecimento nacional (FILGUEIRA, 2003). De acordo com Filgueira (2008) a época das águas é caracterizada pelo elevado risco de insucesso em função da ocorrência de doenças, no entanto, o preço obtido pode ser vantajoso, mesmo diante dos riscos.

No Brasil o plantio ocorre em todas as épocas, sendo que, na safra das águas, os Estados do Paraná e de Minas Gerais competem pelo mercado; na safra da seca o Paraná é o principal provedor, com pequena diferença para Minas Gerais e São Paulo; já na safra de inverno, o abastecimento fica por conta de São Paulo e Minas Gerais (GODOY, 2001).

A planta de batata pertence à família *Solanaceae*, gênero *Solanum* e é uma herbácea, dicotiledônea. A planta apresenta caules aéreos, herbáceos, clorofilados, angulosos, ramificados, em disposição ereta, aberta ou prostrada chegando até 60 cm de altura, possui coloração verde ou arroxeada. As folhas são formadas por três ou mais folíolos laterais, sendo um terminal e alguns são rudimentares ou terciários, que diferem muito quanto ao formato, cor, tamanho e número, a depender da cultivar. As flores apresentam-se em inflorescências, no topo da planta, sendo pentâmeras e hermafroditas (predomínio de autopolinização), de cores arrozeadas, brancas, rosadas ou azuladas. Os frutos são do tipo baga, de cores verde, amarelo ou violeta. O sistema radicular é superficial e concentram-se nos primeiros 50 cm de profundidade. Os tubérculos se desenvolvem na extremidade dos estolões (FORTES; PEREIRA, 2003; TÖFOLI, 2011)

Filgueira (2008), descreveu quatro estádios de desenvolvimento da cultura, sendo eles: Estádio I – compreendido do plantio até a emergência com a duração de

uma a duas semanas após o plantio, Estádio II – compreendido entre a emergência e o início da tuberização, com início na quarta ou quinta semana após o plantio, Estádio III – do início da tuberização até o pico vegetativo, compreendido entre a oitava (precoce) e a décima semana (tardio) após o plantio, Estádio IV – é o mais longo e segue até a senescência natural, estágio onde há incremento de ganho de massa no tubérculo, que pode se estender da décima segunda (precoce) à décima quarta semana após o plantio.

Filgueira (2008), Dias e Imaute (2005) descreveram diversas doenças que afetam o seu desenvolvimento e podem causar impactos sobre a produção, dentre tais doenças fúngicas, as principais são: Requeima (*Phytophthora infestans*), pinta preta (*Alternaria* spp.), Rizoctoniose (*Rhizoctonia solani*), Sarna prateada (*Helminthosporium solani*), Sarna pulverulenta (*Spongospora subterrânea*), Podridão seca (gêneo *Fusarium*), Olho pardo (*Cylindrocladium clavatum*). A pinta preta é a segunda doença em importância no Brasil, perdendo apenas para a Requeima.

2.2. A pinta preta da batata

2.2.1. Ocorrência e importância

A cultura da batata é afetada por mais de 100 doenças infecciosas, causadas por diferentes espécies de fungos, vírus e viróides, bactérias, nematóides e fitoplasma. Segundo Gebhardt e Valkonen (2001), a ação desses patógenos promove a redução anual da produção mundial em um quarto do seu potencial, gerando uma perda estimada de 100 milhões de toneladas a cada ano.

Nos últimos anos a pinta-preta também tem crescido em importância na Europa e causado perdas consideráveis na produção. Alguns autores atribuem a essa crescente importância da pinta preta as mudanças no clima causadas pelo aquecimento global (SCHULLER; HABERMEYER, 2002; KAPSA, 2009; TÖFOLI, 2011).

No Brasil, a pinta preta apresenta relevante potencial destrutivo, evidenciado por intensa redução de área foliar, declínio no vigor das plantas, quebra de hastes e depreciação dos tubérculos (SHERF; MACNAB, 1986). Desde que foi relatada pela primeira vez no país, há mais de um século, tem-se constatado relatos de epidemias

de pinta preta em todas as áreas onde se cultivam solanáceas (RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009).

A doença ocorre em especial nas regiões tropicais e subtropicais e seus danos variam de 6 a 100% na produção (TÖFOLI et al., 2013a).

2.2.2. Etiologia da doença

O gênero *Alternaria* inclui espécies patogênicas e não patogênicas, que causam doença de importância agrônômica em diversas culturas como ornamentais, oleaginosas, cereais, vegetais e frutas.

Até recentemente, acreditava-se que o fungo *Alternaria solani* Sorauer era o agente causal da doença (FANCELLI, 1991; STEVENSON et al., 1994; FILGUEIRA, 2003; DIAS; IMAUTE, 2005). Descrito pela primeira vez por Ellis e Martin em 1882 como *Macrosporium solani*, o nome foi substituído, posteriormente, por Wiltshire em 1933 por *Alernaria solani* Sorauer (FANCELLI, 1991).

Além da batata, são descritos, até o momento, 73 hospedeiros (FARR; ROSSMAN, 2013), sendo que, a doença também pode estar associada a outras espécies do gênero, como *Alternaria alternata* e *Alternaria grandis* (SIMMONS, 2007). No Brasil, a ocorrência de *Alternaria alternata* é conhecida há algum tempo; porém, *Alternaria grandis* é recente (RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009; RODRIGUES et al., 2010).

Töfoli et al. (2013a) destacam que a ocorrência das três espécies (*A. solani*, *A. alternata* e *A. grandis*) podem variar em função da localidade, sendo que, na Europa, a doença é causada pelo complexo *A. solani* e *A. alternata*, enquanto que, nos Estados Unidos, prevalece a ocorrência de *A. solani* (VASCONCELOS; SILVA; CARVALHO, 2014). Rodrigues et al. (2010) compararam com marcadores morfológicos e moleculares, entre 2005 a 2008, isolados provenientes de sete regiões brasileiras e curiosamente encontraram apenas *A. grandis* associada à cultura da batata no país.

O gênero *Alternaria* pertence ao grupo dos fungos mitospóricos, Reino Fungi; divisão: Ascomycota; subdivisão: Dothideomycetes; classe: Pleosporomycetidae; ordem: Pleosporales; família: Pleosporaceae (INDEX FUNGORUM, 2016), são chamados fungos imperfeitos por não apresentarem o ciclo sexual ou a organização de estruturas de frutificação, sendo que, os conídios são produzidos por conidióforos

simples ou diretamente das hifas. Mesmo sem apresentar ciclo sexual, as populações possuem ampla variabilidade genética o que pressupõe a ocorrência de recombinação. Em estudo feito por (MIGUEL, 2012) foi possível verificar a ocorrência de compatibilidade micelial entre isolados de *A. grandis* e *A. solani* indicando a possível ocorrência do ciclo parasexual, sendo este um dos mecanismos de recombinação conhecidos hoje.

A determinação taxonômica do gênero *Alternaria* é baseada, principalmente, na morfologia dos conídios. A espécie *A. solani* apresenta conídios que, quando jovens, são hialinos, medindo, geralmente 50 x 12 µm (comprimento x largura) alongados ou ovóides, com septos variando de 3 a 6 septos. Já os conídios maduros são lisos e tipicamente marrons e ovóides, medindo, geralmente 90x 24µm. O bico possui de 5 a 8 µm de largura e de 40 a 80µm de comprimento, podendo atingir até 150 µm. Conídios com um único bico afilado são predominantes na população de *A. solani*, porém ocorre conídios com dois bicos, e raramente, com três bicos. Os conídios são inseridos em conidióforos septados, retos ou sinuosos, geralmente com 50 x 10 µm e apresentam a mesma coloração dos conídios (SIMMONS, 2000).

A. grandis possui conídios com morfologia semelhante a *A. solani*, porém com dimensões 50 a 100% maiores. O conídio típico tem corpo longo e estreito, com bicos variando entre um e três. O tamanho dos conídios varia de acordo com a quantidade de bicos. Conídios contendo um bico possuem o corpo variando de 141 a 192 x 26 a 38 µm, além do bico que varia de 160 a 200 µm de comprimento por 6,4 µm de largura. Conídios com dois bicos têm corpo medindo entre 128-198 x 24-30 µm e os bicos de 99-160 µm e 88-128 µm. O corpo dos conídios possui de 11 a 19 septos transversais e de um a três longitudinais. Os conidióforos são escuros, septados e grandes, medindo de 115-200 x 8-11µm. Além das diferenças morfológicas dos conídios, *A. grandis* difere de *A. solani* pelo padrão de esporulação, apresentando maior capacidade na produção de esporos (SIMMONS, 2000; RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009). Nos trabalhos realizados no Brasil, verificou-se que isolados de *A. grandis* produzem conídios solitários, multiseptados, de coloração marrom e possuem 1 bico (RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009).

Tabela 1 - Características morfológicas de diferentes espécies de *Alternaria*, associadas à pinta preta na batata

Espécie de <i>Alternaria</i>	Hospedeiro/órgão da planta	Tamanho do conídio (µm)		Tamanho do bico (µm)
		Comprimento	Largura	Comprimento
<i>A. grandis</i> ⁽¹⁾	<i>Solanum tuberosum</i> /folha	102,0-184,0	14,0-17,0	135,0-206,0
<i>A. solani</i> ⁽²⁾	<i>Solanum tuberosum</i> /folha	85,0-100,0	18,0-22,0	83,0-110,0
<i>A. alternata</i>	<i>Solanum tuberosum</i> /folha ⁽³⁾	20,0-60,0	9,0-18,0	*
	<i>Solanum tuberosum</i> /tubérculo ⁽⁴⁾	19,7-45,4	8,5-18,6	2,6-11,9

⁽¹⁾ Rodrigues et al. (2010 apud Vasconcelos, Silva e Carvalho 2014); ⁽²⁾ Ramjagathesh; Ebenezar (2012 apud Vasconcelos, Silva e Carvalho 2014); ⁽³⁾ Van der Waals et al., (2011 apud Vasconcelos, Silva e Carvalho 2014); ⁽⁴⁾ Vasconcelos, Silva e Carvalho (2014). Fonte: Adaptado de Vasconcelos, Silva e Carvalho (2014).

Além das diferenças morfológicas dos conídios, há também diferenças quanto ao padrão de esporulação, sendo que *A. grandis* apresenta maior capacidade de esporulação que *A. solani* (SIMMONS, 2000). Já o fungo *A. solani* é conhecido pela sua dificuldade de esporulação em meio de cultura (FANCELLI, 1991).

Em estudos para checar a agressividade de isolados de *Alternaria solani*, *Alternaria grandis* e *Alternaria tomatophila* em tomate e batata, realizados por Cardoso (2010), verificou-se que todas as espécies, mesmo não sendo do hospedeiro de origem, causaram sintomas e foram agressivas em batata. A autora encontrou evidências de preferência por hospedeiros para as espécies brasileiras de *Alternaria* spp. e explica que pode haver relação entre as regiões e as épocas de plantio da batata, fatores como temperaturas noturnas mais amenas, podem de forma geral favorecer a espécie *A. grandis*. Neste mesmo estudo verificou-se que a espécie *A. grandis* possui a menor exigência quanto ao tempo de molhamento foliar, inferior a 2 horas, para causar infecção, o que pode explicar a ocorrência de epidemias em qualquer época do ano.

2.2.3. Ciclo da doença e epidemiologia

A sobrevivência do patógeno pode ocorrer de uma estação para a outra em restos de cultura, plantas alternativas e voluntárias (solanáceas). O fungo sobrevive também em equipamentos agrícolas, estacas e caixas usadas ou mesmo nas sementes e pode permanecer viável no solo na forma de micélio, esporo ou clamidósporo. Os conídios são estruturas resultantes da reprodução assexuada e constituem a principal fonte de inóculo do fungo para o início e manutenção de

epidemias. Os conídios, uma vez dispersos e depositados na superfície da folha, caule ou fruto do hospedeiro sadio, iniciam vários pontos de infecção que irão se desenvolver em lesões. Cada lesão, por sua vez, produz centenas de conídios que serão dispersos e poderão iniciar novos pontos de infecção (KEMMITT, 2002; RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009).

Os esporos são dispersos, principalmente, pela água e pelo vento. Condições ambientais quentes e úmidas (24-29°C) são consideradas ótimas para a infecção. Na presença de umidade (com formação de filme d'água) e em temperaturas variando entre 28-30°C, os conídios germinam em aproximadamente 40 minutos. Os tubos germinativos ressecados podem retomar o crescimento quando reidratados. A infecção dos tubérculos usualmente ocorre através de ferimentos na superfície do tubérculo. Ferimentos causados durante a colheita e que coincidem com condições favoráveis de umidade para germinação de esporos podem levar a perdas significativas. Altos níveis de umidade no solo podem causar inchamento das lenticelas nos tubérculos, as quais podem ser facilmente invadidas pelo patógeno. O tempo entre o início da infecção e o aparecimento de sintomas nas folhas é dependente das condições ambientais, idade da folha e da suscetibilidade do cultivar. A pinta preta (alternariose) é uma doença de tecidos vegetais em processo de envelhecimento. As lesões aparecem rapidamente em ambiente quente e úmido sobre folhas envelhecidas e são normalmente visíveis entre 5 e 7 dias após a inoculação (KEMMITT, 2002).

Cardoso (2010) verificou que a espécie *A. grandis*, *A. solani* e *A. tomatophila* causaram maior área de lesão em seu hospedeiro de origem, o que pode estar relacionado à adaptação destes isolados às condições de cultivo dos seus hospedeiros.

Figura 1 – Ciclo e sintomatologia da doença pinta preta (*Alternaria* spp.). Fonte: Adaptado de Wharton; Kirk (2012)

2.2.4. Sintomatologia

Os sintomas de pinta preta iniciam-se, normalmente, nas folhas mais baixas e velhas da planta, onde surgem pequenas manchas escuras (de 1 a 2 mm). Posteriormente, estas crescem, adquirindo um formato ovóide, delimitado pelas nervuras da folha, de coloração escura e com zonas concêntricas características. O tecido entre e ao redor das lesões apresenta-se, normalmente, clorótico. O aumento da intensidade da doença no campo ocorre tanto pelo surgimento de novas lesões como pela expansão das mais velhas, que podem coalescer, atingindo uma área considerável da folha. Nos pecíolos e caules, os sintomas são semelhantes. Nos tubérculos as lesões são escuras, de formato irregular, deprimidas e tendem a provocar podridão seca, no entanto, são mais raros (DIAS; IMAUTI, 2005; FILGUEIRA, 2003). Os sintomas causados pelas duas espécies de *Alternaria* (*solani* e *grandis*) não tem diferenças significativas, porém as espécies diferem em relação ao tamanho e morfologia dos conídios.

Sob condição de casa de vegetação a inoculação das duas espécies *A. solani* e *A. grandis* em plantas de batata resultaram em sintomas e intensidade da doença semelhante (RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009). Tais resultados também foram confirmados por Miguel (2012) em 22 clones de batata avaliados *in vitro*. Cardoso (2010) verificou que o aparecimento dos sintomas de *A. grandis* e *A. tomatophila* foi mais rápido quando comparadas às plantas inoculadas com *A. solani*. a autora verificou necrose das células no sítio de inoculação após 12 horas de incubação.

Figura 2 - Sintomas típicos em hastes e folha. Fonte: arquivo SGS do Brasil.

Figura 3 - Sintomas típicos em tubérculos. Fonte: Töfoli et al.(2012).

2.3. Técnicas de manejo e controle da doença

O alto potencial destrutivo e a rápida evolução da doença no campo tornam obrigatória a adoção de medidas racionais e integradas de controle. Nesse sentido, são recomendadas medidas como espaçamento adequado, eliminação de restos culturais, uso batata-semente sadias, escolher materiais menos suscetíveis, controle preventivo com fungicidas, evitar o plantio sucessivo de solanáceas, eliminar tubérculos doentes, entre outras.

As escolhas das variedades no Brasil ainda são baseadas em clones de origem européia (FILGUEIRA, 2008). O autor Töfoli et al. (2012) lista os principais materiais utilizados e seu comportamento conforme a Tabela 2. Miguel (2012) avaliou 22 clones de batata quanto à severidade foliar de isolados de *A. grandis* e *A. solani*, em seu estudo, o autor verificou que: 70% dos clones avaliados foram resistentes aos isolados de *Alternaria* spp, sendo apenas dois clones susceptíveis e um deles, o com Clone PRM 267, foi o único que apresentou comportamento diferenciado quando inoculado pelas duas espécies, sendo classificado como resistente a *A. grandis* e susceptível a *A. solani*.

Tabela 2 – Comportamento de variedades de batata em relação à severidade da doença pinta preta

Comportamento	Variedades
Resistentes	<u>Cupido</u> , Aracy, Catucha, Eliza e Asterix
Moderadamente resistentes	Delta, BRS Ana, <u>BRS Clara</u> , Baronesa, Baraka, Apuã, Itararé, Cristal e Caesar
Moderadamente susceptível	Atlantic e Monalisa
Susceptível	<u>Ágata</u> , Bintje e Achat

Fonte: as palavras em grifos foram incluídas pela autora, modificado de Töfoli et al. (2012)

Entre os fatores que contribuem para a ocorrência de epidemias severas destacam-se: o plantio massivo de cultivares susceptível; a predominância de condições climáticas favoráveis no decorrer das principais safras; a alta capacidade de esporulação do agente causal; a presença de hospedeiros intermediários; a existência de inóculo no decorrer do ano inteiro e a sua fácil disseminação (TÖFOLI et al., 2013b).

No campo, o aumento da intensidade da doença ocorre tanto pelo surgimento de lesões novas como pela expansão das mais velhas, um maior número de lesões pode atingir plantas com deficiências nutricionais como magnésio ou atacadas por vírus (DIAS; IAMAUTI, 2005).

As espécies de *Alternaria* que causam a pinta preta na batateira apresentam um curto ciclo de vida, o que favorece o seu rápido desenvolvimento e o progresso da doença. Dessa forma, a pinta preta pode ser uma doença de difícil controle (STRANDBERG, 1992). A doença tornou-se importante a partir dos anos 50, quando houve a primeira grande expansão da cultura, sendo necessária a aplicação de fungicidas para o seu controle (BOFF, 1988). A aplicação de fungicidas é a principal prática de controle adotado no mundo (STEVENSON, 1994).

2.4. Controle químico

No Brasil, o controle da pinta preta tem sido realizado principalmente com fungicidas à base de tebuconazol, difenoconazol, iprodiona e algumas estrobilurinas como azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina. Os fungicidas protetores, pertencentes às classes dos ditiocarbamatos (mancozebe e metiram) e cloronitrilas

(clorotalonil), têm sido empregados no controle preventivo da doença, seja em aplicações isoladas ou em mistura com produtos específicos (TÖFOLI et al., 2013b).

Fungicidas protetores como Mancozebe e Clorotalonil são a base para a prevenção da doença, tais produtos geralmente são reaplicados a cada 7 ou 10 dias para promover a proteção. Os mesmos devem ser utilizados em rotação com outros produtos. As vantagens destes produtos incluem boa eficácia e modo de ação em múltiplos sítios, o que reduz o risco de desenvolvimento da resistência na população do patógeno. As desvantagens incluem além das doses geralmente mais elevadas a necessidade de manter as reaplicações em função das condições ambientais a exemplo da ocorrência das chuvas, ou mesmo irrigação, que acabam por lavar o produto depositado sobre as folhas reduzindo a proteção (KEMMITT, 2002). Ambos atuam por contato quanto à mobilidade na planta e possuem mecanismo de ação em múltiplos sítios. O clorotalonil faz parte do grupo das cloronitrilas, atualmente muito utilizado no controle de pinta preta, o clorotalonil destaca-se notadamente por sua maior aderência à superfície foliar e considerável capacidade de se redistribuir na planta. Atua em grupos sulfidrilos, impedindo a formação de enzimas (glutathione) e proteínas que atuam na glicólise. Atualmente, clorotalonil tem sido formulado com fungicidas específicos, tais como: metalaxil-M, mandipropamida e dimetomorfe (TÖFOLI et al., 2013b). Como parte do grupo químico dos ditiocarbamatos estão, por exemplo, o mancozebe e o metiram, criados a partir de 1940, eles atuam diretamente inibindo o desenvolvimento micelial e a germinação de esporos e zoósporos, são relacionados a diversos mecanismos relacionados à produção de energia na célula fúngica e inativação de aminoácidos importantes em processos bioquímicos que envolvem enzimas do grupo “tiol”. Esses fungicidas são mais vulneráveis a serem lavados da superfície foliar pela ocorrência de chuvas (TÖFOLI et al., 2013b). Todos os ditiocarbamatos são derivados do ácido carbâmico, o ácido carbâmico não existe livre na natureza e foi sintetizado pela primeira vez em 1920, tendo uso como acelerador do enxofre na vulcanização da borracha (RODRIGUES, 2006).

Os fungicidas do grupo químico fenilpiridinilamina (fluazinam) possuem como mecanismo de ação a interrupção da fosforilação oxidativa, possui ação protetora com pouca atividade curativa e sistêmica, mas com bom efeito residual e estabilidade à chuva (RODRIGUES, 2006). Atua inibindo a germinação de esporângios e conídios, a formação de apressórios, a penetração, o crescimento de

hifas e a esporulação. O produto inibe a respiração desacoplando a fosforilação oxidativa e representa baixo risco de resistência (TÖFOLI, 2011).

Os fungicidas podem atuar como inibidores de vários processos metabólicos vitais ou ter ação específica sobre a célula fúngica causando sua morte (GHINI; KIMATI, 2000). A partir da década de 60 surgiu fungicidas com mecanismo de ação específicos, que podem ser exemplificados como a inibição da biossíntese de esterol, síntese de lipídeos, síntese de ácido nucléico, inibição mitótica e divisão celular, inibição da síntese de proteínas e aminoácidos, e inibição da respiração (VENANCIO et al., 2005; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

Do grupo químico das anilinopirimidinas, o pirimetanil, atua na inibição da produção de metionina e enzimas associadas à patogênese. O efeito inibitório do pirimetanil sobre a germinação de esporos e desenvolvimento do tubo germinativo é limitado e, ainda, a produção de apressório e a penetração no hospedeiro não são afetadas. Entretanto, a aplicação protetora de pirimetanil reduz o número de células do hospedeiro mortas no ponto de infecção. O principal efeito do fungicida pode ser a redução na secreção de enzimas líticas ou a redução na biossíntese e secreção destas enzimas no sítio de penetração (RODRIGUES, 2006).

Pertencente ao grupo químico das dicarboximidas, a procimidona, é um fungicidas que pode apresentar ação curativa e antiesporulante, atua inibindo a germinação de conídios e o desenvolvimento micelial, sendo que, dentro da célula bloqueiam a atividade da enzima NADH citocromo redutase que culmina com a peroxidação de fosfolipídeos constituintes das membranas plasmáticas e mitocondriais, a ação específica lhe confere de médio a alto risco de resistência (TÖFOLI, 2011).

Os fungicidas que atuam na síntese de esterol pertencem ao grupo dos Triazóis (tebuconazol, difenoconazol, propiconazol e flutriafol), Imidazóis (imazalil e prochloraz), Pirimidas (fenarimol), sendo os dois primeiros considerados os mais importantes (GOULART, 1995). O ergosterol é o principal esterol presente na membrana celular, aumenta as propriedades de 18 bicamadas lipídica tornando-as menos fluída, e a redução da disponibilidade de ergosterol resulta no rompimento da membrana e no extravasamento de solutos iônicos com conseqüente morte da célula (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

Os chamados fungicidas do grupo dos inibidores da quinona Qol's, atuam na respiração mitocondrial se ligando ao sítio Qo do citocromo bc1 e são uma importante classe de fungicidas registrados para controle de *Alternaria* spp (KEMMITT, 2002; TÖFOLI et al., 2013b). Em batata e tomate, estes incluem ativos como azoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina, fenamidona e famoxadona. São desenvolvidos a partir de compostos naturais, esses fungicidas agem inibindo, em especial, a germinação de esporos e o desenvolvimento de tubos germinativos e apressórios (TÖFOLI et al., 2013b). Em geral este grupo é prontamente absorvido pelos tecidos das plantas e funciona preventivamente parando a infecção por meio da inibição na germinação dos esporos. Tais fungicidas apresentam médio a alto risco no desenvolvimento de resistência de acordo com o FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). Nos Estados Unidos e na Europa, isolados de *A. solani* tem sido encontrados com significativa redução de sensibilidade a Qol fungicidas, dessa forma, o FRAC desencoraja o uso curativo do produto e sugere que o mesmo deve ser utilizado em conjunto ou rotação com produtos que atuam em diferentes sítios (KEMMITT, 2002).

Os fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (SDHIs) também atuam inibindo a respiração, no entanto, em um diferente sítio (II), não havendo resistência cruzada com o último grupo descrito. Os ingredientes ativos mais utilizados deste grupo são fluxapiraxade, boscalida e fluopiram. São fungicidas relativamente novos no mercado e classificados pelo FRAC como médio a alto risco quanto ao surgimento de resistência, com isso, deve ser manejado de forma similar aos Qols. O fungicida boscalida possui ação específica sobre a pinta preta e atua em todas as etapas do desenvolvimento fúngico e da infecção (elongação do tubo germinativo, formação de apressório, esporulação, crescimento micelial e germinação do esporo), lhe conferindo, portanto, ação sistêmica e protetora (TÖFOLI, 2011).

O emprego de fungicidas seletivos é importante no manejo, porém, também apresenta sua fragilidade, por atuarem em uma ou poucas etapas do metabolismo, a chance de surgir resistência na população do fungo é elevada (RODRIGUES et al., 2007; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007), principalmente quando o uso do fungicida é intensivo. A resistência aos fungicidas é caracterizada pela adaptação estável e herdável de um fungo a uma determinada dose de fungicida, o qual previamente proporcionava um bom controle. O desenvolvimento da resistência depende da frequência de isolados não sensíveis, e do grau de resistência,

magnitude da diferença de sensibilidade dos isolados sensíveis e não sensíveis sendo expresso pelo Fator de Resistência ($FR = CI_{50} \text{ de isolados não sensíveis} / CI_{50} \text{ de isolados sensíveis}$ ou $MCI \text{ de isolados não sensíveis} / MCI \text{ de isolados sensíveis}$, onde CI_{50} é a concentração efetiva capaz de causar mortalidade de 50% da população e MCI é a mínima concentração inibitória) (GHINI; KIMATI, 2000).

A grande aposta atual das grandes empresas é lançar no mercado formulações que combinam dois ou três ativos, que geralmente atuam em diferentes sítios de ação e reduz o risco de resistência a campo. Neste grupo estão os produtos comerciais Orkestra (fluxapiroxade + piraclostrobina), Opera Ultra (piraclostrobina + metconazol), Cabrio top (piraclostrobina + metiram) e Bellis (piraclostrobina + boscalida), destes, apenas o fungicida Opera Ultra não está oficialmente registrado para a cultura da batata, mas há relatos na literatura de sua eficácia para *Alternaria grandis* (SOUZA et al., 2014). Töfoli et al. (2016b), em trabalho recente publicado, comentam sobre a efetividade do uso do produto Orkestra, sendo que, os dois ingredientes ativos atuam em sítios específicos do sistema respiratório, causando o bloqueio completo da produção de energia na célula fúngica. O produto apresenta alta absorção e mobilidade na planta, o que permite uma alta proteção dos tecidos. Além de atuarem sobre o patógeno, fluxapiroxade e piraclostrobina apresentam benefícios positivos à fisiologia das plantas e contribuem de forma direta para maiores níveis de produtividade e qualidade. Töfoli et al. (2016b) em seu trabalho, realizado em campo, o fungicida fluxapiroxade + piraclostrobina apresentou os melhores resultados de controle, quando comparado a algumas misturas ou aplicações seqüenciais utilizadas em produtores com os ingredientes ativos piraclostrobina + metconazol, azoxistrobina + difenoconazol, metconazol, boscalida + metconazol, famaxadona + mancozebe, piraclostrobina + metiram e boscalida + cresoxim metílico, sendo que, esta última combinação apresentou o pior resultado de controle em condições de campo.

Incluindo os já citados acima, temos hoje 135 produtos comerciais registrados para batata (*Alternaria solani*) no Brasil, conforme a Tabela 3. Os produtos são apresentados em formulação simples ou mistura, com os seguintes ingredientes ativos: azoxistrobina, boscalida, piraclostrobina, bromuconazol, captana, cimoxanil, famaxadona, ciprodinil, clorotalonil, cresoxim-metílico, difenocozanol, fenamidona, fluazinam, flutriafol, flupiroxade, hidróxido de cobre, iminonactadina, iprodiona,

mancozebe, lauril éter sulfato de sódio, metconazol, metiram, miclobutanil, oxiclreto de cobre, procimidona, pirimetanil, propinebe, tebuconazol, tetraconazol e trifloxistrobina (AGROFIT, 2016). Sendo todos registrados para a espécie *Alternaria solani*. Atualmente o MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, por meio da SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA determina pela INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 42, DE 5 DE DEZEMBRO DE 2011 a necessidade da apresentação de estudos de eficácia e praticabilidade agrônoma para produtos em fase de pré-registro, no entanto, curiosamente mesmo diante de estudos que comprovam a predominância de outras espécies os registros continuam sendo protocolados para *Alternaria solani*.

Tabela 3 – Levantamento dos produtos comerciais disponíveis (AGROFIT, 2016) por ingrediente ativo para controle de *Alternaria solani* em batata

Ingrediente ativo (grupo químico)	Quantidade de produtos comerciais disponíveis
azoxistrobina (estrobilurina) + difenoconazol (triazol)	1
azoxistrobina (estrobilurina)	3
Bacillus pumilus (biológico)	1
Boscalida (anilida) + piraclostrobina (estrobilurina)	1
Boscalida (anilida)	1
bromuconazol (triazol)	1
captana (dicarboximida)	1
cimoxanil (acetamida) + famoxadona (oxazolidinadiona)	1
ciprodinil (anilinopirimidina)	1
clorotalonil (isoflalonitrila) + oxicloreto de cobre (inorgânico)	1
clorotalonil (isoflalonitrila)	19
cresoxim-metílico (estrobilurina) + tebuconazol (triazol)	1
cresoxim-metílico (estrobilurina)	2
difenoconazol (triazol)	4
famoxadona (oxazolidinadiona) + mancozebe (alquilenobis(ditiocarbamato))	2
fenamidona (imidazolinona) + Cloridrato de propamocarbe (carbamato)	1
fluazinam (fenilpiridinilamina)	6
flutriafol (triazol)	8
fluxapiroxade (carboxamida) + piraclostrobina (estrobilurina)	1
hidróxido de cobre (inorgânico)	9
iminocadina (guanidina)	1
iprodiona (dicarboximida) + pirimetanil (anilinopirimidina)	1
iprodiona (dicarboximida)	2
lauril éter sulfato de sódio (Alquil éter sulfato) + Golias (biológico)	1
mancozebe (alquilenobis(ditiocarbamato)) + oxicloreto de cobre (inorgânico)	1
mancozebe (alquilenobis(ditiocarbamato))	14
metconazol (triazol)	1
metiram (alquilenobis(ditiocarbamato)) + piraclostrobina (estrobilurina)	1
metiram (alquilenobis(ditiocarbamato))	1
miclobutanil (triazol)	2
oxicloreto de cobre (inorgânico)	13
piraclostrobina (estrobilurina)	1
pirimetanil (anilinopirimidina)	1
procimidona (dicarboximida)	3
propinebe (alquilenobis(ditiocarbamato))	1
tebuconazol (triazol) + trifloxistrobina (estrobilurina)	1
tebuconazol (triazol)	23
tetraconazol (triazol)	2

Total

135

Fonte: Agrofit (2016)

Dados de sensibilidade *in vitro* servem para levantamentos sistemáticos quanto ao comportamento da espécie em determinadas regiões diante do histórico do manejo utilizado. Reis et al. (2015) estudaram a relação entre a CI_{50} e a concentração de calda recomendada em bula para fungicidas dos grupos IDMs, IQes, um carbamato e um benzimidazol diante dos seguintes fungos: *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*, *D. siccas*, *Fusarium graminearum*, *Puccinia triticina*, *Exserohilum turcicum*, *Phakopsora pachyrhizi* e *Corynespora cassicola*. Os autores verificaram que a relação entre a Concentração de campo / CI_{50} variou de 33,9 (*D. siccas* e trifloxistrobina) a 500.000 (*E. turcicum* e iprodiona) vezes superior a determinada em laboratório, concluindo que a CI_{50} não teve relação com a concentração usada no campo e, por isso, deve ser usada na comparação da potência entre fungicidas e no monitoramento da sensibilidade de fungos. Na Tabela 4 estão os resultados das concentrações de calda para os produtos utilizados conforme recomendação para a cultura da batata em bula comercial.

Tabela 4 – Concentrações de calda recomendadas oficialmente na bula comercial dos produtos testados.

Produto Comercial	Ingrediente ativo	Recomendação comercial para a cultura
Folicur 200 EC	Tebuconazol	200 mg do i.a L^{-1}
Frowncide 500SC	Fluazinam	300 a 3000 mg do i.a L^{-1}
Daconil	Clorotalonil	1250 a 3000 mg do i.a L^{-1}
Amistar top	Azoxistrobina + Difenconazol	108 a 325 mg do i.a L^{-1}
Mythos	Pirimetanil	300 a 420 mg do i.a L^{-1}
Sumilex	Procimidona	375 a 1000 mg do i.a L^{-1}
Cabrio top	Metiram+Piraclostrobina	1125 a 6000 mg do i.a L^{-1}
Manzate	Mancozebe	3000 a 7500 mg do i.a L^{-1}
Cantus	Boscalida	62,5 a 750 mg do i.a L^{-1}
Orkestra	Fluxapiraxade + Piraclostrobina	200 a 437 mg do i.a L^{-1}
Comet	Piraclostrobina	125 a 200 mg do i.a L^{-1}

Fonte: Agrofite (2016).

2.4.1. Sensibilidade *in vitro* de isolados de *A. solani* e *A. grandis*.

A fungitoxicidade de fungicidas é uma propriedade inerente da substância química e se caracteriza pela toxicidade aos fungos em baixas concentrações. Parâmetros como CE_{50} (concentração efetiva ou eficaz, que promove a inibição de 50% do desenvolvimento dos microorganismos), DE_{50} (dose efetiva), DL_{50} (dose letal), CL_{50} (concentração letal), CI_{50} (concentração inibitória) ou CMI (concentração mínima inibitória) podem definir a fungitoxicidade de uma substância química (EDGINGTON; KHEW; BARRON, 1971; REIS; REIS; CARMONA, 2010). Quanto menor o valor da CI_{50} maior é a ação fungicida. A CI_{50} é específica para uma determinada substância química e um determinado patógeno. No patógeno está atrelada à genética e à fisiologia do fungo. No entanto, pode ter seu valor alterado com o tempo de uso (GHINI; KIMATI, 2000; FRAC, 2016).

A fungitoxicidade e a especificidade são as características mais importante dos fungicidas, não importando se é protetor, sistêmico ou mesostêmico. Ele deve ser letal ao patógeno, se possível, em baixas concentrações. A prova definitiva de eficácia de qualquer fungicida somente é conhecida quando são aplicados no campo em áreas comerciais; no entanto, muitas das possibilidades de êxito podem ser conhecidas no laboratório. Uma destas determinações é a curva de resposta-dose (RD), que pode ser estabelecida mediante o emprego de diversas técnicas, como por exemplo, germinação de esporos e crescimento micelial *in vitro* em função de diferentes concentrações do produto tóxico. Com a RD é possível conhecer a toxicidade de um produto para diferentes fungos, a dose letal mínima e máxima, e a dose efetiva média (DE_{50}) para a população. Nem toda substância química tem a propriedade de ser tóxica a fungos, para que sejam, é necessário que satisfaçam os critérios estabelecidos por Edginton et. al. (1971), (AZEVEDO, 2007).

A concentração inibitória média pode ser estudada tanto *in vitro* quanto *in vivo*, geralmente *in vitro* utiliza-se fungo necrotróficos e *in vivo*, fungo biotróficos. Os parâmetros geralmente avaliados são: crescimento micelial, germinação de conídios, viabilidade de esporos, número de lesões (*in vivo*) e número de urédias (*in vivo*), (REIS; REIS; CARMONA, 2010).

A fungitoxicidade à *Alternaria* spp. tem sido avaliada tanto no Brasil como em outras partes do mundo. Stepanović et al. (2015) testaram a germinação de cinco isolados de *A. solani* que foram coletados em diferentes partes da Servia, avaliando

crescimento micelial. Os autores obtiveram, por regressão linear, a CI_{50} para clorotalonil ($3 - 4,54 \text{ mg.L}^{-1}$), difenoconazole ($0,022 - 0,037 \text{ mg.L}^{-1}$) e piraclostrobina ($0,003 - 0,0041 \text{ mg.L}^{-1}$).

Miles et al. (2013) testaram a sensibilidade de 39 isolados coletados de diferentes regiões de Idaho contra 12 fungicidas, dentre os quais, encontraram-se isolados resistentes a fungicidas como boscalida, azoxistrobina, trifloxistrobina, piraclostrobina, pirimetanil e clorotalonil. Holm et al. (2002), testaram a sensibilidade de 31 isolados de *A. solani*, durante os anos de 2008 e 2009, contra os fungicidas mancozebe e clorotalonil, onde se observou pouca variação dentro do grupo de isolados testados para o mancozebe durante as duas estações de cultivo, no entanto, os isolados submetidos ao clorotalonil apresentaram grande variação dos valores de CI_{50} , sendo que, 5 deles foram considerados insensíveis.

Töfoli, Domingues e Kurozawa (2003) estudaram a ação “*in vitro*” de 16 fungicidas contra isolados de *Alternaria solani* provenientes de tomateiro. Os produtos a base de iprodione, ciprodinil, procimidona, fluazinam e pirimetanil apresentaram elevados níveis de inibição para crescimento micelial e germinação de conídios. Metconazol, tebuconazol, difenoconazol e procloraz proporcionaram elevada inibição do crescimento micelial e parcial com relação à germinação de conídios. Cresoxim - metílico, azoxistrobina, piraclostrobina+metiram, fenamidona e famoxadona+mancozebe apresentaram comportamento inibitório intermediário com relação ao crescimento micelial e inibição completa da germinação de conídios, a partir de 1 mg.L^{-1} . Clorotalonil e mancozebe promoveram os menores níveis de inibição; porém, apresentaram comportamento sempre superior à testemunha.

Lélis et al. (2006) avaliaram a sensibilidade de isolados brasileiros de *A. solani* a mancozebe, clorotalonil e azoxistrobina, e observaram grande variação entre os isolados quanto à reação aos fungicidas; neste estudo, os valores de CI_{50} variaram de 3,8 a 69 mg.L^{-1} (mancozebe), 10,1 a $287,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (clorotalonil) e 0,014 a $0,129 \text{ mg.L}^{-1}$ (azoxistrobina).

O efeito do fungicida mancozebe sobre crescimento micelial de *A. solani* também foram testados por Pereira Santana et al. (2008), sendo avaliados 30 isolados de *A. solani* nas doses de 25; 50; 100 e 1000 µg/ml , onde, 95% dos isolados tiveram valores de CI_{50} entre 1 e 25 µg/ml , desses isolados, 40% são de tomateiro e 60% de batateira. Há evidências na prática que demonstram maior fungitoxicidade e efeito residual do produto Clorotalonil quando comparado ao

mancozebe (TÖFOLI ; MELO; DOMINGUES, 2013); no entanto, Cardoso et al. (2008) relataram haver isolados que crescem em elevadas concentrações do produto Clorotalonil, na ocasião testou-se as concentrações de 25; 50; 100 e 1000 µg/ml. Os valores de Cl_{50} variaram de 1,84 a 1357,5 mg/l. A faixa de Cl_{50} de maior frequência foi a de 101 a 500 mg/L. Quanto aos hospedeiros de origem, a Cl_{50} para 56,3% dos isolados de batateira foi estimada entre 101 e 500 mg/L. Para 8 isolados, a Cl_{50} foi maior que 501 mg/L. Para 39,4% dos isolados de tomateiro a Cl_{50} estimada foi entre 101 e 500 mg/L e para 6 isolados a Cl_{50} foi maior que 501mg/L. Os autores ressaltam que não há relatos de resistência a campo do fungo *A. solani* ao clorotalonil. No entanto, verificou-se haver isolados capazes de crescer em elevadas concentrações desse fungicida em testes *in vitro*. Um estudo mais recente conduzido por Machado (2016) avalia 46 isolados (crescimento micelial) e 32 isolados (germinação de conídios) de *A. grandis*, sendo que, o autor relata que todos os isolados foram sensíveis ao clorotalonil.

Pereira et al. (2009a), em estudos *in vitro*, avaliaram a sensibilidade de 100 isolados de *Alternaria* spp. coletados de batateira e tomateiro de diferentes regiões do Brasil ao azoxistrobina. Neste estudo, a germinação relativa dos conídios foi avaliada em ágar-água (2%) acrescido a 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg.L⁻¹ diluído em acetona a 0,1%. Quantificou-se a germinação de 50 conídios e em cada concentração estimou-se a Cl_{50} por meio da regressão linear. Entre os isolados de batateira, 78,7% tiveram valores de Cl_{50} na classe <1 mg.L⁻¹, 8,2% na classe entre 1 e 10 mg.L⁻¹ e 13,1% na classe > 10 mg.L⁻¹. Entre os isolados de tomateiro, 73,5% tiveram valores de Cl_{50} na classe <1, 14,7% na classe 1 e 10 e 11,8% na classe > 10 mg.L⁻¹. Foi detectada a presença de isolados menos sensíveis oriundos das regiões Sudeste e Centro-Oeste. Pereira et al. (2009b) avaliaram o crescimento miscelial de 30 isolados de *A. solani* de batateira e tomateiro quanto a sua sensibilidade ao tebuconazol constatando que houve grande variação, sendo que, entre os isolados de tomateiro, 31% tiveram valores de Cl_{50} na classe <1, 38% na classe entre 1 e 10, e 31% na classe >10 µg/ml. Já os isolados de batateira, 41% tiveram valores de Cl_{50} na classe <1, 23% na classe entre 1 e 10, e 36% na classe >10 µg/ml o que evidencia a existencia de isolados insensíveis a tebuconazole na população de *A. solani* no Brasil.

Villaschi et al (2014a) avaliaram a sensibilidade (inibição da germinação dos conídios) do ingrediente ativo boscalida em 13 isolados de *A. grandis* provenientes da Bahia, Paraná e Minas Gerais, sendo que, para 11 deles a CI_{50} foi superior a 10 mg L⁻¹ constatando grande evidência da perda de sensibilidade ao boscalida. O autor Machado (2016) testou a sensibilidade de 36 isolados de *A. grandis* aos boscalida, destes, 8 isolados foram considerando resistentes. Há relatos de perda de sensibilidades para *A. solani* em outros países como Estados Unidos (MILES et al., 2013) e na China (SHI et al., 2015).

Dado o elevado risco da seleção de indivíduos de menor sensibilidade, recomenda-se a adoção de práticas de uso racional dos fungicidas de sítio-específico. Como a aplicação de fungicidas na cultura da batata é intensa, é preciso evitar os casos de resistência aos fungicidas específicos, utilizando-os de forma alternada ou com outros produtos inespecíficos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios da SGS do Brasil localizado em Piracicaba, SP e no Laboratório de Patologia de Sementes, localizados no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

3.1. Obtenção dos isolados de *A. grandis* e *A. solani*

Os isolados de *Alternaria grandis* foram coletados a campo, de plantas de batata com sintomas típicos nas folhas, a coleta ocorreu nos municípios de Uberaba, no estado de Minas Gerais, Londrina, no estado do Paraná, e Avaré, no estado de São Paulo. O isolado de *Alternaria solani* foi fornecido pela empresa Bayer, procedentes de folhas de batata.

Para a obtenção dos isolados provenientes de plantas sintomáticas, pequenos fragmentos de folha foram lavados em água corrente, imersos em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e lavados em água destilada e esterilizada. Os fragmentos das plantas foram depositados em caixas do tipo Gerbox, contendo substrato de papel de filtro umedecido. Após 48 horas de incubação, sob fotoperíodo alternado de 12 horas de luz e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, porções de micélio do fungo foram retiradas e transferidas para placas de Petri 90 X 15 mm contendo meio de cultura BDA, obtendo-se colônias puras do patógeno. A confirmação da identificação do patógeno foi realizada através da observação de conídios em lâminas no microscópio óptico. Os isolados foram denominados conforme o estado de origem como AG01-MG; AG02-PR; AG03-SP e AS01-SP.

Todos os isolados obtidos foram preservados pelo método de conservação em água destilada - *Castellani* (CASTELLANI, 1939 apud FIGUEIREDO, 1967), até a realização dos experimentos.

3.2. Produtos utilizados

Foram selecionados produtos comerciais amplamente utilizados na cultura da batata, conforme evidências do mercado sobre a importância atual do uso em campo.

3.3. Sensibilidade *in vitro* de *A. solani* e *A. grandis* a fungicidas

3.3.1. Interferência *in vitro* de fungicidas no crescimento do micélio

Foi avaliado o efeito de fungicidas sobre o crescimento dos isolado; utilizou-se o método da incorporação do fungicida no meio de cultura fundente. Os fungicidas utilizados foram selecionados com base nos ingredientes ativos registrados para controle de *Alternaria solani* na cultura da batata (AGROFIT, 2016). Assim, foram avaliados fungicidas comerciais, listados na Tabela 5.

As diluições dos fungicidas foram realizadas em água destilada e esterilizada, de acordo com a metodologia descrita por Camargo (2013) e Ishizuka (2016). Foi calculada a quantidade de produto comercial necessária para a obtenção de uma suspensão estoque, de 10.000 mg L⁻¹ de ingrediente ativo. Partindo da solução estoque foram preparadas as diluições seriadas, obtendo-se as suspensões com as concentrações de 1000, 100, 10, 1, 0,1 mg L⁻¹. Para os fungicidas com mistura de ingrediente ativo, considerou-se a soma das concentrações no cálculo.

As soluções estoques foram adicionadas ao meio de cultura BDA, ainda em estado fundente (60° C).

Inicialmente, as concentrações do meio de cultura, foram 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,001 mg L⁻¹. Após, as doses foram ajustadas conforme a CI₅₀ de cada fungicida. As concentrações do meio BDA utilizadas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 5 - Relação de fungicidas avaliados *in vitro* no crescimento micelial e germinação de *Alternaria solani* e *Alternaria grandis*.

Ingrediente Ativo	Concentração do produto comercial	Produto Comercial	Grupo Químico	Mobilidade	Mecanismo de ação	Risco de resistência (FRAC)
Tebuconazol	200 g/l	Folicur 200 EC	triazol	sistêmico	inibidor da síntese de ergosterol	médio
Fluazinam	500 g/l	Frownicide 500	fenilpiridinilamina	contato	fosforilação oxidativa	baixo
Clorotalonil	750 g/kg	Daconil	cloronitrila	contato	múltiplos sítio de ação	baixo
Azoxistrobina + Difenconazol	200 + 125 g/l	Amistar top	estrobilurina + triazol	mesostêmico + sistêmico	inibição da respiração complexo III (QoI) + inibidor da síntese de ergosterol	alto + médio
Pirimetanil	300 g/l	Mythos	anilino pirimidina	translaminar	biossíntese da metionina	médio
Procimidona	500 g/kg	Sumilex	dicarboximida	translaminar	síntese de lipídeos e membrana	médio a alto
Metiram+Piraclostrobina	550 + 50 g/kg	Cabrio top	ditiocarbamato + estrobilurina	contato + mesostêmico	múltiplos sítio de ação + inibição da respiração complexo III (QoI)	baixo + alto
Mancozebe	750 g/kg	Manzate	ditiocarbamato	contato	múltiplos sítio de ação	baixo
Boscalida	500 g/kg	Cantus	carboxamida	sistêmico	Inibição da respiração - Complexo II	médio a alto
Fluxapiroxade + Piraclostrobina	167 + 333 g/l	Orkestra	carboxamida + estrobilurina	sistêmico + mesostêmico	Inibição da respiração - Complexo II + inibição da respiração complexo III (QoI)	médio a alto + alto
Piraclostrobina	250 g/l	Comet	estrobilurina	mesostêmico	inibição da respiração complexo III (QoI)	alto

Fonte: FRAC; Agrofite (2016)

Tabela 6 – Concentrações dos fungicidas utilizados nas diluições seriadas para avaliar a sensibilidade de *A. grandis* e *A. solani*.

Ingrediente Ativo	Concentrações
	Utilizadas (ppm ou mg L ⁻¹)
Tebuconazol	20, 15, 10, 5, 2,0 , 0,1 e 0
Fluazinam	1, 0,1, 0,05 , 0,025, 0,01 e 0
Clorotalonil	175, 150, 125, 100, 75 , 50 e 0
Azoxistrobina + Difenconazol	100, 10, 1 , 0,1 e 0
Pirimetanil	1, 0,1, 0,01, 0,005 e 0
Procimidona	1,0,1, 0,01, 0,005 e 0
Metiram+Piraclostrobina	100,10, 1, 0,01, 0,05 e 0
Mancozebe	50, 25, 10, 1 , 0,5 e 0
Boscalida	20, 15, 10, 5, 2,0 , 0,1 e 0
Fluxapiroxade + Piraclostrobina	5, 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0
Piraclostrobina	2, 1,5, 1, 0,5, 0,2, 0,01 e 0

Foram utilizadas placas de Petri 90 X 15 mm, quatro placas por tratamento, sendo avaliados os quatro isolados de *Alternaria* spp. Discos de micélio (5mm) em desenvolvimento foram repicados, no centro da placa, após 24 horas do preparo do meio. As placas foram incubadas em câmara de crescimento, com temperatura de 24 ±1°C e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada após a testemunha atingir um dos bordos da placa, medindo-se o diâmetro das colônias em dois sentidos ortogonais, com o auxílio de um paquímetro digital.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo que, cada parcela foi representada por uma placa de Petri. A partir dos dados obtidos, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos tratamentos (PIC), em relação à testemunha, utilizando a fórmula descrita por Bastos (1997):

$$PIC = \frac{\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratamento}}{\text{crescimento da testemunha}} \times 100$$

Os dados foram submetidos à análise de regressão pelo programa Assistat e Excel. Através das equações de regressão, foram estimados os valores de CI_{100} e CI_{50} de cada fungicida. O índice de CI_{50} descreve a concentração de ingrediente ativo capaz de inibir 50% do crescimento micelial do fungo. O índice de CI_{100} descreve a concentração de ingrediente ativo capaz de inibir 100% do crescimento micelial do fungo. A sensibilidade dos isolados aos fungicidas foi classificada de acordo com os critérios de Edgington et al. (1971), conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Escala de Edgington et al. (1971) utilizada para classificar a eficiência de fungicidas e sensibilidade de fungos a fungicidas.

CI_{50}	Eficiência	Sensibilidade
<1	Altamente eficiente	Altamente sensível (AS) ⁽¹⁾
1-10	Moderadamente eficiente	Moderadamente sensível (MS) ⁽¹⁾
10-50	Pouco eficiente	Pouco sensível (PS) ⁽¹⁾
>50	Ineficiente	Insensível (IN) ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Abreviações utilizadas na classificação dos resultados, Tabela 8.

3.3.2. Teste de sensibilidade sobre a germinação de conídios de *Alternaria spp.* a fungicidas

Os fungicidas foram incorporados ao meio Agar - água ainda em estado fundente (60° C) nas concentrações discriminatórias de 0; 0,1; 1; 10 e 100 mg.L⁻¹.

Em 24 horas após o preparo do meio realizou-se a deposição de 10 mL de uma suspensão de 10³ conídios por mL, sendo utilizadas três placas por tratamento, sendo cada placa considerada como uma repetição. As placas foram mantidas em câmara BOD por 24 horas, a 25° C e ausência de luz. Em seguida, as placas foram observadas em microscópio óptico, determinando-se a germinação dos conídios em 300 unidades observadas por placa de Petri. Foram considerados germinados os conídios que apresentarem tubos germinativos iguais ou superiores ao comprimento do conídio analisado. Os dados foram transformados em porcentagem de inibição da germinação de conídios em relação à testemunha, de forma similar ao cálculo do PIC, citado no item anterior (TÖFOLI; DOMINGUES; KUROSZAWA, 2003).

3.4. Análises dos dados obtidos

Os delineamentos experimentais foram inteiramente aleatorizados.

A comparação dos resultados foi realizada por meio da frequência de classes de sensibilidade, não sendo, portanto, necessário a aplicação de testes de comparação de médias.

As regressões foram realizadas através do programa estatístico Assistat versão beta 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sensibilidade *in vitro* de *Alternaria* spp. a fungicidas

Os resultados de CI_{50} e CI_{100} dos isolados testados encontram-se nas Tabelas 8, 9 e Figura 4, sendo também representados graficamente nas Figuras de 5 a 26.

De maneira geral, o comportamento do isolado de *A. solani* não se mostrou diferente dos isolados de *A. grandis* testados em termos de classificação da CI_{50} pela escala proposta por (EDGINGTON; KHEW; BARRON, 1971), sendo que ocorreu muita variação entre os tratamentos, conforme demonstrado na frequência das classes exposta na Figura 4. São diversos os trabalhos encontrados na literatura que evidenciam, em conjunto com este trabalho, que a variabilidade da sensibilidade do isolado pode não ser inerente à espécie. A sensibilidade pode variar muito dentro de cada espécie à depender da pressão de seleção (manejo) de cada região/área, dentro outros fatores genéticos que promovem a variabilidade dentro da população. Atualmente o manejo da pinta preta tem obtido bons resultados de controle em campo e mesmo diante de evidências sobre a perda de sensibilidade desta espécie ao ingrediente ativo boscalida, este ativo ainda continua sendo fortemente utilizado e é considerado peça chave no manejo (informação pessoal). Dessa forma, dados de sensibilidade *in vitro* servem para levantamentos sistemáticos quanto ao comportamento da espécie em determinadas regiões diante do histórico do manejo utilizado.

As mudanças de sensibilidade podem ser dinâmicas e deverão ser monitoradas ano a ano nas mesmas regiões; isso poderá dar suporte a alterações nas medidas de manejo. É possível compreender o histórico recente de sucesso no controle desta doença, diante do forte manejo químico empregado nesta cultura, uma vez que, a cultura é muito susceptível a outras doenças de grande agressividade; com isso, o manejo a campo funciona, iniciando com uso de produtos protetores (amplo espectro de ação sobre outras espécies fungicas) e seguindo com o uso de produtos mais específicos, isolados ou em misturas.

Figura 4 – Levantamento da frequência das classes de sensibilidade (crescimento micelial) por isolado testado, diante dos tratamentos fungicidas. AS - (Altamente sensível; S – Sensível; MS – Moderadamente sensível; PS – Pouco sensível e IN - Insensível

Todos os isolados testados foram altamente sensíveis aos ingredientes ativos fluazinam, pirimetanil, procimidona e piraclostrobina. Os resultados se repetiram durante a avaliação da germinação dos conídios, sendo que, para estes produtos a CI_{50} ficou inferior a 0,1 ou a 1 $mg L^{-1}$. Não necessariamente o uso destes produtos em mistura com outros ingredientes ativos proporcionou um melhor resultado.

Os isolados AS01, AG01 e AG03 apresentaram-se moderadamente sensível ao fungicida tebuconazol, todos mantiveram a CI_{50} entre 2,22 e 2,75 $mg L^{-1}$, já o isolado AG02 mostrou-se altamente sensível à este triazol (CI_{50} de 0,58 $mg L^{-1}$). Os resultados são condizentes àqueles publicados por Pereira et al. (2009b); no entanto, no presente estudo, nenhum isolado apresentou-se insensível. A inibição da germinação dos conídios, na ordem de 50%, ocorre: entre 1 e 10 $mg L^{-1}$ para os isolados AS01 e AG01, em concentração inferior a 1 $mg L^{-1}$ para o isolado AG02 e entre 10 e 100 $mg L^{-1}$ para o AG03.

O pirimetanil, pertencente ao grupo da anilinopirimidina, apresentou-se altamente eficiente na inibição do crescimento micelial de todos os isolados testados. O ingrediente ativo ainda mostrou-se altamente eficiente na inibição da germinação dos conídios, a partir de 0,1 $mg L^{-1}$, sendo que, a partir da dose de 1 $mg L^{-1}$ 100% dos conídios foram inibidos para todos os isolados testados.

O mancozebe mostrou-se moderadamente eficiente (AS01 e AG03) e pouco eficiente (AG01 e AG02) no controle *in vitro* dos isolados testados. Os estudos

encontrados na literatura demonstram faixas de sensibilidade muito similares à este estudo (LÉLIS et al., 2006; PEREIRA SANTANA et al., 2008; TÖFOLI ; MELO; DOMINGUES, 2013). Quanto à germinação dos conídios, a inibição a partir de 50% foi obtida entre as concentrações de 10 e 100 mg L⁻¹ (AS01, AG01 e AG03) e em dose superior a 100 mg L⁻¹ para o isolado AG02.

O fungicida clorotalonil, assim como o mancozebe, é reconhecido pelo mecanismo de ação em múltiplos sítios; ambos são amplamente utilizados em campo no tratamento preventivo de pinta preta; no entanto, diferente dos resultados obtidos para mancozebe, todos os isolados demonstraram insensibilidade ao clorotalonil, dados que foram confirmados pela avaliação de crescimento micelial e germinação dos conídios. Há evidências, na prática, que demonstram maior fungitoxicidade e efeito residual do produto clorotalonil quando comparado ao mancozebe (TÖFOLI ; MELO; DOMINGUES, 2013), no entanto, Cardoso et al. (2008) relataram haver isolados que crescem em elevadas concentrações do produto Clorotalonil; na ocasião, testaram-se as concentrações de 25; 50; 100 e 1000 µg/ml. Os valores de CI₅₀ variaram de 1,84 a 1357,5 mg/l. No caso destes fungicidas múltiplos sítios, não costuma falar em resistência, já que a identificação do gene responsável por tal mutação se faz impraticável.

O ingrediente ativo boscalida mostrou-se moderadamente eficiente para o isolado AS01 (CI₅₀ 1,61 mg L⁻¹) e pouco eficiente para todos os isolados de *A. grandis* testados quanto a inibição do crescimento miscelial. Resultados similares foram encontrados para a inibição da germinação dos conídios, uma vez que, na concentração máxima testada de 100 mg L⁻¹ apenas o isolado AS01 foi inibido em 99,7%, já os isolados de *A. grandis* tiveram inibição inferior a 30%. Os resultados obtidos para *A. grandis* são condizentes com os relatos apresentados na literatura (VILLASCHI et al., 2014b), no entanto, existem relatos de perda de sensibilidade e resistência de isolados de *A. solani* ao boscalida (MILES et al., 2013 e SHI et al., 2015), o que sugere que a diferença de sensibilidade pode ser encontrada em diferentes níveis dentro da população de cada espécie. Os resultados obtidos para checar a germinação dos conídios variaram muito, sendo que, a inibição de 50% para o isolado AS01 ocorre em doses inferiores a 0,1 mg L⁻¹ , enquanto que, para os demais isolados seria necessários dose superior a 100 mg L⁻¹ .

Os isolados AS01, AG02 e AG03 foram altamente sensíveis à formulação em mistura contendo azoxistrobina e difenoconazol. O isolado AG01 foi moderadamente sensível. O mesmo padrão de controle se refletiu nas avaliações de germinação dos conídios, sendo que, a partir de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, todos os isolados tiveram a germinação dos conídios inibidos na ordem de 89,6% a 100%.

Dentre os produtos em mistura utilizados, a menor eficiência foi demonstrada pela formulação de metiram e piraclostrobina. Neste tratamento, os isolados testados variaram de moderadamente sensíveis (AS01, AG02 e AG03) a pouco sensíveis (AG01). Houve grande variação nos resultados de inibição da germinação dos conídios, sendo que, a inibição de 50% está acima 10 mg L^{-1} para o isolado AG03; entre 1 e 10 mg L^{-1} para os isolados AS01 e AG01; e inferior a 1 mg L^{-1} para o isolados AG02. A inibição de 100% foi apontada a partir de 100 mg L^{-1} para o isolado AS01 e a partir de 10 mg L^{-1} para o isolado AG02. Os isolados AG01 e AG03 tiveram inibição de germinação na ordem de 98% e 96%, respectivamente, a partir da concentração de 100 mg L^{-1} . Com isso, pode-se ainda notar que o tipo de avaliação para determinar a CI_{50} pode interferir diretamente sobre a classe de fungitoxicidade em que o ingrediente ativo será alocado, fator muito relacionado à capacidade dele ou não de interferir em diversas etapas da relação patógeno-hospedeiro, incluindo efeito sobre a elongação do tubo germinativo.

O fungicida fluxapiroxade + piraclostrobina apresentou-se altamente eficiente na inibição do crescimento miscelial para os isolados AS01, AG01 e AG03, com CI_{50} de 0,03, 0,26 mg L^{-1} e 0,17 mg L^{-1} , respectivamente. Já o isolado AG02 apresentou moderada sensibilidade diante de uma CI_{50} de 2,45 mg L^{-1} . No entanto, o fungicida apresentou excelentes resultados de inibição sobre a germinação dos conídios para todos os isolados testados, o que não confirma a presença de sensibilidade diferencial entre os isolados das espécies testadas. Töfoli et al. (2016b) descrevem que esta mistura tem sido promissora no controle a campo da doença, sendo que, até o momento, nenhum estudo de sensibilidade *in vitro* foi publicado.

Sugere-se que estudos de sensibilidade sejam realizados de forma sistemática e anual nas principais regiões produtoras; dados de sensibilidade, quando apresentados em conjunto com um acompanhamento histórico do uso de fungicidas da região, poderão auxiliar na determinação do manejo da espécie predominante, além de identificar tendências de perda de sensibilidade, além de, dar suporte nas recomendações do manejo em determinada localidade.

Tabela 8 - Coeficientes de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) e 100% (CI_{100}) do crescimento micelial de *Alternaria* spp. em relação aos fungicidas.

<i>Fungicidas</i>	<i>Equação de regressão</i>	<i>Isolados de Alt.</i>	R^2	<i>CI (mg L⁻¹)</i>		<i>Sensibilidade</i>
				CI_{50}	CI_{100}	
Tebuconazol	$y = 44,578x + 30,411$	AS01	0,95	2,75	>20	MS
	$y = 36,921x + 35,075$	AG01	0,91	2,54	>20	MS
	$y = 33,799x + 58,004$	AG02	0,91	0,58	17,48	AS
	$y = 35,873x + 37,552$	AG03	0,88	2,22	>20	MS
Fluazinam	$y = 19,975x + 96,05$	AS01	0,77	0,005	1,58	AS
	$y = 27,005x + 102,35$	AG01	0,80	0,012	0,82	AS
	$y = 18,908x + 95,472$	AG02	0,71	0,004	1,74	AS
	$y = 15,659x + 100,19$	AG03	0,91	0,001	0,97	AS
Clorotalonil	$y = 162,79x - 255,13$	AS01	0,82	>50	>50	IN
	$y = 166,67x - 283,94$	AG01	0,92	>50	>50	IN
	$y = 166,98x - 282,97$	AG02	0,88	>50	>50	IN
	$y = 169,45x - 289,29$	AG03	0,89	>50	>50	IN
Pirimetanil	$y = 22,099x + 87,636$	AS01	0,92	0,02	3,63	AS
	$y = 32,618x + 82,135$	AG01	0,77	0,10	3,53	AS
	$y = 26,392x + 87,31$	AG02	0,79	0,04	3,02	AS
	$y = 32,379x + 99,203$	AG03	0,83	0,03	1,06	AS
Azoxistrobina + Difenconazol	$y = 22,099x + 65,536$	AS01	0,94	0,19	>10	AS
	$y = 32,618x + 49,516$	AG01	0,96	1,03	>10	MS
	$y = 26,392x + 60,919$	AG02	0,95	0,38	>10	AS
	$y = 32,379x + 66,823$	AG03	0,88	0,30	>10	AS
Procimidona	$y = 18,915x + 73,807$	AS01	0,94	0,06	>1	AS
	$y = 28,944x + 87,395$	AG01	0,72	0,05	>1	AS
	$y = 23,22x + 81,846$	AG02	0,97	0,04	>1	AS
	$y = 23,189x + 73,41$	AG03	0,96	0,10	>1	AS
Metiram+Piraclostrobina	$y = 30,703x + 38,314$	AS01	0,95	2,40	>100	MS
	$y = 11,134x + 37,21$	AG01	0,91	14,08	>100	PS
	$y = 14,858x + 37,13$	AG02	0,91	7,35	>100	MS
	$y = 10,50x + 40,284$	AG03	0,85	4,06	>100	MS
Mancozebe	$y = 36,163x + 13,97$	AS01	0,75	9,92	>100	MS
	$y = 39,702x + 9,4822$	AG01	0,86	10,48	>100	PS
	$y = 29,39x + 18,404$	AG02	0,61	11,89	>100	PS
	$y = 44,609x + 19,432$	AG03	0,81	4,84	63,99	MS
Boscalida	$y = 30,937x + 43,556$	AS01	0,94	1,61	>100	MS
	$y = 22,256x + 14,819$	AG01	0,82	38,08	>100	PS
	$y = 21,693x + 20,063$	AG02	0,85	22,97	>100	PS
	$y = 22,12x + 19,673$	AG03	0,83	23,50	>100	PS

Tabela 8 - Coeficientes de determinação (R^2) e concentração inibitória de 50% (CI_{50}) e 100% (CI_{100}) do crescimento micelial de *Alternaria* spp. em relação aos fungicidas.

(Continua)

Fungicidas	Equação de regressão	Isolados de Alt.	R^2	CI ($mg\ L^{-1}$)		Sensibilidade
Fluxapiroxade + Piraclostrobina	$y = 17,717x + 76,776$	AS01	0,97	0,03	20,46	AS
	$y = 20,665x + 62,046$	AG01	0,93	0,26	>50	AS
	$y = 35,224x + 36,266$	AG02	0,99	2,45	>50	MS
	$y = 20,061x + 65,565$	AG03	0,87	0,17	>50	AS
Piraclostrobina	$y = 44,578x + 74,989$	AS01	0,95	0,26	3,64	AS
	$y = 36,921x + 71,996$	AG01	0,91	0,25	5,73	AS
	$y = 33,799x + 91,803$	AG02	0,91	0,06	1,75	AS
	$y = 35,873x + 73,426$	AG03	0,88	0,22	5,51	AS

Tabela 9 – Porcentagem de inibição da germinação dos conídios de *Alternaria* spp. em relação a quatro concentrações fungicidas.

Fungicidas	Isolados de Alt.	Concentração ($mg\ L^{-1}$)*				
		0	0,1	1	10	100
Tebuconazol	AS01	0%	19,7%	33,3%	54,7%	99,3%
	AG01	0%	36,7%	43,0%	66,3%	97,3%
	AG02	0%	67,3%	77,7%	99,7%	99,0%
	AG03	0%	12,7%	25,0%	47,3%	96,3%
Fluazinam	AS01	0%	76%	100%	100%	100%
	AG01	0%	43%	100%	100%	100%
	AG02	0%	40%	100%	100%	100%
	AG03	0%	27%	100%	100%	100%
Clorotalonil	AS01	0%	9%	9%	17%	16%
	AG01	0%	3%	7%	12%	12%
	AG02	0%	1%	1%	19%	13%
	AG03	0%	4%	2%	12%	11%
Azoxistrobina + Difenconazol	AS01	0%	100%	100%	100%	100%
	AG01	0%	98,7%	100%	100%	100%
	AG02	0%	100%	100%	100%	100%
	AG03	0%	89,6%	100%	100%	100%
Pirimetanil	AS01	0%	97%	100%	100%	100%
	AG01	0%	76%	100%	99,9%	100%
	AG02	0%	62,7%	100%	100%	100%
	AG03	0%	98%	100%	100%	98,9%

* Média relativa à contagem de conídios não germinados em 300 unidades de esporos por repetição e três repetições por tratamento.

Tabela 9 – Porcentagem de inibição da germinação dos conídios de *Alternaria* spp. em relação a quatro concentrações fungicidas.

(Continua)

Fungicidas	Isolados de <i>Alt.</i>	Concentração (mg L ⁻¹)*				
		0	0,1	1	10	100
Procimidona	AS01	0%	100%	100%	100%	100%
	AG01	0%	100%	100%	100%	100%
	AG02	0%	100%	100%	100%	100%
	AG03	0%	100%	100%	100%	100%
Metiram + Piraclostrobina	AS01	0%	20%	33%	54%	100%
	AG01	0%	37%	44%	66%	98%
	AG02	0%	67%	78%	100%	100%
	AG03	0%	13%	25%	47%	96%
Mancozebe	AS01	0%	12,0%	37,7%	58,7%	61%
	AG01	0%	11,0%	38,3%	49,5%	75%
	AG02	0%	13,3%	40,7%	31,0%	47%
	AG03	0%	10,1%	42,0%	61,0%	67%
Boscalida	AS01	0%	63,3%	72,0%	98,0%	99,7%
	AG01	0%	0,0%	10,0%	46,0%	26,0%
	AG02	0%	15,3%	16,0%	21,0%	11,0%
	AG03	0%	13,3%	11,7%	11,90%	23,3%
Fluxapiroxade + Piraclostrobina	AS01	0%	100%	100%	100%	100%
	AG01	0%	100%	100%	100%	100%
	AG02	0%	100%	99,7%	100%	100%
	AG03	0%	99,3%	100%	99,7%	100%
. Piraclostrobina	AS01	0%	97,8%	100%	100%	100%
	AG01	0%	79,7%	100%	100%	100%
	AG02	0%	72,3%	100%	100%	100%
	AG03	0%	64,9%	100%	100%	100%

* Média relativa à contagem de conídios não germinados em 300 unidades de esporos por repetição e três repetições por tratamento.

Tebuconazol

Figura 5. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Tebuconazol (y= crescimento micelial (%)) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Figura 6. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Tebuconazol (y= inibição de germinação (%)) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Fluazinam

Figura 7. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Fluazinam (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L)).

Figura 8. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Fluazinam (y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L)).

Clorotalonil

Figura 9. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Clorotalonil (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Figura 10. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Clorotalonil y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Azoxistrobina + Difenconazol

Figura 11. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Azoxistrobina + Difenconazol (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Figura 12. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Azoxistrobina + Difenconazol (y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L)).

Pirimetanil

Figura 13. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Pirimetanil (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Figura 14. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Pirimetanil y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Procimidona

Figura 15. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Procimidona (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L)).

Figura 16. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Procimidona y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Metiram + Piraclostrobina

Figura 17. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Metiram + Piraclostrobina (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Figura 18. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Metiram + Piraclostrobina y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Figura 19. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria spp.* pelo fungicida Mancozebe (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Figura 20. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria spp.* pelo fungicida Mancozebe y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Boscalida

Figura 21. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Boscalida (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L)).

Figura 22. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Boscalida (y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L)).

Fluxapiroxade + Piraclostrobina

Figura 23. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Fluxapiroxade + Piraclostrobina (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Figura 24. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Fluxapiroxade + Piraclostrobina y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Piraclostrobina

Figura 25. Inibição do crescimento micelial (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Piraclostrobina (y= crescimento micelial (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

Figura 26. Inibição da germinação dos conídios (%) in vitro de *Alternaria* spp. pelo fungicida Piraclostrobina y= inibição de germinação (%) e x= concentração do ingrediente ativo (mg/L).

5. CONCLUSÕES

- Não houve diferenças de comportamento de sensibilidade entre as espécies de *A. solani* e *A. grandis* que possa caracterizar uma perda de sensibilidade por conta da predominância da espécie de *A. grandis* associada à pinta preta da batata no Brasil.

- Não há relação entre as concentrações propostas para estudos *in vitro* frente às utilizadas em campo; portanto, não necessariamente um produto caracterizado como pouco sensível ou insensível irá representar menor eficiência em campo. Da mesma forma, produtos que demonstraram elevada eficiência *in vitro* podem ter o seu sucesso a campo prejudicado em função das diversas interações com a planta, patógeno, equipamentos e ambiente.

- Encontraram-se evidências de perda de sensibilidade aos ingredientes ativos Clorotalonil e Boscalida.

- A realização de testes *in vitro* são úteis no monitoramento da sensibilidade dos isolados; no entanto, devem ser feitos sistematicamente na mesma região para confirmar a relação entre perda de sensibilidade com a espécie predominante e o manejo utilizado.

- Sugere-se complementação das bulas comerciais dos produtos utilizados atualmente, uma vez que, em nenhum dos produtos aqui testados é citado as demais espécies causadoras da pinta preta; todas as recomendações se referem à *A. solani*.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <HTTP://agrofit.agricultura.gov.br>. Acesso em: 01 mai. 2016.

ARAÚJO, N. **Descubra os segredos da batata**. Globo Rural, 8 fev. 2015. Disponível em< <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2015/02/descubra-os-segredos-da-batata.html>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

AZEVEDO, L.A.S. Fungicidas sistêmicos: prática e teoria. Campinas: EMOPI, 2007. 1ª ed. 284p.

BANDINELLI, M. G. **Micropropagação e miniestaquia na propagação de batata**. 2009, 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 2009.

BASTOS, C. N. **Efeito do óleo de Piper aduncum sobre Crinipelis perniciosa e outros fungos fitopatogênicos**. Fitopatologia Brasileira, v.22, p.441-443, 1997.

BOFF, P. **Epidemiologia e controle químico da mancha de estenfílio (*Stemphylium solani* Weber) e da pinta preta (*Alternaria solani* (Ellis, Martin) Jones, Grout) em dois sistemas de condução do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. Viçosa: 1988. 192p. [Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa].

BOVEDA, R.R.V. Título: **Morfologia, patogenicidade, esporulação e sensibilidade a fungicidas *in vitro* de *Alternaria solani* e *Alternaria alternata***. 1986. 106p. Dissertação (Mestrado em fitopatologia . Piracicaba: 1986. 106p. [Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo].

BRIGNANI NETO, F. & OLIVEIRA, D.A. Influência de diferentes fungicidas sobre o crescimento de *Alternaria solani* (Ell,Martin) Jones, Grout, “in vitro”. **O Biológico**, São Paulo,v.46, p.101-106, 1980.

CARDOSO, C.R. **Pinta preta da batateira e do tomateiro: Identificação molecular das espécies de *Alternaria* grama de hospedeiro e epidemia**, 2014. Tese. Disponível em<<http://locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/1073/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> . Acesso em 21 nov. 2016.

CARDOSO, C.R.; LOURENÇO Jr, V.; LIMA, A.S.;MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. **Sensibilidade de isolados de *Alternaria solani* ao fungicida clorotalonil**. Disponível em< http://www.sbfito.com.br/tpp/Suplemento_2008_BH.pdf>. Acesso em: 28 out. 2016.

CARDOSO, C. R. M. S. Agressividade de ***Alternaria tomatophila*, *A. grandis* e *A. solani* em batateira e tomateiro**. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2010.

CAMARGO, M. ***Sclerotia sclerotiorum* em sementes de soja: sobrevivência, efeito na germinação, tamanho de amostra para análise e eficiência *in vitro* de fungicidas**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CHAVES, A. M.; **A Cultura da Batata**. [Palestra em Reunião de Conjuntura Conab – Companhia Nacional de Abastecimento], disponível em <<http://www.conab.gov.br/busca.php?filtro=batata>>. 2006. Acesso em: 10 abr. 2014.

COELHO, A. H. R.; VILELA, E. R.; CHAGAS, S. J. de R. Qualidade de batata (*Solanum tuberosum* L.) para fritura, em função dos níveis de açúcares redutores e amido, durante o armazenamento refrigerado e à temperatura ambiente com atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.4, p.899-910, 1999.

DIAS, J.A.C.; IMAUTI, M.T. Doenças da batateira (*Solanum tuberosum*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 2005. 4ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 119-142.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v.61., p.42-44, 1971. Disponível em<http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1971Articles/Phyto61n01_42.PDF>. Acesso em: 03 abr.2013.

FANCELLI, M.I. **Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani* f. sp. *Lycopersici* N. F.** Tese (Doutado) Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

FARR, D.F., ROSSMAN, A.Y. **Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory (USDA)**. Disponível em <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>>. Acesso em: 10 mai.2014.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para a conservação de patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v.33, p.9-13, 1967.

FILGUEIRA, F.A.R. Parte II: bataticultura. In: **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. Lavras: Editora UFLA, 2003. 141-280p

FILGUEIRA, F.A.R. Solanáceas I: batata o alimento universal. In: **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na propagação e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2008. Parte II: olericultura especial, 161p.

FUNGICIDE RESISTENCE ACTION COMMITTEE – **FRAC**: WORKING GROUPS. Disponível em: <<http://www.frac.info/working-group>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – **FAO-STAT**: Crops, 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 05 fev. 2014.

FORTES, G.R.L.; PEREIRA, J.E.S. Classificação e descrição botânica. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, J. (Ed.). **O cultivo da batata na Região Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 69-79.

GEBAHARDT, C.; VALKONEN, J.P.T. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. **Annual Reviews Phytopathology**, v.39, p.79-102, 2001.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. P. 78.

GODOY, R.C.B. A oferta da batata no Brasil. Revista **Batata Show**, Itapetininga, v. 1, n 3, 2001. Disponível em: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista03_025.htm>. Acesso em: 17 mai. 2013.

HOLM, A.L.; RIVERA, V. V.; SECOR, A.; GUDMESTAD, N. C. Temporal sensitivity of *Alternaria solani* to foliar fungicides. **America Journal Potato Research**, Orono, v.80, n.1, p.33-40, Jan./Fev. 2003.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE**, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 04 Ago. 2014.

ISHIZUKA, M.S. **Compatibilidade entre tratamentos químicos e biológico de sementes de feijão para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli***. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

JULIATTI, F.C.; LUZ, J.M.Q.; BARCELOS. Batata no triângulo mineiro. **Batata show**. n. 3, 2001. Disponível em: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista03_020.htm>. Acesso em: 10 mai. 2014.

KAPSA, J. **Effectiveness of some fungicides in control of *Alternaria alternata* and *Alternaria solani***. PPO-Special Report, Hamar, v. 13 p. 127-134, 2009.

KEMMITT, G. 2002. **Pinta-preta (Alternariose) da batata e tomate**. Portuguese translation by Shadia Katari, The Plant Health Instructor. Disponível em< <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/PotatoTomatoPort.aspx>> acessado em: 03 abr. 2013.

LÉLIS, M. M.; LOURENÇO, V. L.; AQUINO, L. A.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.G. **Sensibilidade de isolados brasileiros de *Alternaria solani* aos fungicidas clorotalonil, mancozebe e azoxystrobin**. Trabalho acadêmico - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/46_0184.pdf>. Acesso em: 18 maio. 2013.

MACHADO, J.P.H. Sensibilidade de isolados de *Alternaria grandis* aos fungicidas clorotalonil, azoxistrobina e boscalida. In: SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO ACADÊMICA., 2016, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2016. Resumo 7035.

MIGUEL, T.V. **Reação de genótipos de batata a diferentes isolados de *Alternaria* spp.** Dissertação (Mestrado em Melhoramento de plantas) – Faculdade Federal de Lavras - UFLA- Campus de Lavras, 2012.

MILES, T.D.; FAIRCHILD, K.L.; MERLINGTON, W.W.; N. ROSENZWEIG AND WHARTON, P.S. **First Report of Boscalid and Penthiopyrad-Resistant Isolates of *Alternaria solani* causing early blight of Potato in Michigan**. Disponível em <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-03-13-0279-PDN>. Acesso em: 28 Out. 2016.

STEPANOVIC, M.; JEVREMOVIC, S.; REKANOVIC, E.; MIHAJLOVIC, M.; MILIJASEVIC-MARCIC, S.; PATOCNIK, I.; TODOROVIC, B. **In vitros sensitivity of *Alternaria solani* to conventional fungicides and biofungicide based on tea tree essential oil**. 2015. Disponível em< https://www.researchgate.net/publication/277911836_In_vitro_sensitivity_of_Alternaria_solani_to_conventional_fungicides_and_a_biofungicide_based_on_tea_tree_essential_oil>. Acesso em: 08 mai. 2016.

MINARÉ, R. **2008: ano internacional da batata**. 2007. Disponível em:< <http://www.agrolink.com.br/colunistas/ColunaDetalhe.aspx?CodColuna=2818>. Acesso em: 08 mai. 2015.

PASTORINI, L. H.; BACARIN, M. A.; TREVIZOL, F. C. BERVALLD, F. C. FERNANDES, H. S. Produção e teor de carboidratos não estruturais em tubérculos de batata obtidos em duas épocas de plantio. **Horticultura Brasileira**. v.21, n.4, p.660-665, 2003.

PEREIRA SANTANA, C.; LOURENÇO, J.R. V.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Sensibilidade de *Alternaria solani* aos fungicidas mancozeb e tebuconazole – Resumo CQI-009. Disponível em< http://www.sbfito.com.br/tpp/Suplemento_2008_BH.pdf>. Acessado em: 28 out.2016.

PEREIRA, C.S. et al. Caracterização da resistência de espécies de *alternaria* causadoras de pinta preta ao fungicida azoxystrobin. In: XIX SIC, 8., 2009 a. Viçosa. **Resumos:** UFV, 2009 a. Resumo s/n.

PEREIRA, C.S. et al. Caracterização da resistência de espécies de alternaria causadoras de pinta preta ao fungicida tebuconazol. In: XIX SIC, 8., 2009 b. Viçosa. **Resumo...**: UFV, 2009 b. Resumo s/n.

REIS, M. E. et al. **Relationship between IC50 determined in vitro/in vivo and the fungicide rate used in the field** . Disponível em:<
<http://www.scielo.br/pdf/sp/v41n1/0100-5405-sp-41-01-00049.pdf>>. Acesso em: 29 out.2016.

REIS, E. M.; REIS, A.C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas**: Guia para controle químico de doenças de plantas. 6 ed. Passo Fundo. Ed. Universidade de Passo Fundo, 2010. 226p.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo frac. 2006. 245 p.** Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP- Campus de Botucatu, 2006.

RODRIGUES, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPÓSITO, M.B.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.3, p.323-327, 2007.

RODRIGUES, T.T.M.S.; MIZUBUTI, E.S.G. Pinta preta: surge uma nova espécie. **Revista Batata Show**, Itapetininga, v.24, p. 14-16. 2009. Disponível em: <
http://www.abbabatatabrasileira.com.br/images/pdf/rbs_24.pdf>. Acesso em: 1 mai. 2014.

RODRIGUES, T.T.M.S.; BERBEE, M.L.; SIMMONS, E.G.; CARDOSO, C.R.; REIS, A.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G., 2010. First report of *Alternaria tomatophila* and *A.grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. **New Disease Reports**, 22-28 p.

RODRIGUES, T.T.MS. **Molecular and morphological characterization, with inference about recombination, for Alternaria species related to early blight of potato and tomato**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa UFV, Viçosa, Minas Gerais, 2009. Disponível em<
<http://locus.ufv.br/handle/123456789/1024>>. Acesso em: 03 nov.2016.

SANTOS JUNIOR, N.E.T. DOS. **Produtividade de batata cv Atlantic em função de fontes potássicas**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia “UFU”, Uberlândia, 2013. Disponível em:<
<http://penelope.dr.ufu.br/handle/123456789/4121>>. Acesso em: 01 mai. 2014.

SCHULLER, E.; HABERMEYER, J. **First results from an Alternaria solani field trial in potatoes**. PPO-Special Report; Lelystad, v. 8, p. 265-269, 2002.

SHERF, A.F. & MACNAB, A.A. Vegetable disease and their control. **Wiley Intercience Publication**, 1986, 728 p.

SHI, X.J.; REN, L.; SONG, Y.Q.; et al. **Sensitivity of *Alternaria solani* to boscalid and control of boscalid resistance with commonly-used fungicides in Shanxi, China.** Disponível em < <http://link.springer.com/article/10.1007/s13313-015-0352-9>>. Acessado em: 28 out.2016.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4. n.1, p.71-78, 2002.

SIMMONS, E.G.; *Alternaria themes and variations* (244-286) species on Solanaceae. **Mycotaxon**: 75, 1-115. 2000.

SIMMONS, E.G. *Alternaria: Alternaria grandis*. In: **An Identification Manual**. Utrecht: CBS, 2007.775p. (CBS Biodiversity Series, 6)

SOUZA, M.P.; CARDOSO, C.R.; JUNIOR, W.J.; MIZUBUTI, E.S.G. Novas espécies de *Alternaria* causadoras de pinta preta da batateira, desafios no controle da doença. **Official bimonthly publication of the Brazilian Phytopathological Society**, Viçosa, p. 470, v.39, 2014. Resumo 720-2.

STEVENSON, W.R. The potential impact of field resistance to early blight to fungicide inputs. **American Potato Journal**, Orono, v. 71, n.5, p.317-326. 1994. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2F02849058#page-1>>. Acesso em: 1 mai. 2014.

STRANDBERG, J.O. ***Alternaria species that attack vegetables crops***: biology and options for disease management. Amsterdam: Elsevier, 1992.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; Alternarioses em hortaliças: sintomas, etiologia e manejo integrado. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em <[HTTP://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/alternarioses/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/alternarioses/Index.htm)>. Acesso em: 21 jul. 2016.

TÖFOLI, J.G.; KUROZAWA, C. Efeito de três meios de cultura e duas temperaturas na produção de conídios de *Alternaria solani*. **Summa Phytopathology**, Jaboticabal, v.19, p.41, 1993.

TÖFOLI, J. G., **Ação de fungicidas e indutores de resistência no controle da requeima e pinta preta na cultura da batata**. 2011. 163 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2011.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J.T, NOGUEIRA, E.M.C. Doenças Fúngicas da Batata: sintomas, etiologia e manejo. São Paulo: **Divulgação técnica Instituto Biológico**, v. 74, n.1, p. 63-73, 2012.

TÖFOLI, J.G.; MELO, P.C.T.; DOMINGUES, R.J. Ação protetora, residual, curativa e anti esporulante de fungicidas no controle da requeima e da pinta preta da batata em condições controladas. São Paulo: **Divulgação técnica Instituto Biológico**, v.79, n.2, p. 209-221, 2012.

TÖFOLI, J.G.; MELO, P.C.T.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J.T. Requeima e Pinta preta na cultura da batata: importância, características e manejo sustentável. **Divulgação técnica Instituto Biológico**. São Paulo, v.75, n.1, p.33-40, 2013a.

TÖFOLI, J.G. MELO, P.C.T.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J.T. Controle da requeima e pinta preta da batata por fungicidas: conceitos, evolução e uso integrado. São Paulo: **Arquivo Instituto Biológico**, 2013b. 52 p. Divulgação técnica.

TÖFOLI, J.G.; MELO, P.C.T.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J.T. Controle da requeima e pinta preta da batata por fungicidas e seu reflexo sobre a produtividade e a qualidade de tubérculos. Divulgação técnica Instituto Biológico. São Paulo, v.83, p.1-12. 2016a.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; JACOBELIS, W.; TORTOLO, M.P.L. Fluxapiroxade associado à piraclostrobina, um novo aliado para o manejo de doenças fúngicas em cultivos de hortaliças, frutíferas e ornamentais. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n.1, p. 1-11, 2016b.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; KUROSZAWA, C. Ação “*in vitro*” de fungicidas no crescimento micelial e germinação de conídios de *Alternaria solani*, agente causal da pinta preta do tomateiro. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.3, p.337-345, 2003. Disponível em: <
http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V70_3/tofoli.PDF>. Acesso em: 14 mai. 2013.

VAN DER WAALS, J.E.; KORSTEN, L.; AVELING, T.A.S. A review of early blight of potato. **African Plant Protection**, Queens wood, 2002. Disponível em: <
<http://www.potatoes.co.za/site/resources/documents/reviewearlyblight.pdf>>. Acessado em 03.jun.2013.

VASCONCELOS, C.V.; SILVA, D.C. DA.; CARVALHO, D.D.C. Ocorrência de *Alternaria alternata* (Fr.:Fr) Keissl. Em tubérculos de batata, no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. V.44, n.2, p. 2019-222, 2014. Disponível em: <
<http://www.scielo.br/pdf/pat/v44n2/v44n2a15.pdf>>. Acesso: 24 Mai. 2016.

VILLASCHI, R.L.; CARDOSO, C.R.; HORA JR. B.T.; MIZUBUTI, E.S.G. Sensitivity of *Alternaria grandis* to boscalid. **Official bimonthly publication of the Brazilian Phytopathological Society**, Viçosa, p.454, v. 39, 2014 a. Resumo 605-1.

VILLASCHI, R.L.; CARDOSO, C.R.; HORA JR. B.T.; MIZUBUTI, E.S.G. Primeiro relato de redução da sensibilidade de isolados de *Alternaria grandis* ao fungicida boscalida no Brasil. In. SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO ACADÊMICA. ., 2014, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2014 b. Resumo 2870.

WHARTON, P.; KIRK W. **Potato diseases: early blight**. Michigan State University. Department of Plant Pathology. Disponível em: <
<http://www.potatodiseases.org/earlyblight.html>> Acesso em 24 julho 2016.
GOULART, A. C. P. Fungicidas inibidores do esterol. II. Imidazoles. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, 1995. v. 3, p. 365-390.

VENANCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; SOUZA, N. L.; BEGLIOMINI, E.; PERES, N. A. Efeitos fisiológicos de fungicidas sobre plantas – Parte II. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, 2005. v. 13, p. 49-73.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, S.V.; OLIVEIRA, S.H.F. Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2007, 168p.