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

Caracterização da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da quinona externa

Gabriel de Moraes Chitolina

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

,

**Piracicaba
2019**

Gabriel de Moraes Chitolina
Engenheiro Agrônomo

Caracterização da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da quinona externa

Orientadora:
Profa. Dra. **LILIAN AMORIM**

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

Piracicaba
2019

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

Chitolina, Gabriel de Moraes

Caracterização da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da quinona externa / Gabriel de Moraes Chitolina. - - Piracicaba, 2019.

77 p.

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

1. Resistência a fungicidas 2. QoI 3. *Citrus* spp. 4. Controle químico I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Maria Neuci de Moraes Chitolina e Gilberto Chitolina,

por todo amor, exemplo, dedicação e apoio. Por nunca medirem esforços para me permitir realizar tudo que foi necessário durante a pós-graduação;

A pessoa que é o verdadeiro motivo de eu ter realizado esse mestrado, mesmo não estando mais juntos

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Neuci de Moraes Chitolina, Gilberto Chitolina e meu irmão Gustavo de Moraes Chitolina pelo apoio, amor e exemplos dados durante toda a vida.

Ao Conselho Nacional De Desenvolvimento Científico E Tecnológico pela bolsa de mestrado concedida de 2017 a 2019

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado concedida de Julho a Agosto de 2019.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) por todo apoio técnico e financeiro fornecido durante o projeto de mestrado.

À Professora Dra. Lillian Amorim pela paciência, convívio, orientação e ensinamentos dados durante todo o período de mestrado.

Ao Dr. Geraldo José da Silva Junior pela paciência e ensinamentos em fitopatologia, pesquisa e citricultura concedidos durante este projeto.

Ao Dr. Eduardo Feichtenberger pela disponibilização dos isolados que, sem os quais, não permitiriam a realização deste trabalho

Aos professores funcionários do departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ, por todo auxílio em aulas, projetos e momentos de descontração.

À Silvia de Afonseca Lourenço e Luiz Antônio Ortiz pela amizade, ajuda em todos os experimentos e conselhos durante o período de mestrado.

À Rosana Gonçalves Pereira, por toda ajuda nas análises e coletas realizadas para contribuir com esse projeto.

Ao Edson Ademir de Moraes e ao Prof. Paulo Mazzafera por permitirem realizar análises em seu laboratório do departamento de Produção Vegetal

Aos meus amigos Renan Fernandes, Isabela Primiano e Ricardo Feliciano, por toda orientação e por compartilhar sua experiência em diversos trabalhos realizados.

Ao Régis Fialho e a Lillian Bibiano, por todo companheirismo e amizade desde o primeiro dia de mestrado até o último.

Aos colegas de departamento Rafael, Rafaela, Alice, Pedro, Antônio, Manoel, Pamela, Raquel, Leonardo e Evelyn por toda convivência, por mais que pouca a alguns, e pelos momentos de descontração.

Aos amigos Bruno, Caio, Carol, Eliel, Guilherme, Marina, Mateus, Maycon, Rodrigo, Romulo e Thalita, por todos os anos de amizade, por terem em muitos momentos, sem saber, me ajudado a seguir em frente e continuar mesmo nos meus momentos mais difíceis.

A minha psicóloga durante o mestrado, Suelen, por mais de um ano me ter ajudado a perceber as coisas que realmente são importantes e tomar as decisões que eu realmente queria tomar.

“Ao tomar uma decisão de menor importância, eu descobri que é sempre vantajoso considerar todos os prós e contras. Em assuntos vitais, no entanto, tais como a escolha de um companheiro ou profissão, a decisão deve vir do inconsciente, de algum lugar dentro de nós. Nas decisões importantes da vida pessoal, devemos ser governados, penso eu, pelas profundas necessidades íntimas da nossa natureza”.

Sigmund Freud

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. A mancha marrom de alternaria	17
3.2. Controle da mancha marrom de alternaria	19
3.3. Fungicidas inibidores da quinona externa (QoI)	20
3.4. Resistência de patógenos aos inibidores da quinona externa	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Isolados de <i>Alternaria alternata</i>	25
4.2. Determinação da CE50 de piraclostrobina e azoxistrobina a isolados de <i>Alternaria alternata</i>	28
4.3. Mapeamento da sensibilidade da população com base em doses discriminatórias... 30	
4.4. Sensibilidade <i>in vivo</i> de isolados de <i>Alternaria alternata</i> a piraclostrobina e azoxistrobina	30
4.5. Extração de DNA, reação de PCR e sequenciamento de parte do gene <i>cyt b</i>	31
4.6. Ensaio de microtitulação à base de resazurina para avaliação da sensibilidade de isolados de <i>Alternaria alternata</i> a piraclostrobina e azoxistrobina	32
5. RESULTADOS	35
5.1. Determinação da CE50 de isolados de <i>Alternaria alternata</i> a piraclostrobina e azoxistrobina	35
5.2. Mapeamento da sensibilidade da população de <i>A. alternata</i> com base em doses discriminatórias	39
5.1. Teste de sensibilidade <i>in vivo</i> de isolados à piraclostrobina e azoxistrobina	47
5.2. Extração de DNA, reação de PCR e sequenciamento de parte do gene <i>cyt b</i>	50
5.3. Ensaio de microtitulação à base de resazurina para avaliação da sensibilidade de isolados de <i>Alternaria alternata</i> a fungicidas	53
6. DISCUSSÃO	57
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	63

APÊNDICE	69
ANEXOS.....	73

RESUMO

Caracterização da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da quinona externa

A cultura da tangerina tem grande importância no mercado de frutos *in natura* no Brasil, principalmente no Estado de São Paulo, seu maior produtor. A tangerina 'Ponkan' e o tangor 'Murcott' se destacam como as principais variedades produzidas no Estado. A mancha marrom de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria alternata*, é um dos principais fatores que reduzem a produção e a qualidade de tangerinas. Recentemente, diversos produtores do Estado de São Paulo têm reportado redução da eficiência de fungicidas inibidores da quinona externa (Qols) no controle da doença. Desta forma, este trabalho teve como objetivos avaliar a sensibilidade de isolados de *A. alternata* aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina, do grupo dos inibidores da quinona externa, por meio da determinação das concentrações efetivas destes fungicidas para a inibição de 50% (CE₅₀) de germinação de esporos; verificar molecularmente a presença de mutações no gene *cyt b* de *A. alternata* relacionados à resistência a Qols; avaliar a aplicabilidade do teste de microtitulação com base em resazurina na determinação da CE₅₀; determinar a distribuição de isolados sensíveis e resistentes em áreas produtoras de tangerina no Estado de São Paulo por meio de doses discriminatórias e confirmar a ocorrência de resistência prática de isolados de *A. alternata* aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina. Os isolados resistentes (CE₅₀ maior que 1 µg.ml⁻¹), em sua maioria, apresentaram valores de CE₅₀ superiores a 100 µg.ml⁻¹ em diversos municípios avaliados. Todos os isolados classificados como resistentes apresentaram a mutação G143A, responsável pela perda completa da sensibilidade a fungicidas Qols. Foi observada ampla distribuição de isolados resistentes aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina pelo Estado de São Paulo. Em diversas áreas avaliadas, a presença concomitante de indivíduos sensíveis e resistentes na população indica que o processo de seleção de indivíduos resistentes ainda ocorre no Estado. O método da microtitulação da resazurina não foi preciso na estimativa quantitativa da CE₅₀, porém mostrou-se útil para a rápida classificação qualitativa de isolados sensíveis e resistentes. Os isolados de *A. alternata* foram capazes de infectar folhas de tangor 'Murcott', mesmo após a aplicação de elevadas doses de fungicidas, confirmando a presença da resistência prática. Identificar a presença de isolados resistentes é de grande importância para o eficiente manejo da doença no campo. A confirmação da resistência prática implica na necessidade de adoção de medidas anti-resistência.

Palavras-chave: Resistência a fungicidas, Qol, Tangerinas, *Citrus* spp., Controle químico

ABSTRACT

Fungicide sensitivity of *Alternaria alternata*, causal agent of brown spot in tangerines, to quinone outside inhibitor fungicides

Tangerines are of great importance to the fresh fruit market in Brazil, especially in São Paulo State, its largest producer. 'Ponkan' tangerine and tangor 'Murcott' stand out as the main varieties produced in São Paulo State. *Alternaria* brown spot, caused by *Alternaria alternata*, is one of the main factors reducing the production and quality of tangerines. Recently several tangerine growers from São Paulo State have reported reduced efficiency of quinone-outside inhibitor fungicides (Qols) in disease control. Thus, the objectives of this study were to evaluate the sensitivity of *Alternaria alternata* isolates to pyraclostrobin and azoxystrobin fungicides from the quinone-outside inhibitor group by determining the effective concentrations of these fungicides to inhibit 50% of conidial germination (EC_{50}); to verify the presence of mutations in the *A. alternata* *cyt b* gene related to Qols resistance; to evaluate the applicability of the resazurin-based microtiter assay in the determination of the EC_{50} ; to determine the distribution of sensitive and resistant isolates in tangerine producing areas in the State of São Paulo by discriminatory doses, and to confirm the occurrence of practical resistance of *A. alternata* isolates to the pyraclostrobin and azoxystrobin fungicides. Resistant isolates (EC_{50} greater than $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) showed EC_{50} values greater than $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ in several tangerine growing areas. Most isolates classified as resistant presented the G143A mutation, responsible for the complete loss of sensitivity to Qol fungicides. A wide distribution of isolates resistant to the fungicides pyraclostrobin and azoxystrobin was observed throughout the State. In several evaluated areas, the concomitant presence of sensitive and resistant individuals in the population indicates that the selection for resistance to Qols fungicides still occurs. The resazurin microtiter assay method was not accurate in the quantitative estimation of EC_{50} , but it proved useful for the rapid qualitative classification of sensitive and resistant isolates. *A. alternata* isolates were able to infect tangor 'Murcott' leaves, even after the application of high doses of fungicides, thus confirming the presence of practical resistance. Identifying the presence of resistant isolates is of great importance for the efficient management of the disease in the field. Confirmation of practical resistance implies the need for adoption of anti-resistance measures.

Keywords: Fungicide resistance, Qol, Tangerine, *Citrus* spp., Chemical control

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo da mancha marrom de alternaria. O patógeno sobrevive em folhas que permanecem na planta ou caídas no solo, produzem conídios que chegam pelo ar em brotações novas, infectam folhas, ramos e frutos suscetíveis, produzem toxinas específicas de hospedeiro translocadas via sistema vascular, causando lesões. Adaptado de Chung (2012). 18
- Figura 2. Frutos apresentando sintomas típicos da mancha marrom de alternaria utilizados para obtenção dos isolados de *Alternaria alternata*. 26
- Figura 3. Municípios do estado de São Paulo nos quais foram realizadas coletas de tangor 'Murcott' com sintomas de mancha marrom de alternaria que originaram os isolados utilizados neste trabalho. 27
- Figura 4. Distribuição da frequência de 34 isolados de *Alternaria alternata* coletados em 2003, 2004 e 2017 em presença dos fungicidas piraclostrobina (preto) e azoxistrobina (branco) em função da concentração efetiva dos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina necessária para reduzir a germinação de conídios em 50%. 37
- Figura 5. Germinação de conídios do isolado LRS 24/17 de *Alternaria alternata* em meio ágar-água com ou sem a adição do fungicida piraclostrobina. (a) controle sem fungicida; (b) 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de piraclostrobina; (c) 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de piraclostrobina; (d) 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de piraclostrobina. 38
- Figura 6. Germinação de conídios do isolado LRS 24/17 de *Alternaria alternata* em meio ágar-água com ou sem a adição do fungicida azoxistrobina. (a) controle sem fungicida; (b) 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de azoxistrobina; (c) 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de azoxistrobina; (d) 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de azoxistrobina. 39
- Figura 7. Distribuição geográfica dos isolados de *Alternaria alternata* sensíveis e resistentes ao fungicida piraclostrobina pelo Estado de São Paulo. Cinza claro representa a frequência de isolados sensíveis e cinza escuro, a de resistentes. 45
- Figura 8. Distribuição geográfica dos isolados de *Alternaria alternata* sensíveis e resistentes ao fungicida azoxistrobina pelo Estado de São Paulo. Cinza claro representa a frequência de isolados sensíveis e cinza escuro, a de resistentes. 46
- Figura 9. Evolução da CE_{50} de isolados de *Alternaria alternata* entre os anos de 2003, 2004, 2017 e 2018 para piraclostrobina (a) e azoxistrobina (b). 47
- Figura 10. Aspecto de folhas de tangor 'Murcott', após o teste de resistência prática realizado com isolados de *Alternaria alternata* sensíveis (LRS 32/04) e resistentes (LRS 34/17) aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina. 49
- Figura 11. Qualidade da reação de PCR de 32 isolados de *Alternaria alternata* utilizados para obtenção dos valores de CE_{50} . Bandas destacadas em cada corrida, correspondentes a cada isolado, encontram-se na posição relativa à região alvo do gene *cyt b*. 50
- Figura 12. Alinhamento de sequências parciais do citocromo *b* (*cyt b*) de isolados de *Alternaria alternata* classificados como sensíveis (linha superior) e resistentes (linha inferior) e sua sequência traduzida para aminoácidos. 51
- Figura 13. Dose resposta do ensaio de microtitulação à base de resazurina de isolados de *Alternaria alternata* (colunas) resistentes e sensíveis em diferentes concentrações do fungicida azoxistrobina (linhas). 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungicidas registrados no Brasil para controle de 'mancha-de-alternaria' em citros e seus respectivos ingredientes ativos (AGROFIT, 2019).....	20
Tabela 2. Município, código, número de isolados coletados, hospedeiro, órgão da planta e data de coleta de isolados de <i>Alternaria alternata</i>	25
Tabela 3. Código, local e fenótipo da sensibilidade de isolados de <i>Alternaria alternata</i> , determinado <i>in vitro</i> , utilizados nos testes <i>in vivo</i> em folhas destacadas.....	31
Tabela 4. Sequência dos primers, temperatura de anelamento, tempo de extensão, região alvo de amplificação dos primers utilizados na caracterização molecular da sensibilidade dos isolados de <i>Alternaria alternata</i> a fungicidas inibidores da quinona externa.	32
Tabela 5. Concentração efetiva de fungicidas inibidores da quinona externa necessária para reduzir a germinação de conídios em 50% (CE ₅₀) e fenótipo da sensibilidade de isolados de <i>Alternaria alternata</i>	36
Tabela 6. Porcentagens de inibição da germinação de conídios de cem isolados de <i>Alternaria alternata</i> conferidas por diferentes doses dos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina “ <i>in vitro</i> ” e classificação fenotípica da resistência.	40
Tabela 7. Incidência de mancha marrom de alternaria, em folhas de tangor 'Murcott', inoculadas com isolados sensíveis e resistentes de <i>Alternaria alternata</i> aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina.	48
Tabela 8. Isolados e presença de mutações responsáveis pela resistência a fungicidas inibidores da quinona externa (Qols).....	52
Tabela 9. Valores do intercepto x (a), do coeficiente angular (b), do coeficiente de determinação (R ²) e da CE ₅₀ estimados pela curva de decaimento obtida com valores de redução da resazurina em função da concentração de piraclostrobina de isolados de <i>Alternaria alternata</i> . O ensaio seguiu o método de microtitulação à base de resazurina.	54
Tabela 10. Valores do intercepto x (a), do coeficiente angular (b), do coeficiente de determinação (R ²) e da ce ₅₀ estimados pela curva de decaimento obtida com valores de redução da resazurina em função da concentração de azoxistrobina de isolados de <i>Alternaria alternata</i> . O ensaio seguiu o método de microtitulação à base de resazurina.	54

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, maior produtor mundial de laranjas, foi responsável em 2018 pela produção de 16,7 milhões de toneladas da fruta (IBGE, 2019) e estima-se que seja responsável por aproximadamente 64% da produção mundial de suco de laranja na safra 2018/19 (USDA, 2019). Embora a laranja-doce seja a principal espécie produzida no País, o Brasil também se destaca como um grande produtor de tangerinas, principalmente para o consumo *in natura* no mercado interno (AZEVEDO et al., 2010). O Brasil é o sexto maior produtor mundial de tangerinas, produzindo um total de 996 mil toneladas da fruta em 2018, superado apenas por China, Espanha, Turquia, Marrocos e Egito (FAOSTAT, 2019; IBGE, 2019), sendo o estado de São Paulo, produzindo 384 mil toneladas, seu maior produtor (IBGE, 2019),

A tangerina ‘Ponkan’ (*Citrus reticulata* Blanco) e o tangor ‘Murcott’ (*Citrus sinensis* L Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco) figuram dentre os híbridos e variedades de tangerina com maior produção no Estado de São Paulo (CHIARINI et al., 2017). Dados do IBGE (2019) mostram diminuição, nos últimos anos, da área destinada à colheita de tangerinas no Estado de São Paulo. A redução da área de tangerinas deve-se, dentre outros fatores, à ocorrência da mancha marrom de alternaria, considerada a principal doença fúngica deste grupo de plantas, causando perdas diretas na produção e indiretas, pela redução da qualidade dos frutos (COLTURATO, 2006; MARTELLI, 2011).

A mancha marrom de alternaria é causada pelo fungo *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissler. Os sintomas da doença ocorrem em folhas e frutos. Nas folhas os sintomas iniciam-se na forma de pequenos pontos circulares, evoluindo para grandes áreas necróticas, enquanto nos frutos os sintomas se expressam como pequenas manchas escuras que podem se desenvolver para grandes lesões eruptivas. As lesões podem ser removidas, formando cicatrizes nos frutos (TIMMER, 1993; TIMMER et al., 2003). As folhas são suscetíveis à infecção desde a brotação até a completa expansão e os frutos, desde a queda das pétalas até que seu tamanho atinja aproximadamente cinco centímetros em diâmetro (PERES; TIMMER, 2006).

O uso de fungicidas é indispensável para o controle da doença (TIMMER et al., 2000) e no Brasil, o controle é realizado com, ao menos, 7 aplicações de fungicidas por safra (COLTURATO et al., 2009). O cobre é utilizado como um dos principais produtos para o controle da mancha marrom de alternaria, mas seu uso é limitado em áreas com clima mais quente e seco. Fungicidas inibidores da quinona externa (QoI), também conhecidos como estrobilurinas, foram registrados para o controle de mancha marrom na década de 2010 e apresentavam controle satisfatório da doença, passando a ser usados rotineiramente no Estado São Paulo (COLTURATO, 2006). Na Flórida, foram relatados casos de

resistência de *A. alternata* a fungicidas do grupo dos Qol a partir de 2008 (VEGA; DEWDNEY, 2014) dificultando o manejo da doença por diminuir as opções de fungicidas eficientes. Na safra 2017, vários produtores de tangerina do Estado de São Paulo relataram que a aplicação de fungicidas Qols não tiveram a mesma eficiência observada em anos anteriores (SILVA JR.¹, comunicação pessoal), sugerindo uma mudança na sensibilidade de isolados de *A. alternata* a fungicidas desse grupo.

¹ SILVA JR., G.J. Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* a fungicidas do grupo dos inibidores da quinona externa e os objetivos específicos foram:

- (i) Determinar as concentrações efetivas de piraclostrobina e azoxistrobina para a inibição de 50% (CE₅₀) de germinação de esporos de *A. alternata* de 8 populações do patógeno, 3 delas expostas aos fungicidas Qols;
- (ii) Verificar a presença de mutações no gene *cyt b* de *A. alternata* relacionados à resistência a Qols;
- (iii) Avaliar a aplicabilidade do teste de microtitulação com base em resazurina na determinação da CE₅₀ dos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina a isolados de *A. alternata*;
- (iv) Determinar a distribuição de isolados de *A. alternata* resistentes a piraclostrobina e azoxistrobina nas principais regiões produtoras de tangerina do Estado de São Paulo;
- (v) Confirmar a ocorrência de resistência prática de isolados de *A. alternata* aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A mancha marrom de alternaria

A mancha marrom de alternaria é causada pelo fungo *Alternaria alternata* (TIMMER, 1993). O patógeno foi originalmente classificado como *A. citri* e posteriormente como *A. alternata* pv. *citri*, mas sua classificação ainda gera dúvidas. Após análises moleculares, os diferentes isolados causadores da doença em citros foram classificados como *A. alternata* (CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999; STUART; AZEVEDO; MACHADO, 2009). A doença afeta diversas tangerinas e seus híbridos, como tangelos 'Minneola', tangerinas 'Dancy' e tangores 'Murcott', e foi primeiramente identificada na Austrália, em 1903, em tangerinas 'Emperor'. Em 1974 a doença foi relatada na Flórida e, subsequentemente, no Brasil, em 2001, no Rio de Janeiro e, em 2003, em São Paulo (GOES et al., 2001; SPÓSITO et al., 2003; STUART; AZEVEDO; MACHADO, 2009).

O ciclo da doença (Figura 1) se inicia com a sobrevivência do patógeno em folhas que permanecem na planta ou no solo, após sua queda. A esporulação do patógeno se inicia com a emergência dos conidióforos na superfície das lesões através dos estômatos das folhas infectadas pelo fungo, principalmente nas folhas maduras ou senescentes e raramente em lesões jovens em folhas ou lesões maduras em frutos. A liberação dos conídios é desencadeada pela chuva ou por mudanças abruptas na temperatura e umidade relativa, fazendo com que os conídios sejam facilmente dispersos pelo vento e pelas gotas de chuva até sua deposição em folhas ou frutos jovens, onde penetram diretamente pela formação de apressório ou por estômatos (TIMMER et al., 2003; STUART; AZEVEDO; MACHADO, 2009). Segundo trabalhos realizados por Timmer et al. (2000), as temperaturas ótimas para a ocorrência da infecção das plantas variam de 23 a 27 °C, com períodos de molhamento foliar entre 8 e 12 h.

Figura 1. Ciclo da mancha marrom de alternaria. O patógeno sobrevive em folhas que permanecem na planta ou caídas no solo, produzem conídios que chegam pelo ar em brotações novas, infectam folhas, ramos e frutos suscetíveis, produzem toxinas específicas de hospedeiro translocadas via sistema vascular, causando lesões. Adaptado de Chung (2012).

Os sintomas são caracterizados por manchas marrons ou negras em folhas jovens, envoltas ou não por um halo amarelo que pode se desenvolver no limbo foliar. A presença do halo e a severidade dos sintomas estão relacionados à produção de toxinas pelo patógeno. As toxinas produzidas pelo fungo são específicas às variedades de tangerina, denominadas em inglês 'host specific toxin' (HST) ou toxinas específicas de hospedeiro. A patogenicidade do fungo se deve à produção da toxina ACT, que parece ter efeito na membrana plasmática de células suscetíveis, causando extravasamento de eletrólitos. Essas toxinas são produzidas logo após a penetração e, em análises histológicas, é possível observar halos amarelados ao redor do apressório. Ao entrar em contato com os feixes vasculares, a toxina se espalha pelos tecidos próximos ao infectado e os sintomas de clorose e necrose ocorrem nos tecidos que entram em contato com a toxina. Sintomas nos frutos nos estádios iniciais de desenvolvimento apresentam coloração marrom (STUART; AZEVEDO; MACHADO, 2009). Em frutos em estádios mais avançados de desenvolvimento são observadas lesões de tamanhos variáveis, podendo ocorrer erupções corticosas que

podem ser destacadas, formando uma cicatriz, o que leva à diminuição da qualidade do fruto. Frutos com alto grau de severidade da doença caem prematuramente, diminuindo a produtividade (TIMMER et al., 2003; MARTELLI, 2011).

3.2. Controle da mancha marrom de alternaria

O manejo integrado da mancha marrom de alternaria é recomendado para garantir frutos de qualidade, principalmente pelo uso combinado de métodos cultural, genético e químico. Métodos culturais devem ser usados tanto na implantação do pomar quanto na posterior condução das plantas adultas. Recomendam-se: utilizar mudas sadias e certificadas; evitar o uso do plantio adensado; escolher áreas adequadas ao plantio, evitando áreas baixas; utilizar irrigação localizada; realizar podas de limpeza e eliminação de restos culturais; evitar o excesso de adubação nitrogenada (FERREIRA et al., 2016).

O método genético apresenta poucas opções de variedades resistentes a *A. alternata* no mercado, sendo elas as tangerinas 'Fremont', 'Thomas' e o tangelo 'Orlando' (FERREIRA et al., 2016). Isso ocorre porque, a tangerina Dancy, suscetível a mancha marrom de alternaria, é o parental da maioria das variedades e híbridos de tangerinas utilizados atualmente (BASTIANEL et al., 2005). Sugere-se que a herança genética da suscetibilidade à doença ocorre por meio de um gene dominante e, portanto, a resistência é herdada por meio de genes recessivos (KOHMOTO et al., 1991, apud STUART; AZEVEDO; MACHADO, 2009). Apesar de serem resistentes a *A. alternata*, Clementina (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), tangerina Cleopatra (*C. reshni* Hort. Tanaka), limas (*C. latifolia* Tanaka), limões (*C. lemon* Burmann) e laranjas doces (*C. sinensis* L. Osbeck) apresentam sintomas quando inoculados artificialmente.

O controle químico da mancha marrom de alternaria é essencial para a produção de frutos de qualidade sem qualquer tipo de sintomas externos (PERES; TIMMER, 2006). Produtos à base de cobre vêm sendo utilizados no controle da doença. Fungicidas cúpricos apresentam facilidade e baixo custo de aplicação, porém podem causar fitotoxidez às plantas em épocas mais quentes do ano, o que causa sintomas de "queimaduras" nas folhas (BASTIANEL et al., 2005; COLTURATO et al., 2009; FERREIRA et al., 2016). No Brasil, existem poucos produtos comerciais registrados para o controle de 'mancha-de-alternaria' em citros (Tabela 1). Fungicidas inibidores da quinona externa, tais quais a piraclostrobina e azoxistrobina, apresentam controle satisfatório da doença no campo. Porém, o uso deste grupo de fungicidas sistêmicos está sujeito a alto risco de seleção de indivíduos resistentes devido, principalmente, ao seu modo de ação 'uni-sítio' (MA; FELTS; MICHAILIDES, 2003; COLTURATO, 2006). Casos de resistência a inibidores da quinona externa foram

reportados em áreas produtoras de tangerina na Flórida e cinco produtos comerciais tiveram seu uso limitado para o controle da doença durante o ciclo de produção da cultura a fim de evitar a seleção de um número maior de indivíduos resistentes (BRLANSKY; DEWDNEY; ROGERS, 2011). No Brasil, não há relatos de isolados resistentes de *A. alternata*, causadora da mancha marrom, a fungicidas do grupo dos Qol. No entanto, durante a safra 2017, diversos produtores de tangerinas relataram que a aplicação de fungicidas do grupo Qol não tiveram a mesma eficiência daquela observada em anos anteriores (SILVA JR.¹, comunicação pessoal).

Tabela 1. Fungicidas registrados no Brasil para controle de ‘Mancha-de-Alternaria’ em citros e seus respectivos ingredientes ativos (AGROFIT, 2019).

Produto Comercial	Ingrediente ativo
Azimut	azoxistrobina (Qol*) + tebuconazol (DMI*)
Cobre Atar BR	óxido cuproso (inorgânico)
Nativo	tebuconazol (DMI) + trifloxistrobina (Qol)
Redshield 750	óxido cuproso (inorgânico)
Sulfato de Cobre Inderco	sulfato de cobre (inorgânico)
Tarpi	óxido cuproso (inorgânico)

*Qol: grupo dos inibidores da quinona externa

*DMI: grupo dos inibidores da desmetilação do C-14

Na Flórida, a aplicação de fungicidas para o controle da mancha marrom é baseada em um sistema de previsão chamado ‘Alter-Rater’. O sistema realiza a monitoração dos dados de precipitação, molhamento foliar e temperatura para prever as épocas com condições adequadas à infecção de *A. alternata*. O sistema ‘Alter-Rater’ apresenta bons resultados no controle da mancha marrom para essa localidade, diminuindo o número de aplicações, quando comparada ao calendário fixo (BHATIA; ROBERTS; TIMMER, 2003). No Brasil, o uso do calendário fixo de aplicações parece apresentar melhores resultados no controle da doença, apesar do modelo ‘Alter-Rater’, quando testado experimentalmente, ter resultado em maior produtividade e número semelhante de aplicações (PERES; TIMMER, 2006).

3.3. Fungicidas inibidores da quinona externa (Qol)

Os inibidores da quinona externa são uma classe de fungicidas relativamente nova, desenvolvidos nos últimos vinte anos. Esta classe de fungicidas é derivada de um grupo de produtos químicos naturais, proveniente de duas espécies de fungos Basidiomicetos:

Strobilurus tenacellus (Pers. ex Fr.) Singer e *Oudemansiella mucida* (Schrad. ex Fr.) Hohn. O grande sucesso desta classe de fungicidas se deve a diversos fatores: amplo espectro de ação; controle de isolados resistentes a fungicidas com outros modos de ação; baixas doses de aplicação; baixa toxicidade a animais e plantas, (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010; OLIVER; HEWITT, 2014). Os fungicidas Qol apresentam um modo de ação ‘uni-sítio’, agindo na respiração dos fungos. As moléculas se ligam ao sítio Q_o, na cadeia de transporte de elétrons da respiração mitocondrial, bloqueando o transporte de elétrons no complexo enzimático citocromo *bc₁* e, dessa forma, interrompem a produção de ATP pelas células, o que eventualmente leva à morte do organismo (BARTLETT et al., 2001; GISI et al., 2002). A germinação e a mobilidade de esporos são altamente sensíveis a esta classe de fungicidas por serem processos que demandam altas quantidades de energia. Por esta razão, estes processos são mais afetados pelos inibidores da quinona externa. Desta forma, estes fungicidas apresentam melhor eficiência quando aplicados preventivamente, antes da infecção e ou logo após a penetração do patógeno (BARTLETT et al., 2002; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010).

3.4. Resistência de patógenos aos inibidores da quinona externa

A resistência a fungicidas pode ser considerada como uma ‘redução hereditária adquirida, na sensibilidade de um fungo a um agente antifúngico específico (ou fungicida)’ (FRAC, 2019). A resistência a fungicidas pode ser classificado como resistência de campo, onde apenas é confirmada a presença de indivíduos resistentes dentro de uma população e como resistência prática, quando a presença de indivíduos resistentes na população acarreta na visível perda de eficiência do controle de doenças em campo (BRENT; HOLLOMON, 2007). A resistência ocorre normalmente na natureza em populações de indivíduos e o aumento na frequência de patógenos resistentes, ocasionado pela diminuição de indivíduos sensíveis durante o processo de controle de doenças, resulta na diminuição da eficiência de controle (GISI et al., 2002; MA; MICHAILIDES, 2005). Diversos fatores devem ser levados em consideração quando se avalia o risco de seleção das populações resistentes a fungicidas. Os principais fatores de risco de seleção estão relacionados ao patógeno alvo e ao produto a ser utilizado para o controle do patógeno. O modo de ação (uni-sítio ou multi-sítio) é a principal característica relacionada ao risco do fungicida. As características relacionadas ao patógeno incluem a variabilidade genética, o tempo de geração e a adaptabilidade dos isolados resistentes em relação à população sensível (LEADBEATER, 2012).

Apesar dos benefícios ocasionados pelo uso dos Qol, dois anos após o início de sua comercialização, em 1996, foi possível observar o efeito do uso extensivo destes produtos. Em 1998, na Alemanha, houve o primeiro relato de resistência de *Blumeria graminis f. sp. tritici*, causador do oídio no trigo, aos fungicidas azoxistrobina e kresoxim methyl (ISHII et al., 2001). Os anos seguintes foram marcados pelo aparecimento de diversos patógenos resistentes aos Qol. Em 2018, o Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas (FRAC) havia registrado 64 patógenos resistentes aos inibidores da quinona externa (FRAC, 2019). Desta forma, foi necessário adaptar medidas e táticas de manejo contra resistência, a fim de diminuir a seleção de indivíduos resistentes, como a limitação do número de aplicações dos fungicidas Qol, a alternância ou o uso de misturas com fungicidas de diferentes modos de ação, o uso limitado aos estádios iniciais do desenvolvimento da doença (LEADBEATER, 2012). No Brasil, a principal forma de uso deste grupo de fungicidas é em combinação com produtos do grupo químico DMI (Tabela 1) (AGROFIT, 2019).

Os relatos de resistência ao grupo químico dos inibidores da quinona externa indicam que a resistência de fungos ocorre por meio de mutações pontuais no gene do citocromo b. Pelo menos onze mutações pontuais ou combinadas podem ocorrer no gene *cyt b*, porém, três são as mutações detectadas em fungos fitopatogênicos que governam a resistência aos inibidores da quinona externa. As mutações resultantes da substituição dos aminoácidos glicina por alanina no códon 143 (G143A), fenilalanina por leucina no códon 129 (F129L) e a substituição de glicina por arginina no códon 137 (G137R) levam à resistência a fungicidas do grupo Qol. O fator de resistência conferido pelas mutações F129L e G137R é normalmente baixo e a resistência resultante é moderada. Por outro lado, a mutação G143A promove um alto fator de resistência, conferindo ao patógeno resistência completa aos fungicidas do grupo Qol (GISI et al., 2002; MA; MICHAILIDES, 2005; LEADBEATER, 2012). Diversos estudos apontam que as alterações genéticas decorrentes da mutação no códon 143 apresentam pequeno ou nenhum efeito negativo sobre a adaptabilidade de patógenos como em *Botrytis cinerea* (MARKOGLU et al., 2006), *Magnaporthe oryzae* (MA; UDDIN, 2009), *Plasmopara viticola* (CORIO-COSTET et al., 2011) e *Venturia inaequalis* (LESNIAK et al., 2011). Karaoglanidis et al. (2010) observaram que mutações no códon 143 não acarretaram efeitos negativos sobre a adaptabilidade de isolados de *A. alternata* em pistache.

Mutações genéticas não são a única forma de resistência relatada para inibidores da quinona externa. Wood e Hollomon (2003) destacam a importância da via alternativa de oxidase (AOX) como mecanismo de resistência. A via alternativa permite o desvio dos elétrons destinados ao complexo citocromo *bc1*, evitando o sítio inibitório dos Qol. Apesar da capacidade de fornecer uma via alternativa para a respiração, a eficiência do processo fornece apenas 40% dos valores padrões de produção de ATP, não sendo suficiente para

fornecer a energia necessária ao processo de germinação, que demanda grande quantidade de energia, porém pode fornecer uma capacidade protetora ao micélio, principalmente quando há o uso de sub doses indicadas de fungicidas (WOOD; HOLLomon, 2003; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolados de *Alternaria alternata*

Dois grupos distintos de isolados foram utilizados neste trabalho: o primeiro grupo, coletado em 2003 e 2004, logo após a identificação da doença em áreas produtoras de tangerinas no Estado de São Paulo, e o segundo grupo, coletado em 2017 e 2018, logo após os relatos de falhas no controle da mancha marrom de alternaria mesmo com o uso de fungicidas do grupo Qol.

Os isolados de 2003 e 2004, seis no total, e os isolados de 2017, vinte e oito, foram obtidos a partir da micoteca 'Dra. Victoria Rossetti' na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento Sorocaba, do Instituto Biológico, conforme apresentado na Tabela 2. Estes isolados foram utilizados para determinação da CE_{50} de piraclostrobina e azoxistrobina. Os isolados foram multiplicados a partir de culturas monospóricas e preservados em papel de filtro esterilizado e permaneceram armazenados em microtubos Eppendorf de 2 ml contendo sílica-gel à temperatura de -20 °C até sua utilização nas avaliações.

Os isolados de 2018 foram coletados em pomares de tangerina no Estado de São Paulo (Tabela 2). As coletas foram realizadas em propriedades com talhões de tangor 'Murcott' ou tangerina 'Ponkan' com presença de sintomas da doença (Figura 2) e com histórico da utilização de fungicidas Qols como estratégia de controle químico. A Figura 3 apresenta a distribuição da localização das áreas onde foram realizadas as coletas dos isolados.

Tabela 2. Município, código, número de isolados coletados, hospedeiro, órgão da planta e data de coleta de isolados de *Alternaria alternata*.

Cidade	Código	# Isolados	Hospedeiro	Órgão	Ano de coleta
Campanha	LRS 09/03	1	'Ponkan'	Ramo	02/2003
Casa Branca	LRS 15/03	1	'Murcott'	Frutos	02/2003
Botucatu	LRS 21/03	1	'Murcott'	Frutos	02/2003
Capão Bonito	LRS 35/03	1	'Nova'	Frutos	05/2003
Capão Bonito	LRS 41/03	1	'Murcott'	Frutos	05/2003
Aguai	LRS 32/04	1	'Ponkan'	Frutos	04/2004
Porto Feliz	LRS 01/17 a 09/17	9	'Murcott'	Frutos	01/2017
São Pedro do Turvo	LRS 21/17 a 30/17	9	'Murcott'	Frutos	04/2017
Ubirajara	LRS 31/17 a 40/17	10	'Murcott'	Frutos	04/2017
Bariri	BA 1 a 28	28	'Ponkan'	Frutos	04/2018
Buri	BU 1 e 2	2	'Ponkan'	Frutos	04/2018
Conchal	CH 1 a 26	26	'Ponkan'	Frutos	04/2018
Paranapanema	LRS X/18	6	'Ponkan'	Frutos	04/2018
Pratânia	PR 1 a 10	10	'Ponkan'	Frutos	04/2018
Socorro	SC 1 a 28	28	'Murcott'	Frutos	04/2018

Figura 2. Frutos apresentando sintomas típicos da mancha marrom de alternaria utilizados para obtenção dos isolados de *Alternaria alternata*.

Para os isolados de 2018, frutos sintomáticos foram armazenados em sacos de papel monolúcidos, de forma individual, sem que houvesse contato entre as amostras, para evitar contaminações. As amostras foram identificadas com: o tipo de órgão coletado (fruto), dados do talhão (variedade e idade); município; data da coleta, coordenada geográfica e nome da propriedade. Após a coleta, as embalagens fossem acondicionadas em local fresco e arejado até que fossem levadas ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) ou para o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Nestes locais, os frutos foram armazenados em câmaras frias, na temperatura de 4 °C, a fim de diminuir o crescimento do fungo ou de possíveis patógenos que pudessem contaminar as amostras e preservar os frutos por maior período de tempo, até que todos os isolamentos fossem realizados.

Figura 3. Municípios do Estado de São Paulo nos quais foram realizadas coletas de tangor 'Murcott' com sintomas de mancha marrom de alternaria que originaram os isolados utilizados neste trabalho.

O isolamento do patógeno a partir de lesões foi realizado pelo método de isolamento indireto conforme metodologia de Alfenas e Mafia (2016). Fragmentos do tecido dos frutos na região de transição entre os sintomas e o tecido sadio foram retirados utilizando-se um bisturi flambado. Os fragmentos foram transferidos para uma solução aquosa de álcool 70%, onde permaneceram por um período de 30 segundos. Após este período, os fragmentos foram transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,5%, onde permaneceram por um período de um minuto. Após este período, os fragmentos foram rapidamente submersos em água destilada e estéril para remover o excesso de hipoclorito de sódio e, em seguida, colocados em papel de filtro esterilizado para remover o excesso de água.

Após os procedimentos de desinfestação, os fragmentos foram depositados em placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-água (BDA). Os fragmentos referentes a um fruto foram colocados em placas individuais, no máximo de 4 fragmentos por placa. Em casos onde havia um alto número de fragmentos, mais de uma placa foi utilizada por fruto, porém somente uma colônia por fruto foi isolada, a fim de se obter apenas um isolado por fruto.

Culturas monospóricas foram obtidas para cada isolado coletado. Foram preparadas suspensões de 10^3 conídios.ml⁻¹ para cada isolado, utilizando-se a câmara de Neubauer para calibração da concentração. Três alíquotas de 30 µl foram depositadas em placas de Petri com meio ágar-água e próximas à borda da placa respeitando uma distância mínima de 2 centímetros entre elas. Imediatamente após a deposição do inóculo, as placas foram inclinadas num ângulo de aproximadamente 75°, permitindo que o inóculo se distribuisse em linhas ao longo do meio de cultura. As placas permaneceram incubadas em temperatura ambiente por quatro horas, até a germinação inicial dos conídios. Com o auxílio de um microscópio ótico (aumento final de 100x), um fragmento do meio de cultura contendo um conídio germinado foi retirado e colocado em placas contendo o meio BDA. A maioria dos isolados foi coletada da área oposta à deposição da gota.

Após o crescimento das colônias monospóricas, estas foram preservadas utilizando-se o método de preservação em papel de filtro e armazenadas em envelopes identificados, na temperatura de -20 °C até utilização para avaliação da sensibilidade.

4.2. Determinação da CE₅₀ de piraclostrobina e azoxistrobina a isolados de *Alternaria alternata*

A determinação da CE₅₀ de piraclostrobina (COMET® 250 g.l⁻¹) e azoxistrobina (VANTIGO® 500 g.Kg⁻¹) foi realizada para os trinta e quatro isolados coletados em 2003, 2004 e 2017 (Tabela 2). Foi determinada a CE₅₀ dos isolados por meio da metodologia descrita por Vega et al., (2012) e Ma et al. (2003). Soluções estoque de piraclostrobina e azoxistrobina nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 µg.ml⁻¹ de ingrediente ativo foram preparadas previamente por meio da adição do produto comercial à água destilada estéril.

As soluções foram adicionadas ao meio ágar-água, previamente padronizado para a temperatura de 50 °C, utilizando banho-maria, a fim de se obter as concentrações finais de: 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg.ml⁻¹ de ingrediente ativo. A fim de suprimir a via alternativa de respiração fúngica (via AOX), soluções de ácido salicilhidroxâmico (SHAM) foram preparadas, utilizando metanol como solvente, na concentração de 100 mg.ml⁻¹ e adicionadas imediatamente após a adição das soluções estoque de fungicida. A concentração final de metanol no meio ágar-água foi de 1 ml.l⁻¹. Dessa forma, os meios de cultura receberam a adição de 100 µg.ml⁻¹ de SHAM. Ao final da adição das soluções dos fungicidas e de SHAM, o meio foi agitado vigorosamente para que fosse homogeneizado.

Suspensões de conídios foram preparadas individualmente para cada isolado

Fonte de referência não encontrada.. Conídios obtidos a partir da raspagem de colônias

de *A. alternata* de 7 a 9 dias de idade, crescidas em meio V8 (100 ml de suco V8, 900 ml de água destilada, 20 g de ágar e 10 g de carbonato de cálcio) com uma alça de platina foram colocados em tubos Eppendorfs de 2 ml contendo água destilada estéril. A partir desta suspensão inicial, novas suspensões foram calibradas e preparadas na concentração de 10^4 conídios.ml⁻¹ utilizando-se um hemocitômetro (câmara de Neubauer). Foram adicionadas 3 alíquotas de 30 µL da suspensão calibrada, por placa, em três placas de poliestireno contendo meio de cultura já solidificado com SHAM e a respectiva dose de fungicida, totalizando nove alíquotas de 30 µL. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento (B.O.D.) por 12 horas a 27 °C, no escuro. Após o período de incubação, a germinação foi paralisada utilizando-se uma alíquota de 50 µL de lactoglicerol. Foi avaliada a porcentagem de germinação por meio da contagem aleatória de 100 conídios por placa, utilizando-se microscópio ótico (aumento final de 100x). Os conídios foram considerados germinados quando apresentaram tubo germinativo maior ou igual ao comprimento do conídio ou quando apresentavam mais de um tubo germinativo por conídio. A porcentagem de germinação de cada placa representa uma repetição, totalizando três repetições, utilizando um delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi realizado duas vezes.

A partir dos valores de germinação obtidos em cada experimento, a inibição da germinação de cada isolado foi calculada utilizando-se a equação:

$$IG_i = 1 - \left(\frac{G_{ji}}{G_{max}} \right)$$

onde: **IG_i** representa a proporção de inibição da germinação na i-ésima repetição (1, 2 e 3); **G_{ji}** representa a proporção da germinação na j-ésima dose do fungicida (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg.ml⁻¹) e na i-ésima repetição (1, 2 e 3) e **G_{max}** é a proporção da germinação máxima observada na ausência do fungicida. Para cada experimento a inibição da germinação em cada dose de fungicida foi calculada pela média dos valores de IG de cada repetição.

O cálculo da CE₅₀ para cada isolado foi realizado pela regressão linear entre os valores médios da concentração do fungicida (em Log₁₀) e os valores de IG (variável dependente).

4.3. Mapeamento da sensibilidade da população com base em doses discriminatórias

Os isolados coletados na safra 2018 foram avaliados quanto a sua sensibilidade a partir de doses discriminatórias. A partir dos resultados de CE_{50} obtidos no item 4.2, foram determinadas as concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de piraclostrobina e 1 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de azoxistrobina para a classificação dos isolados coletados em 2018. A germinação dos isolados foi feita de acordo com a metodologia descrita no item 4.2. Foram considerados resistentes os isolados que apresentaram germinação superior a 50% em doses iguais ou superiores a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em ambos os fungicidas avaliados. As doses de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para piraclostrobina e azoxistrobina, respectivamente, foram utilizadas para avaliar níveis altos de resistência a estes fungicidas.

4.4. Sensibilidade *in vivo* de isolados de *Alternaria alternata* a piraclostrobina e azoxistrobina

A fim de avaliar a presença de resistência prática aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina, foram realizados testes *in vivo* em folhas jovens de tangerina 'Murcott', com quatro centímetros de comprimento. As folhas foram coletadas de mudas de tangerinas 'Murcott', mantidas em vasos em casa de vegetação. As folhas foram lavadas em água corrente para limpeza superficial e submetidas ao processo de desinfestação por meio da imersão em álcool 70% por 30 segundos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 0,5% por 1 minuto e duplo enxágue em água destilada estéril por aproximadamente 20 segundos para remoção do excesso de hipoclorito. Após o enxágue, as folhas foram colocadas em câmara de fluxo laminar para secagem por pelo menos 30 minutos, até ficarem completamente secas.

Após a desinfestação e a secagem, as folhas foram submergidas em solução dos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina, nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou água destilada estéril para controle, por 60 segundos. As folhas foram deixadas em câmara de fluxo laminar para secagem por pelo menos 2 horas, até estarem completamente secas.

Após a secagem das folhas, estas foram inoculadas com suspensão de conídios de *A. alternata* na concentração de 10^4 conídios. mL^{-1} . O experimento foi realizado com 9 isolados de *A. alternata*, 4 sensíveis e 5 resistentes, apresentados na Tabela 3 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** As folhas foram inoculadas com aspersão da suspensão do inóculo na face abaxial até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as folhas foram depositadas individualmente sobre papel de filtro estéril em caixas plásticas tipo Gerbox. As

folhas foram posicionadas com a face abaxial voltada para cima. Após a inoculação, as folhas foram mantidas em incubação em câmaras de crescimento (B.O.D.) a 27 °C com fotoperíodo de 12/12 horas. Foram utilizadas 5 folhas para cada isolado em cada tratamento de fungicida e no tratamento controle, onde cada folha representa uma repetição.

A avaliação foi realizada três dias após a inoculação, onde quantificou-se a incidência da doença.

Tabela 3. Código, local e fenótipo da sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata*, determinado *in vitro*, utilizados nos testes *in vivo* em folhas destacadas.

Isolado	Origem (cidade, estado)	Fenótipo
LRS 09/03	Campanha - MG	Sensível
LRS 15/03	Casa Branca - SP	Sensível
LRS 35/03	Capão Bonito - SP	Sensível
LRS 32/04	Aguaí - SP	Sensível
LRS 01/17	Porto Feliz - SP	Resistente
LRS 24/17	São Pedro do Turvo - SP	Resistente
LRS 34/17	Ubirajara - SP	Resistente
CH 01	Conchal - SP	Resistente
SC 14	Socorro - SP	Resistente

4.5. Extração de DNA, reação de PCR e sequenciamento de parte do gene *cyt b*

Cinco isolados da safra 2003, um isolado da safra 2004, vinte e oito isolados da safra 2017 e doze isolados da safra 2018 foram selecionados para identificar possíveis mutações nos códons 129, 137 e 143 da região “*hot spot*” do gene *cyt b*. A extração do DNA foi realizada utilizando o Kit Promega – “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”. O DNA foi extraído de colônias de *A. alternata* de 7 a 10 dias de idade, utilizando o protocolo “Yeast Cultures” modificado, conforme recomendações do fabricante. Todas as amostras de DNA foram quantificadas após a extração em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific™).

Reações de polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo 12,5 µl de PCR Master Mix (Promega Corporation), 1 µl de cada primer, 8,5 µl de Nuclease Free Water, 2 µl de DNA ou água (controle) nas condições de 94 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e extensão final de 5 minutos a 72 °C, conforme descrito por Vega et al. (2012). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2%, onde alíquotas de 2 µL de cada produto foram misturadas a 3 µL de SYBRTM Safe DNA Gel Stain.

Os primers utilizados para identificação de possíveis mutações foram cytb2f (forward) e DTRcytb2-INTr (reverse). A Tabela 4 contém a lista de sequência dos primers, sua temperatura de anelamento, tempo de extensão, região alvo de amplificação e a referência utilizada para a obtenção dos primers.

Tabela 4. Sequência dos primers, temperatura de anelamento, tempo de extensão, região alvo de amplificação dos primers utilizados na caracterização molecular da sensibilidade dos isolados de *Alternaria alternata* a fungicidas inibidores da quinona externa.

Primers*	Sequência 5' a 3'	Temperatura de anelamento	Tempo de Extensão (minutos)	Região amplificada
cytb2f	CTATGGATCTTACAG AGCAC	57 °C	5	códon 129, 137 e 143
DTRcytb2- INTr	GTATGTAACCGTCT CCGTC	57 °C	5	

*Primers descritos por VEGA et al. (2012)

Foi realizada a purificação de todos os produtos da reação de PCR utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System seguindo o protocolo do fabricante (Quick Protocol – A9281). As sequências obtidas foram comparadas com sequências do citocromo b de *A. alternata* disponíveis no GenBank, utilizando o programa BioEdit versão 7.2.5.

4.6. Ensaio de microtitulação à base de resazurina para avaliação da sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* a piraclostrobina e azoxistrobina

A resazurina (RZ) é um corante não tóxico à base de tetrazólio utilizado em testes de sensibilidade química de fungos e bactérias. A RZ em sua forma oxidada não fluorescente (azul), quando reduzida, passa para sua forma fluorescente (rosa) em resposta ao metabolismo do microrganismo. A redução da molécula ocorre concomitantemente à fase final de redução do oxigênio (O₂) no complexo do citocromo a-a₃.

Os trinta e quatro isolados coletados em 2003, 2004 e 2017 foram submetidos a um ensaio de sensibilidade utilizando o método da resazurina descrito por Veja et al. (2012).

Soluções estoque de piraclostrobina e azoxistrobina foram preparadas utilizando-se meio completo de maneira semelhante ao item 4.2. Doze poços da placa de microtitulação receberam 100 µl de meio completo modificado com fungicida a: 0; 0,002; 0,02; 0,2; 2; 20 e 200 µg.ml⁻¹. Em seguida, foram adicionados 80 µl de 10⁵ conídios.ml⁻¹ e 20 µl de RZ 400 µM. As concentrações finais dos fungicidas nos poços foram de: 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg.ml⁻¹. As placas foram cobertas com uma tampa de plástico, colocadas em uma

câmara úmida e incubadas a 28 °C durante 24 horas com agitação a 300 rpm. A redução de RZ foi calculada com base na leitura de absorbância a 570 e 600 nm. A percentagem relativa de redução de RZ foi expressa como a relação entre a percentagem de redução de RZ na presença de fungicida pela percentagem na ausência de fungicida multiplicada por 100.

A percentagem de redução da resazurina foi calculada usando a equação:

$$\frac{(\epsilon_{OX})\lambda_2 A \lambda_1 - (\epsilon_{OX})\lambda_1 A \lambda_2}{(\epsilon_{RED})\lambda_1 A' \lambda_2 - (\epsilon_{RED})\lambda_2 A' \lambda_1} \times 100$$

onde: ϵ_{OX} = coeficiente de extinção molar da forma oxidada da resazurina (azul; 80,586 e 117,216 para 570 e 600 nm, respectivamente); ϵ_{RED} = coeficiente de extinção molar da forma reduzida da resazurina (rosa; 155,677 e 14,652 para 570 e 600 nm, respectivamente); A = absorbância dos poços teste; A' = absorbância dos poços de controle negativos; λ_1 = 570 nm; e λ_2 = 600 nm. A reação da resazurina mede a atividade metabólica do crescimento fúngico, portanto a percentagem de redução da resazurina corresponde a taxa de respiração do fungo.

A sensibilidade dos isolados expressada em microgramas por mililitro foi determinada pela concentração efetiva necessária para reduzir a resazurina em 50% (CE_{50}) usando uma função exponencial de decaimento:

$$RZ(lc) = ae^{(-blc)}$$

onde: $RZ(lc)$ = percentagem da redução da RZ, lc = concentração do fungicida, a = constante no valor inicial lc e b = coeficiente angular.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da CE_{50} de isolados de *Alternaria alternata* a piraclostrobina e azoxistrobina

O valor de CE_{50} para sensibilidade de base (baseline) dos isolados de *A. alternata* coletados em 2003 e 2004 variou de 0,001 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 0,027 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para piraclostrobina e de 0,016 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 0,130 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para azoxistrobina (Tabela 5). Os isolados coletados em São Paulo a partir da safra 2017 tiveram valores de CE_{50} variando de 1,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a maiores que 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a piraclostrobina, enquanto todos os isolados apresentaram valores superiores a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a azoxistrobina. Estes isolados foram considerados resistentes a ambos os fungicidas, pois apresentaram valores de CE_{50} maiores que 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para piraclostrobina e para azoxistrobina. A frequência de distribuição dos isolados sensíveis e resistentes mostra que a maioria destes apresentaram CE_{50} superior a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 4).

Houve maior variabilidade dos resultados obtidos nos experimentos com o fungicida piraclostrobina, ao contrário dos resultados observados para a azoxistrobina. Um pequeno número de isolados apresentou valores de CE_{50} de piraclostrobina inferiores a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LRS 03/17, LRS 09/17, LRS 22/17, LRS 23/17, LRS 25/17, LRS 26/17, LRS 37/17 e LRS 38/17). Apesar dessa variação, foi possível observar o aumento da CE_{50} dos isolados de 2017 quando comparados aos isolados coletados em 2003 e 2004, ano em que a doença foi identificada no Estado de São Paulo e na ausência de controle químico.

Tabela 5. Concentração efetiva de fungicidas inibidores da quinona externa necessária para reduzir a germinação de conídios em 50% (EC_{50}) e fenótipo da sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata*.

Isolado	Fungicida			
	Piraclostrobina		Azoxistrobina	
	EC_{50} (ug.ml ⁻¹)	Fenótipo	EC_{50} (ug.ml ⁻¹)	Fenótipo
LRS 09/03	0,025	Sensível	0,016	Sensível
LRS 15/03	0,027	Sensível	0,035	Sensível
LRS 21/03	0,025	Sensível	0,086	Sensível
LRS 35/03	0,001	Sensível	0,107	Sensível
LRS 41/03	0,014	Sensível	0,129	Sensível
LRS 32/04	0,020	Sensível	0,073	Sensível
LRS 01/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 02/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 03/17	2,59	Resistente	>100	Resistente
LRS 04/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 05/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 06/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 07/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 08/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 09/17	1,45	Resistente	>100	Resistente
LRS 21/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 22/17	2,62	Resistente	>100	Resistente
LRS 23/17	7,62	Resistente	>100	Resistente
LRS 24/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 25/17	3,60	Resistente	>100	Resistente
LRS 26/17	11,80	Resistente	>100	Resistente
LRS 27/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 29/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 30/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 31/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 32/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 33/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 34/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 35/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 36/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 37/17	11,77	Resistente	>100	Resistente
LRS 38/17	24,02	Resistente	>100	Resistente
LRS 39/17	>100	Resistente	>100	Resistente
LRS 40/17	>100	Resistente	>100	Resistente

*Valores apresentados representam a média de dois experimentos independentes

Figura 4. Distribuição da frequência de 34 isolados de *Alternaria alternata* coletados em 2003, 2004 e 2017 em presença dos fungicidas piraclostrobina (preto) e azoxistrobina (branco) em função da concentração efetiva dos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina necessária para reduzir a germinação de conídios em 50%.

Como exemplo de fenótipo resistente, conídios do isolado LRS 24/17 resistente a ambos os fungicidas apresentaram alta porcentagem de germinação, independentemente da dose de fungicida adicionada ao meio de cultura. Mesmo após 12 horas na presença de fungicida, o tamanho do tubo germinativo, na maioria dos conídios, foi maior que o dobro do tamanho dos conídios (Figuras 5 e 6).

Em alguns casos observa-se germinação de mais de uma célula por conídio. Nos isolados resistentes não houve diferenças morfológicas nem quantitativas na germinação de conídios de *A. alternata* quando expostos ou não aos fungicidas piraclostrobina (Figura 5) e azoxistrobina (Figura 6).

Figura 5. Germinação de conídios do isolado LRS 24/17 de *Alternaria alternata* em meio ágar-água com ou sem a adição do fungicida piraclostrobina. (A) Controle sem fungicida; (B) 1 µg.ml⁻¹ de piraclostrobina; (C) 10 µg.ml⁻¹ de piraclostrobina; (D) 100 µg.ml⁻¹ de piraclostrobina.

Figura 6. Germinação de conídios do isolado LRS 24/17 de *Alternaria alternata* em meio ágar-água com ou sem a adição do fungicida azoxistrobina. (A) Controle sem fungicida; (B) 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de azoxistrobina; (C) 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de azoxistrobina; (D) 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de azoxistrobina.

5.2. Mapeamento da sensibilidade da população de *A. alternata* com base em doses discriminatórias

Dentre os cem isolados de *A. alternata* coletados no Estado de São Paulo em 2018, 35% mostraram fenótipo sensível a piraclostrobina e 16% a azoxistrobina (Tabela 6) com base na inibição da germinação na dose de 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Todos os isolados com fenótipo resistente a piraclostrobina também mostraram resistência a azoxistrobina, porém o inverso não ocorreu (Tabela 6). Além disso, nas doses mais elevadas, 48% dos isolados mostraram alta taxa de germinação para piraclostrobina, enquanto 72% mostraram alta taxa de germinação para azoxistrobina (Tabela 6).

Houve grande variação quanto a inibição de germinação dos isolados entres os dois fungicidas testados. Alguns isolados apresentaram disparidades quanto a classificação entre resistente e sensível, principalmente nas regiões de Socorro, Paranapanema e Pratânia.

Tabela 6. Porcentagens de inibição da germinação de conídios de cem isolados de *Alternaria alternata* conferidas por diferentes doses dos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina “*in vitro*” e classificação fenotípica da resistência.

Isolado	Fungicida					
	Piraclostrobina			Azoxistrobina		
	% Inibição 1 ug.ml ⁻¹	% Inibição 10 ug.ml ⁻¹	Fenótipo	% Inibição 1 ug.ml ⁻¹	% Inibição 100 ug.ml ⁻¹	Fenótipo
BA 01	14,83%	64,14%	R	1,01%	37,58%	R
BA 02	44,02%	67,18%	R	3,87%	58,10%	R
BA 03	45,91%	72,95%	R	1,33%	80,00%	R
BA 04	26,13%	70,73%	R	0,00%	21,96%	R
BA 05	47,26%	83,22%	R	3,01%	23,75%	R
BA 06	99,26%	100,00%	S	99,00%	100,00%	S
BA 07	18,33%	42,67%	R	2,33%	1,33%	R
BA 08	17,63%	46,10%	R	6,33%	15,67%	R
BA 09	32,50%	86,67%	R	8,36%	20,07%	R
BA 10	23,63%	92,81%	R	41,47%	37,46%	R
BA 11	24,01%	62,37%	R	0,00%	18,46%	R
BA 12	30,69%	53,79%	R	4,33%	10,33%	R
BA 13	76,49%	100,00%	S	12,42%	30,54%	R
BA 14	0,37%	30,71%	R	7,67%	20,33%	R
BA 15	11,70%	35,82%	R	11,78%	83,84%	R
BA 17	8,07%	70,18%	R	5,66%	11,32%	R
BA 18	3,38%	11,15%	R	0,00%	27,65%	R
BA 19	12,65%	50,99%	R	2,70%	46,96%	R
BA 20	5,92%	33,45%	R	1,68%	13,42%	R
BA 21	0,98%	39,22%	R	10,07%	56,60%	R
BA 22	0,00%	51,35%	R	2,33%	58,67%	R
BA 23	0,00%	49,58%	R	31,63%	90,14%	R
BA 24	12,29%	84,32%	R	1,02%	29,93%	R
BA 25	5,05%	44,78%	R	2,35%	50,00%	R
BA 26	11,39%	60,85%	R	2,04%	12,24%	R
BA 27	10,07%	81,65%	R	4,10%	57,00%	R
BA 28	0,00%	7,02%	R	0,67%	4,67%	R

Tabela 6. Continuação

Isolado	Fungicida					
	Piraclostrobina			Azoxistrobina		
	% Inibição 1 ug.ml ⁻¹	% Inibição 10 ug.ml ⁻¹	Fenótipo	% Inibição 1 ug.ml ⁻¹	% Inibição 100 ug.ml ⁻¹	Fenótipo
BA 29	3,86%	40,35%	R	1,36%	5,08%	R
BU 01	7,38%	72,15%	R	0,00%	3,34%	R
BU 02	4,17%	44,70%	R	0,00%	0,34%	R
CH 01	0,00%	27,27%	R	2,74%	4,11%	R
CH 02	0,68%	31,51%	R	0,00%	49,32%	R
CH 03	0,00%	9,09%	R	0,00%	1,02%	R
CH 04	3,73%	43,39%	R	0,34%	0,00%	R
CH 05	11,58%	65,79%	R	18,99%	27,91%	R
CH 06	0,00%	14,97%	R	1,00%	3,00%	R
CH 07	0,00%	36,14%	R	4,01%	7,02%	R
CH 08	0,00%	20,74%	R	0,00%	13,26%	R
CH 09	0,00%	4,04%	R	0,00%	6,73%	R
CH 10	2,46%	20,77%	R	1,00%	7,36%	R
CH 11	0,00%	0,00%	R	0,67%	6,02%	R
CH 12	1,68%	4,36%	R	2,36%	0,00%	R
CH 13	0,34%	32,32%	R	1,00%	3,01%	R
CH 14	0,00%	11,37%	R	0,00%	63,55%	R
CH 15	33,99%	70,75%	R	0,00%	22,48%	R
CH 16	9,77%	60,16%	R	0,00%	72,91%	R
CH 17	0,00%	6,94%	R	0,00%	44,29%	R
CH 18	2,77%	17,65%	R	0,00%	43,81%	R
CH 19	5,15%	12,02%	R	0,00%	2,73%	R
CH 20	0,00%	13,54%	R	0,67%	3,33%	R
CH 21	3,67%	6,67%	R	17,00%	36,00%	R
CH 22	3,07%	8,87%	R	0,00%	1,38%	R
CH 23	27,17%	73,19%	R	9,06%	59,73%	R
CH 24	4,35%	50,00%	R	1,01%	44,63%	R

Tabela 6. Continuação

Isolado	Fungicida					
	Piraclostrobina			Azoxistrobina		
	% Inibição 1 ug.ml ⁻¹	% Inibição 10 ug.ml ⁻¹	Fenótipo	% Inibição 1 ug.ml ⁻¹	% Inibição 100 ug.ml ⁻¹	Fenótipo
CH 25	4,71%	64,31%	R	4,12%	24,74%	R
CH 26	9,67%	44,67%	R	0,00%	92,49%	R
LRS 05/18	58,24%	98,17%	S	0,00%	27,46%	R
LRS 06/18	66,54%	96,24%	S	1,36%	21,36%	R
LRS 09/18	53,05%	73,12%	S	0,00%	45,21%	R
LRS 10/18	42,37%	91,19%	R	8,64%	58,02%	R
LRS 11/18	54,32%	98,56%	S	0,00%	15,77%	R
LRS 12/18	33,64%	96,36%	R	13,71%	43,14%	R
PR 01	53,42%	99,32%	S	22,36%	55,28%	R
PR 02	51,46%	90,15%	S	1,00%	23,00%	R
PR 03	33,83%	96,28%	R	47,46%	88,47%	R
PR 04	53,95%	88,66%	S	1,04%	41,87%	R
PR 05	72,47%	91,99%	S	1,33%	6,33%	R
PR 06	65,38%	96,15%	S	1,34%	26,85%	R
PR 07	28,96%	97,31%	R	0,67%	31,33%	R
PR 08	14,95%	69,04%	R	0,00%	12,21%	R
PR 09	8,11%	79,05%	R	3,36%	16,44%	R
PR 10	52,70%	91,89%	S	0,34%	20,00%	R
SC 01	100,00%	100,00%	S	99,66%	100,00%	S
SC 02	7,77%	76,01%	R	3,69%	32,55%	R
SC 03	100,00%	100,00%	S	99,66%	100,00%	S
SC 04	100,00%	100,00%	S	92,25%	100,00%	S
SC 05	100,00%	100,00%	S	97,42%	100,00%	S
SC 06	100,00%	100,00%	S	43,43%	60,94%	R
SC 07	10,91%	60,00%	R	33,33%	51,33%	R
SC 08	99,64%	99,64%	S	99,66%	100,00%	S
SC 10	100,00%	97,67%	S	73,63%	84,62%	S

Tabela 6. Continuação

Isolado	Fungicida					
	Piraclostrobina			Azoxistrobina		
	% Inibição 1 ug.ml ⁻¹	% Inibição 10 ug.ml ⁻¹	Fenótipo	% Inibição 1 ug.ml ⁻¹	% Inibição 100 ug.ml ⁻¹	Fenótipo
SC 11	100,00%	100,00%	S	41,50%	57,48%	R
SC 13	100,00%	100,00%	S	1,33%	88,33%	R
SC 14	13,76%	28,19%	R	6,18%	5,82%	R
SC 15	100,00%	100,00%	S	99,66%	100%	S
SC 16	100,00%	100,00%	S	32,61%	19,57%	R
SC 17	100,00%	97,95%	S	47,67%	66,00%	R
SC 18	75,93%	96,27%	S	62,88%	90,64%	S
SC 19	62,46%	87,71%	S	93,31%	100,00%	S
SC 20	98,46%	100,00%	S	99,66%	100,00%	S
SC 21	98,92%	99,64%	S	17,00%	36,00%	R
SC 22	95,90%	100,00%	S	54,06%	63,25%	*
SC 23	99,64%	100,00%	S	50,33%	43,00%	*
SC 24	3,58%	63,44%	R	32,00%	36,67%	R
SC 25	100,00%	100,00%	S	64,65%	75,08%	S
SC 26	100,00%	100,00%	S	35,67%	61,67%	R
SC 27	1,95%	38,28%	R	20,40%	34,45%	R
SC 28	100,00%	100,00%	S	50,00%	68,28%	S
SC 29	100,00%	100,00%	S	23,49%	30,87%	R
SC 30	100,00%	100,00%	S	99,66%	100,00%	S

* O fenótipo não pode ser classificado com base na porcentagem de inibição de germinação

A distribuição de frequência de isolados resistentes mostrou variação em função da localidade de coleta (Figuras 7 e 8). Considerando os 128 isolados coletados em 2017 e 2018, 73% foram classificados como resistentes à piraclostrobina e 8/% foram classificados como resistentes à azoxistrobina (Anexos A e B).

A presença de isolados resistentes a azoxistrobina está amplamente distribuída pelo Estado de São Paulo nos principais municípios produtores de tangerina onde houve a coleta de isolados, o que é motivo de preocupação para o controle da doença e produção de tangerinas por todo o Estado. A frequência de isolados resistentes a piraclostrobina não mostra relação com a região de coleta. Por exemplo, nas propriedades de Socorro, 18% dos isolados foram resistentes, enquanto em Conchal, a 72 km de distância, 100% dos isolados mostram resistência (Figura 7)

Figura 7. Distribuição geográfica dos isolados de *Alternaria alternata* sensíveis e resistentes ao fungicida piraclostrobina pelo Estado de São Paulo. Cinza claro representa a frequência de isolados sensíveis e cinza escuro, a de resistentes.

Figura 8. Distribuição geográfica dos isolados de *Alternaria alternata* sensíveis e resistentes ao fungicida azoxistrobina pelo Estado de São Paulo. Cinza claro representa a frequência de isolados sensíveis e cinza escuro, a de resistentes.

Houve significativo aumento nos valores médios de CE_{50} tanto para piraclostrobina quanto para azoxistrobina, desde a primeira constatação do patógeno no Brasil, até atualmente. Com valores médios de $0,04 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ nos anos de 2003 e 2004, respectivamente, a seleção de indivíduos resistentes na população elevou a CE_{50} média, de cada fungicida separadamente, para valores superiores a $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

Figura 9. Evolução da CE_{50} de isolados de *Alternaria alternata* entre os anos de 2003, 2004, 2017 e 2018 para piraclostrobina (A) e azoxistrobina (B).

5.1. Teste de sensibilidade *in vivo* de isolados à piraclostrobina e azoxistrobina

Houve redução significativa na incidência da doença nas folhas tratadas com fungicidas e inoculadas com isolados de *A. alternata* que apresentaram sensibilidade a fungicidas nos testes *in vitro* (Tabela 7). Não foram observados sintomas nas folhas tratadas com piraclostrobina e inoculadas com isolados sensíveis e apenas 20% das folhas inoculadas com o isolado 32/04 foi capaz de infectar folhas tratadas com azoxistrobina (Tabela 7 e Figura 10). Sintomas típicos de mancha marrom de alternaria foram observados nas folhas inoculadas com isolados resistentes, mesmo após o tratamento com fungicidas (Figura 10). Para os isolados resistentes, diversos apresentaram incidência semelhante (LRS 24/17, CH 01 e SC 14) ou maior (LRS 34/17) ao tratamento controle tanto para piraclostrobina, quanto para azoxistrobina (Tabela 7).

Tabela 7. Incidência de mancha marrom de alternaria, em folhas de tangor ‘Murcott’, inoculadas com isolados sensíveis e resistentes de *Alternaria alternata* aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina.

Isolados	Incidência (%)		
	Controle	Piraclostrobina	Azoxistrobina
<i>Sensíveis</i>			
LRS 9/3	100%	0%	0%
LRS 15/3	60%	0%	0%
LRS 35/3	60%	0%	0%
LRS 32/4	40%	0%	20%
<i>Resistentes</i>			
LRS 1/17	80%	40%	80%
LRS 24/17	80%	80%	80%
LRS 34/17	60%	100%	100%
CH 01	100%	80%	40%
SC 14	100%	100%	100%

Figura 10. Aspecto de folhas de tangor 'Murcott', após o teste de resistência prática realizado com isolados de *Alternaria alternata* sensíveis (LRS 32/04) e resistentes (LRS 34/17) aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina.

5.2. Extração de DNA, reação de PCR e sequenciamento de parte do gene *cyt b*

Após a extração e reação de PCR, todos os isolados foram submetidos à análise de qualidade de amplificação por meio da observação em gel de agarose (Figura 11). Todos os isolados testados foram amplificados pelo par de primers *cytb2f* (forward) e *DTRcytb2-INT* (reverse).

Figura 11. Qualidade da reação de PCR de 32 isolados de *Alternaria alternata* utilizados para obtenção dos valores de CE_{50} . Bandas destacadas em cada corrida, correspondentes a cada isolado, encontram-se na posição relativa à região alvo do gene *cyt b*.

Após o sequenciamento, as amostras foram alinhadas e comparadas entre si na região dos códons 129, 137 e 143. Todos os isolados classificados como resistentes nos testes *in vitro* apresentaram sequências idênticas, porém diferentes daqueles classificados

como sensíveis (Figura 12). Todos os isolados das safras 2003 e 2004 não apresentaram nenhuma das mutações que conferem a resistência aos fungicidas Qols. Por outro lado, todos os isolados da safra 2017 apresentaram a mutação G143A, característica de isolados com alta resistência aos fungicidas Qols (Figura 12) e que explica os valores de CE_{50} obtidos pelos testes de germinação de esporos. Nos municípios de Bariri e Socorro as populações foram heterogêneas. Em ambos os casos foram encontrados isolados sensíveis e resistentes na população, demonstrando que o processo de seleção de indivíduos resistentes ainda ocorre nos pomares destes municípios.

Figura 12. Alinhamento de sequências parciais do *citocromo b* (*cyt b*) de isolados de *Alternaria alternata* classificados como sensíveis (linha superior) e resistentes (linha inferior) e sua sequência traduzida para aminoácidos.

Nenhum isolado apresentou mutações nos códons 129 e 137 (Tabela 8). O isolado SC 23, com genótipo de sensibilidade, foi classificado como sensível a piraclostrobina, mas ficou no limiar da resistência para azoxistrobina, pois a inibição da germinação de conídios na presença desse fungicida foi de 50,3% na concentração de $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Tabela 6), não sendo possível realizar a classificação deste isolado para a azoxistrobina. Para todos os demais isolados, houve coincidência entre as classificações genotípicas e fenotípicas

Tabela 8. Isolados e presença de mutações responsáveis pela resistência a fungicidas inibidores da quinona externa (Qols).

Isolado	Fenótipo		Genótipo		
	Piraclostrobina	Azoxistrobina	Mutação F129L	Mutação G137R	Mutação G143A
LRS 09/03	Sensível	Sensível	N	N	N
LRS 15/03	Sensível	Sensível	N	N	N
LRS 21/03	Sensível	Sensível	N	N	N
LRS 35/03	Sensível	Sensível	N	N	N
LRS 41/03	Sensível	Sensível	N	N	N
LRS 32/04	Sensível	Sensível	N	N	N
LRS 01/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 02/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 03/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 04/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 05/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 06/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 07/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 09/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 21/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 22/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 23/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 24/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 25/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 26/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 27/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 29/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 30/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 31/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 32/17	Resistente	Resistente	N	N	S

Tabela 8. Continuação

Isolado	Fenótipo		Genótipo		
	Piraclostrobina	Azoxistrobina	Mutação F129L	Mutação G137R	Mutação G143A
LRS 33/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 34/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 35/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 36/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 37/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 38/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 39/17	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 40/17	Resistente	Resistente	N	N	S
BA 6	Sensível	Sensível	N	N	N
BA 7	Resistente	Resistente	N	N	S
BU 1	Resistente	Resistente	N	N	S
CH 1	Resistente	Resistente	N	N	S
CH 26	Resistente	Resistente	N	N	S
LRS 05/18	Sensível	Resistente	N	N	S
LRS 06/18	Sensível	Resistente	N	N	S
PR 3	Resistente	Resistente	N	N	S
PR 8	Resistente	Resistente	N	N	S
SC 1	Sensível	Sensível	N	N	N
SC 14	Resistente	Resistente	N	N	S
SC 23	Sensível	*	N	N	N

5.3. Ensaio de microtitulação à base de resazurina para avaliação da sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* a fungicidas

Dos trinta e quatro isolados analisados por meio do ensaio de microtitulação, utilizando a resazurina, apenas quatorze para o fungicida piraclostrobina e quatro para o fungicida azoxistrobina apresentaram valores de *a* e *b* significativos (Tabelas 9 e 10) para o modelo baseado na função exponencial de decaimento (Anexos C e D). Apesar disso, 96% dos isolados classificados como resistentes a piraclostrobina e a azoxistrobina apresentaram redução da resazurina acima de 50% na concentração de 1 ug.ml⁻¹ de fungicida. Além disso, a maioria dos isolados resistentes apresentou valores superiores a 50% de redução em concentrações de 10 ug.ml⁻¹ (Anexos E e F). Para os isolados classificados como resistentes, os valores de CE₅₀ variaram entre 1,26 ug.ml⁻¹ a superiores a 100 ug.ml⁻¹ para a piraclostrobina (Tabela 9) e de 94,375 ug.ml⁻¹ para a azoxistrobina (Tabela 10). Os isolados classificados anteriormente como sensíveis apresentaram valores de CE₅₀ entre 0,001 ug.ml⁻¹ e 0,012 ug.ml⁻¹ para piraclostrobina (Tabela 9) e entre 0,0003 ug.ml⁻¹ a 0,438 ug.ml⁻¹ para azoxistrobina (Tabela 10).

Tabela 9. Valores do intercepto x (a), do coeficiente angular (b), do coeficiente de determinação (R^2) e da CE_{50} estimados pela curva de decaimento obtida com valores de redução da resazurina em função da concentração de piraclostrobina de isolados de *Alternaria alternata*. O ensaio seguiu o método de microtitulação à base de resazurina.

Isolado	a	b	R^2	CE_{50} (ug.ml ⁻¹)
LRS 09/03	18,54	0,31	0,84	0,001
LRS 15/03	21,57	0,37	0,93	0,006
LRS 35/03	20,36	0,41	0,96	0,006
LRS 42/04	31,33	0,24	0,81	0,012
LRS 23/17	60,26	0,14	0,92	21,956
LRS 24/17	51,01	0,20	0,91	1,260
LRS 25/17	67,44	0,11	0,90	> 100
LRS 26/17	74,46	0,11	0,72	> 100
LRS 29/17	56,39	0,21	0,97	3,841
LRS 30/17	69,06	0,09	0,74	> 100
LRS 31/17	61,19	0,17	0,93	16,458
LRS 33/17	67,51	0,13	0,77	> 100
LRS 34/17	65,78	0,14	0,85	> 100
LRS 36/17	57,82	0,27	0,89	3,473

Tabela 10. Valores do intercepto x (a), do coeficiente angular (b), do coeficiente de determinação (R^2) e da CE_{50} estimados pela curva de decaimento obtida com valores de redução da resazurina em função da concentração de azoxistrobina de isolados de *Alternaria alternata*. O ensaio seguiu o método de microtitulação à base de resazurina.

Isolado	a	b	R^2	EC_{50} (ug.ml ⁻¹)
LRS 35/03	39,156	0,166	0,961	0,0340
LRS 41/03	21,492	0,241	0,884	0,0003
LRS 32/04	47,038	0,170	0,950	0,4380
LRS 37/17	64,315	0,127	0,727	94,3750

Não houve correlação entre os valores de CE_{50} obtidos a partir do método da microtitulação com resazurina e do método de germinação de conídios por meio da análise de regressão linear. Apesar disso, a classificação visual pode ser realizada facilmente quando comparados isolados resistentes e sensíveis. Isolados que apresentaram coloração rosada em poços com concentração superiores a 1 ug.ml⁻¹ foram classificados como resistentes, enquanto isolados que apresentaram coloração azulada em poços com concentração inferiores a 1 ug.ml⁻¹ foram sensíveis (Figura 13). Houve coincidência na classificação dos isolados em sensíveis ou resistentes, pelos métodos da germinação de esporos e pelo método da microtitulação à base de resazurina.

Figura 13. Dose resposta do ensaio de microtitulação à base de resazurina de isolados de *Alternaria alternata* (colunas) resistentes e sensíveis em diferentes concentrações do fungicida azoxistrobina (linhas).

6. DISCUSSÃO

Este trabalho mostrou a predominância de indivíduos resistentes a fungicidas Qols em populações de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom de alternaria em tangerinas, no Estado de São Paulo. Em sete das nove localidades amostradas, 100% dos indivíduos apresentaram resistência a azoxistrobina e apenas em pomares do município de Socorro, a porcentagem de indivíduos sensíveis superou aquela dos resistentes (Figura 8). No caso do fungicida piraclostrobina, 100% dos indivíduos mostraram resistência em cinco das nove localidades amostradas. Dentre as restantes, em três delas a população de indivíduos resistentes foi menor que a de sensíveis (Figura 7). Portanto, a distribuição de indivíduos resistentes em todas as localidades amostradas, requer a aplicação urgente de medidas anti-resistência.

No Brasil, fungicidas Qols para o controle de *A. alternata* vêm sendo usado por vários anos. Atualmente, os fungicidas registrados para o controle da mancha marrom de alternaria, têm nos ingredientes ativos azoxistrobina (Qol), tebuconazol (DMI), óxido cuproso (inorgânico), trifloxistrobina (Qol) e sulfato de cobre (inorgânico) a base do controle da doença nas áreas produtoras (AGROFIT, 2019). No entanto, não há produtos registrados nos quais o único ingrediente ativo seja a azoxistrobina. O produto comercial Comet® (piraclostrobina 250 g.l⁻¹) foi um dos primeiros fungicidas Qols registrados para o controle da mancha marrom de alternaria. Com o surgimento da ferrugem asiática da soja no Brasil, as empresas químicas passaram a produzir misturas de fungicidas DMIs e Qols para o manejo da doença nas áreas produtoras de soja. O fungicida Comet® não teve seu registro renovado para a mancha marrom de alternaria, mas os registros das misturas de DMIs e Qols, empregados na soja, foram estendidos para o patossistema tangerina – *A. alternata*. Desta forma, o uso de misturas no Brasil é relativamente novo para o controle de *A. alternata* em citros (AGROFIT, 2019; Feichtenberger², comunicação pessoal). O número de aplicações de fungicidas Qols nas áreas de produção de tangerinas pode chegar a 20 (Moraes³, comunicação pessoal), valor relativamente alto. O FRAC recomenda limitação no número de aplicações de fungicidas Qols e sua alternância com fungicidas de outros grupos químicos, mesmo em misturas, a fim de diminuir a pressão de seleção para indivíduos resistentes (FRAC, 2019). Apesar destas diretrizes, diversos produtores realizam grande número de aplicações consecutivas com o mesmo ingrediente ativo. Na Flórida, onde há relatos da presença de resistência a fungicidas deste grupo químico, a recomendação de

² FEICHTENBERGER, E. Instituto Biológico.

³ MORAES, M.R. **Controle de mancha marrom de *Alternaria* em murcote**. Palestra ministrada aos funcionários do Sítio Bela Vista, Conchal, SP, 08 jul. 2019.

aplicações de fungicidas Qols é de 4 por safra, com a ressalva de nunca utilizar fungicidas do mesmo modo de ação sequencialmente (VEGA et al., 2012; DEWDNEY, 2019).

Apesar do registro de misturas para o controle da doença, produtores relatam casos de falhas constantes no controle da mancha marrom de alternaria em campo. Desta forma, a adoção de misturas parece não ter impedido a seleção de indivíduos resistentes em áreas de produção.

A CE_{50} dos isolados coletados nos anos de 2003 e 2004 variou de 0,0009 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 0,027 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para piraclostrobina e de 0,016 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 0,130 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para azoxistrobina. Estes resultados são semelhantes aos observados na Flórida, onde a sensibilidade inicial para piraclostrobina e azoxistrobina variaram, respectivamente, de 0,004 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 0,036 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 0,060 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 0,254 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (VEGA et al., 2012; VEGA; DEWDNEY, 2014). A presença de isolados resistentes a piraclostrobina e a azoxistrobina foi observada em todas as áreas analisadas nos anos de 2017 e 2018. Em 2017, houve grande aumento da CE_{50} , com valores médios superiores a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, na maioria dos isolados.

Alguns isolados mostraram maior sensibilidade a piraclostrobina em comparação a azoxistrobina. Por exemplo, a CE_{50} do isolado LRS 09/17 foi de 1,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para piraclostrobina e superior a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para azoxistrobina. O mesmo pode ser notado na inibição da germinação utilizando-se doses discriminatórias. O fungicida piraclostrobina parece ter uma fungitoxicidade inerente maior que a azoxistrobina. Em 18% dos isolados houve discrepâncias no fenótipo entre os fungicidas, nas doses discriminatórias, sendo em todos os casos sensíveis a piraclostrobina e resistentes a azoxistrobina. Resultados semelhantes foram encontrados para outros patógenos, os quais apresentaram maior sensibilidade para a piraclostrobina quando comparada a azoxistrobina como em *Monilinia fruticola* (AMIRI; BRANNEN; SCHNABEL, 2010), *Cercospora zeae-maydis* (BRADLEY; PEDERSEN, 2011), *Phytophthora cactorum* (REBOLLAR-ALVITER et al., 2007), *Alternaria solani* (PASCHE; WHARAM; GUDMESTAD, 2004) e *A. alternata* em citros (MONDAL et al., 2005).

Trabalhos realizados por Mondal (2005), Pasche et al. (2007) e Bradley e Pedersen (2011) relatam diferenças de até dez vezes nas doses necessárias para a inibição de 50% da germinação de conídios entre piraclostrobina e azoxistrobina. Arakawa et al. (2018) avaliaram as características responsáveis pela interação entre três diferentes inibidores da quinona externa em indivíduos selvagens e resistentes, a fim de compreender os fatores responsáveis pela sua efetividade ou perda da mesma em casos onde há mutações genéticas responsáveis por conferir resistência. Apesar de serem do mesmo grupo químico, as moléculas apresentam componentes estruturais diferentes e revelaram que a eficácia contra fungos mutantes resistentes dependia fortemente da interação de partes constituintes do inibidor disposto próximo ao centro ativo da proteína alvo, neste caso o *citocromo b*.

Desta forma, as diferenças de CE_{50} entre a piraclostrobina e a azoxistrobina observadas neste trabalho podem ser devidas ao seguinte conjunto de fatores: diferenças estruturais das moléculas, sua interação com cada constituinte estrutural do sítio alvo e da sua afinidade de ligação.

Todas as áreas avaliadas a partir do ano de 2017 apresentaram pelo menos um isolado com a mutação G143A, mas nem todos os isolados considerados resistentes apresentaram a mutação G143A ou qualquer uma das outras mutações que conferem perda de sensibilidade a fungicidas inibidores da quinona externa. A ocorrência da mutação que causa a substituição do aminoácido glicina por alanina no códon 143 está ligada à perda completa da sensibilidade a este grupo de fungicidas (GISI et al., 2002) e, consequentemente, às possíveis falhas de controle reportadas por diversos produtores de tangerina nos últimos anos (Silva Junior¹, comunicação pessoal). A mutação no códon 143 parece não afetar negativamente a adaptabilidade de diversos fungos fitopatogênicos como *A. alternata* em citros (VEGA; DEWDNEY, 2014), *Colletotrichum acutatum* (FORCELINI et al., 2018) em morango e *Botrytis cinerea* em diversos hospedeiros (VELOUKAS et al., 2014). Além disso, estudos mostram que esta mutação apresenta estabilidade e persistência na ausência de pressão de seleção (FORCELINI et al., 2018). Dessa forma, mesmo que o fungicida deixe de ser aplicado por um longo período de tempo, são grandes as chances de seleção de indivíduos resistentes, no caso de reintrodução de um fungicida do mesmo grupo.

A avaliação de sensibilidade de fungos inibidores da quinona externa por meio do método de germinação de esporos requer uma grande quantidade de materiais, espaço e tempo para ser realizada. A análise de microtitulação de resazurina vem se apresentando como forma de avaliação da sensibilidade a diversos grupos de fungicidas como uma ferramenta rápida, sem a necessidade de grande quantidade de materiais e espaço (RAMPERSAD, 2012). Diversos fungos fitopatogênicos como *Monilinia fructicola* (COX et al., 2009), *Verticillium dahliae* (RAMPERSAD, 2011), *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. truncatum* (RAMPERSAD; TEELUCKSINGH, 2012), apresentaram resultados satisfatórios com o uso da resazurina e semelhantes aos métodos comumente utilizados para avaliar a sensibilidade a fungicidas DMIs e Qols, como o método do crescimento micelial e a germinação de esporos, respectivamente. No presente trabalho, diferentemente do observado no trabalho realizado por Vega et al. (2012), não houve correlação entre os valores de CE_{50} estimados pelos métodos da resazurina e de germinação de esporos. Apesar disso, o método da resazurina, foi tão eficiente quanto o da germinação de esporos para detectar indivíduos resistentes, ou seja, nas doses discriminatórias ambos os métodos apresentaram resultados fenotípicos semelhantes (Anexo G). Desta forma, para os isolados utilizados neste trabalho, o método da resazurina não foi preciso na estimativa da CE_{50} dos

isolados de *A. alternata* nas mesmas condições do trabalho realizado por Vega et al. (2012). Porém, como observado na Figura 13, o método demonstrou-se muito eficiente na classificação qualitativa dos isolados sensíveis ou resistentes. Todos os isolados sensíveis apresentaram coloração azulada em concentrações inferiores a $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Em comparação, isolados classificados como resistentes pelo método da germinação de esporos (CE_{50} superior a $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$) apresentaram coloração rosada até em concentrações muito superiores a $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Desta forma, o método da resazurina se apresenta como uma metodologia rápida e eficiente para a classificação de isolados quanto a sua sensibilidade a fungicidas inibidores da quinona externa por meio de doses discriminatórias.

A resistência prática, observada em campo e reportada por diversos produtores de tangerina, foi confirmada com testes de sensibilidade *in vivo*. Os resultados obtidos nos testes *in vivo* corroboram aqueles observados nos testes de germinação de esporos. Mesmo com o uso de doses de $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$, os fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina foram ineficientes no controle da doença. As doses recomendadas em campo para a piraclostrobina e azoxistrobina, nos produtos comerciais utilizados, são de $38 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente. A observação de incidências semelhantes entre os tratamentos com e sem a aplicação de fungicidas nos isolados resistentes mostra que, mesmo em doses de campo, os fungicidas seriam ineficientes no controle da doença. A condução de ensaios *in vivo* com isolados monospóricos selvagens e expostos aos fungicidas, com suspeita de resistência, é um passo reconhecidamente importante para a confirmação da resistência (HOLLOMON, 2015), porém poucos trabalhos realizam esse tipo de avaliação. Os resultados observados no teste *in vivo* é semelhante ao observado por Avila-Adame et al. (2003) em *Colletotrichum graminicola*. Isolados apresentando a mutação G143A apresentaram altos valores de CE_{50} e, ao mesmo tempo, severidades semelhantes em tratamentos com fungicidas Qols em comparação com tratamentos onde não foi realizado a aplicação de fungicidas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi confirmada a presença de isolados de *Alternaria alternata* da tangerina resistentes aos fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina em nove municípios do Estado de São Paulo. Os isolados resistentes apresentaram a mutação G143A, responsável pela perda total de sensibilidade a este grupo de fungicidas, e CE_{50} muito superior aos isolados sensíveis. A maioria dos indivíduos das populações amostradas em 2017 e 2018 mostraram resistência a esses fungicidas. Com a confirmação da presença de isolados resistentes amplamente distribuídos pelo Estado de São Paulo e a baixa eficiência dos fungicidas Qols no controle da mancha marrom de alternaria, faz-se necessária a adoção imediata de medidas de manejo de resistência para diminuição da seleção de indivíduos resistentes, por meio da utilização de produtos com diferentes modos de ação e conscientização dos produtores sobre a importância do manejo anti-resistência para o controle efetivo da doença.

O método da resazurina, apesar de não apresentar correlação quantitativa com o método da germinação de esporos, pode ser recomendado para a separação de isolados sensíveis e resistentes por meio de doses discriminatórias, facilitando a detecção destes indivíduos em áreas com possíveis falhas de controle, implicando em uma maior rapidez na tomada de decisão quanto a possíveis estratégias de manejo anti-resistência em áreas produtoras de tangerinas.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT – **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2019. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 07 nov. 2019.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. 2 ed. Editora UFV. 516p. 2016.
- AMIRI, A.; BRANNEN, P. M.; SCHNABEL, G. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from south carolina and georgia to respiration inhibitor fungicides. **Plant Disease**, v. 94, n. 6, p. 737–743, jun. 2010.
- ARAKAWA, A.; KASAI, Y.; YAMAZAKI, K.; IWAHASHI, F. Features of interactions responsible for antifungal activity against resistant type cytochrome bc1: A data-driven analysis based on the binding free energy at the atomic level. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 19 nov. 2018.
- AVILA-ADAME, C.; OLAYA, G.; KÖLLER, W. Characterization of *Colletotrichum graminicola* Isolates Resistant to Strobilurin-Related QoI Fungicides. **Plant Disease**, v. 87, n. 12, p. 1426–1432, dez. 2003.
- AZEVEDO, F. A.; POLYDORO, D. A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K. C.; STUART, R. M.; COSTA, F. P.; PIO, R. M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação in vitro e in vivo de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 944–951, 2010.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODFREY, C. R. A.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HEANEY, S. P.; MAUND, S. J. **Understanding the strobilurin fungicides**. Pesticide Outlook, v. 12, n. 4, p. 143–148, 6 nov. 2001.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002.
- BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F. A.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Mancha Marrom De *Alternaria*: Uma Interação Fungo, Toxina E Tangerina. **Laranja**, v. 26, n. 2, p. 323–336, 2005.
- BHATIA, A.; ROBERTS, P. D.; TIMMER, L. W. Evaluation of the Alter-Rater model for timing of fungicide applications for control of alternaria brown spot of citrus. **Plant Disease**, v. 87, n. 9, p. 1089–1093, set. 2003.
- BRADLEY, C. A.; PEDERSEN, D. K. Baseline sensitivity of *Cercospora zeae-maydis* to quinone outside inhibitor fungicides. **Plant Disease**, v. 95, n. 2, p. 189–194, fev. 2011.

- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. Defining Fungicide Resistance In: BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?** FRAC Monograph No. 1, 2nd ed., p. 9, 2007.
- CANIHOS, Y.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of Minneola tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, v. 83, n. 5, p. 429–433, 1999.
- CHIARINI, R. F.; JACOMINO, A. P.; DE ARRUDA-PALHARINI, M. C.; DA SILVA, A. P. G.; ANDRADE, C. A. W. Processamento mínimo de tangor “Murcott”: Tipos de corte, sanificação e eliminação do excesso de líquidos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 9, 2017.
- CHUNG, K.-R. Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–17, 2012.
- COLTURATO, A. B.; PAULOSSI, T.; FURTADO, E. L.; VENÂNCIO, W. S. Efficiency and cost of chemical control of alternaria brown spot. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 210–215, 2009.
- COLTURATO, A. **Efeito do meio de cultura, temperatura, fotoperíodo e fungicidas no crescimento micelial e no controle de *Alternaria alternata* f. sp. citri, causador da mancha marrom do tangor murcote**. 2006. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”, 2006.
- CORIO-COSTET, M. F.; DUFOUR, M. C.; CIGNA, J.; ABADIE, P.; CHEN, W. J. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, n. 2, p. 315–329, 17 fev. 2011.
- COX, K. D.; QUELLO, K.; DEFORD, R. J.; BECKERMAN, J. L. A rapid method to quantify fungicide sensitivity in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, v. 93, n. 4, p. 328–331, abr. 2009.
- DEWDNEY, M. M. 2018 – **2019 Florida Citrus Production Guide: Alternaria Brown Spot**. p. 3, 2019.
- FAOSTAT - **The Food and Agriculture Organization**. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 07 nov. 2019.
- FERNANDEZ-ORTUÑO, D.; TORES, J.A.; DE VICENTE, A.; PEREZ-GARCIA, A. The QoI fungicides, the rise and fall of a successful class of agricultural fungicides. In: CARISSE, O. (Ed.). **Fungicides**. Rijeka: InTech Publ. Chap. 10, p. 203- 220, 2013
- FERREIRA, E. A.; MOREIRA, S. I.; PERINA, F. J.; ALVES, E. Mancha-marrom-de-Alternária em tangerineiras e seus híbridos: identificação e manejo. EPAMIG. **Circular Técnica**. 2016

- FORCELINI, B. B.; REBELLO, C. S.; WANG, N. Y.; PERES, N. A. Fitness, competitive ability, and mutation stability of isolates of *Colletotrichum acutatum* from strawberry resistant to Qol fungicides. **Phytopathology**, v. 108, n. 4, p. 462–468, abr. 2018.
- FRAC – **Fungicide Resistance Action Committee**. 2019. Disponível em: <<https://www.frac.info/publications/downloads>>. Acesso em: 07 nov. 2019.
- GISI, U.; SIEROTZKI, H.; COOK, A.; MCCAFFERY, A. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 859–867, 2002.
- GOES, A.; OCA, A. G. M. ; REIS, R.F. Occurrence de la mancha de alternaria em mandarina 'Dancy' en el Estado do Rio de Janeiro. In: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2001, São Pedro. Fitopatologia Brasileira, v. 26. p. 386-386, 2001.
- HOLLOMON, D.W. Development of Fungicide Resistance. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D.W. **Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and Guide to Practical Management**. Springer Japan, cap. 1, p. 3-11, 2015.
- IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>>. Acesso em: 07 nov. 2019.
- ISHII, H.; FRAAIJE, B. A.; SUGIYAMA, T.; NOGUCHI, K.; NISHIMURA, K.; TAKEDA, T.; AMANO, T.; HOLLOMON, D. W. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. **Phytopathology**, v. 91, n. 12, p. 1166–1171, dez. 2001.
- KARAOGLANIDIS, G. S.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Competitive ability and fitness of *Alternaria alternata* isolates resistant to Qol fungicides. **Plant Disease**, v. 95, n. 2, p. 178–182, 2011.
- LEADBEATER, A. Resistance risk to Qol fungicides and anti-resistance strategies. In: THIND, T.S. (Ed.). **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. Oxfordshire: CABI, cap. 12, p.141-154, 2012.
- LESNIAK, K. E.; PROFFER, T. J.; BECKERMAN, J. L.; SUNDIN, G. W. Occurrence of Qol resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia inaequalis*. **Plant Disease**, v. 95, n. 8, p. 927–934, ago. 2011.
- MA, B.; UDDIN, W. Fitness and competitive ability of an azoxystrobin-resistant G143A mutant of *Magnaporthe oryzae* from perennial ryegrass. **Plant Disease**, v. 93, n. 10, p. 1044–1049, out. 2009.
- MA, Z.; FELTS, D.; MICHAILIDES, T. J. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 2, p. 66–74, 2003.

- MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 853–863, 2005.
- MARKOGLU, A. N.; MALANDRAKIS, A. A.; VITORATOS, A. G.; ZIOGAS, B. N. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, v. 115, n. 2, p. 149–162, 21 jun. 2006.
- MARTELLI, I. B. **Manejo da mancha marrom de alternária em citros: poda de limpeza e correlação com a lagarta minadora**. 2011. Instituto Agronômico, 2011.
- MONDAL, S. N.; BHATIA, A.; SHILTS, T.; TIMMER, L. W. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. **Plant Disease**, v. 89, n. 11, p. 1186–1194, nov. 2005.
- OLIVER, R.; HEWITT, H.G. **Fungicides in crop protection**. 2nd ed. Oxfordshire: CABI Publ.; CAB International, 200 p, 2014.
- PASCHE, J. S.; WHARAM, C. M.; GUDMESTAD, N. C. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 181–187, 2004.
- PERES, N. A.; TIMMER, L. W. Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangor in Brazil. **Crop Protection**, v. 25, n. 5, p. 454–460, 2006.
- RAMPERSAD, S. N. A rapid colorimetric microtiter bioassay to evaluate fungicide sensitivity among *Verticillium dahliae* isolates. **Plant Disease**, v. 95, n. 3, p. 248–255, mar. 2011.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors** (Switzerland), v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 10 set. 2012.
- RAMPERSAD, S. N.; TEELUCKSINGH, L. D. Differential responses of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* isolates from different hosts to multiple fungicides based on two assays. **Plant Disease**, v. 96, n. 10, p. 1526–1536, out. 2012.
- REBOLLAR-ALVITER, A.; MADDEN, L. V.; JEFFERS, S. N.; ELLIS, M. A. Baseline and differential sensitivity to two QoI fungicides among isolates of *Phytophthora cactorum* that cause leather rot and crown rot on strawberry. **Plant Disease**, v. 91, n. 12, p. 1625–1637, 2007.
- SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L.; RENAUD, M. S.A. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, 28 (Supl.), p. 152, 2003.
- STUART, R. M.; AZEVEDO, M. B. F. A. DE; MACHADO, M. A. *Alternaria* brown spot. **Laranja**, v. 30, n. 1–2, p. 29–44, 2009.

- TIMMER, L. W. Alternaria brown spot of mandarin. In: WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. (Ed.). **Compendium of Citrus Diseases**. 1st ed. St. Paul, Minnesota: APS Press, p. 8, 1993.
- TIMMER, L. W.; DARHOWER, H. M.; ZITKO, S. E.; PEEVER, T. L.; IBÁÑEZ, A. M.; BUSHONG, P. M. Environmental factors affecting the severity of alternaria brown spot of citrus and their potential use in timing fungicide applications. **Plant Disease**, v. 84, n. 6, p. 638–643, jun. 2000.
- TIMMER, L. W.; PEEVER, T. L.; SOLEL, Z.; AKIMITSU, K. Alternaria diseases of citrus - Novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 42, n. 2, p. 99–112, 2003.
- USDA - **The United States Department of Agriculture**. 2019. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 07 nov. 2019.
- VEGA, B.; DEWDNEY, M. M. Distribution of Qol Resistance in Populations of Tangerine-Infecting *Alternaria alternata* in Florida. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 67–76, jan. 2014.
- VEGA, B.; LIBERTI, D.; HARMON, P. F.; DEWDNEY, M. M. A Rapid Resazurin-Based Microtiter Assay to Evaluate Qol Sensitivity for *Alternaria alternata* Isolates and Their Molecular Characterization. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p. 1262–1270, set. 2012.
- VELOUKAS, T.; KALOGEROPOULOU, P.; MARKOGLU, A. N.; KARAOGLANIDIS, G. S. Fitness and Competitive Ability of *Botrytis cinerea* Field Isolates with Dual Resistance to SDHI and Qol Fungicides, Associated with Several *sdh B* and the *cyt b G143A* Mutations. **Phytopathology**, v. 104, n. 4, p. 347–356, abr. 2014.
- WOOD, P. M.; HOLLOMON, D. W. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of Complex III. **Pest Management Science**, v. 59, n. 5, p. 499–511, maio 2003.

APÊNDICE

Isolado; município; Estado; latitude e longitude das áreas de coleta, e ano de coleta dos 128 isolados de *Alternaria alternata* utilizados neste trabalho.

Isolado	Município	Estado	Latitude	Longitude	Ano de coleta
LRS 09/03	Campanha	MG	21° 50' 10"	45° 24' 02"	2003
LRS 15/03	Casa Branca	SP	21° 46' 12"	47° 5' 31"	2003
LRS 21/03	Botucatu	SP	22° 53' 25"	48° 27' 19"	2003
LRS 35/03	Capão Bonito	SP	24° 0' 21"	48° 20' 58"	2003
LRS 41/03	Capão Bonito	SP	24° 0' 21"	48° 20' 58"	2003
LRS 32/04	Aguai	SP	22° 4' 9"	46° 58' 52"	2004
LRS 01/17	Porto Feliz	SP	23° 12' 55"	47° 31' 26"	2017
LRS 02/17	Porto Feliz	SP	23° 12' 55"	47° 31' 26"	2017
LRS 03/17	Porto Feliz	SP	23° 12' 55"	47° 31' 26"	2017
LRS 04/17	Porto Feliz	SP	23° 12' 55"	47° 31' 26"	2017
LRS 05/17	Porto Feliz	SP	23° 12' 55"	47° 31' 26"	2017
LRS 06/17	Porto Feliz	SP	23° 12' 55"	47° 31' 26"	2017
LRS 07/17	Porto Feliz	SP	23° 12' 55"	47° 31' 26"	2017
LRS 09/17	Porto Feliz	SP	23° 12' 55"	47° 31' 26"	2017
LRS 21/17	São Pedro do Turvo	SP	22° 44' 22"	49° 43' 55"	2017
LRS 22/17	São Pedro do Turvo	SP	22° 44' 22"	49° 43' 55"	2017
LRS 23/17	São Pedro do Turvo	SP	22° 44' 22"	49° 43' 55"	2017
LRS 24/17	São Pedro do Turvo	SP	22° 44' 22"	49° 43' 55"	2017
LRS 25/17	São Pedro do Turvo	SP	22° 44' 22"	49° 43' 55"	2017
LRS 26/17	São Pedro do Turvo	SP	22° 44' 22"	49° 43' 55"	2017
LRS 27/17	São Pedro do Turvo	SP	22° 44' 22"	49° 43' 55"	2017
LRS 29/17	São Pedro do Turvo	SP	22° 44' 22"	49° 43' 55"	2017
LRS 30/17	São Pedro do Turvo	SP	22° 44' 22"	49° 43' 55"	2017
LRS 31/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
LRS 32/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
LRS 33/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
LRS 34/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
LRS 35/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
LRS 36/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
LRS 37/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
LRS 38/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
LRS 39/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
LRS 40/17	Ubirajara	SP	22°31'37"	49°39'46"	2017
BA 01	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 02	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 03	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 04	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 05	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 06	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 07	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 08	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 09	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 10	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 11	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 12	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 13	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 14	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 15	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 17	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018

Continuação

Isolado	Município	Estado	Latitude	Longitude	Ano de coleta
BA 18	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 19	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 20	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 21	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 22	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 23	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 24	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 25	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 26	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 27	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 28	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BA 29	Bariri	SP	21° 58' 46,5"	48° 39' 27,1"	2018
BU 01	Buri	SP	23° 47' 51"	48° 35' 34"	2018
BU 02	Buri	SP	23° 47' 51"	48° 35' 34"	2018
CH 01	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 02	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 03	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 04	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 05	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 06	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 07	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 08	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 09	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 10	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 11	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 12	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 13	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 14	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 15	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 16	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 17	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 18	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 19	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 20	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 21	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 22	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 23	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 24	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 25	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
CH 26	Conchal	SP	22° 19' 17"	47° 10' 22"	2018
LRS 05/18	Paranapanema	SP	23° 47' 39,09"	48° 30' 9,59"	2018
LRS 06/18	Paranapanema	SP	23° 47' 39,09"	48° 30' 9,59"	2018
LRS 09/18	Paranapanema	SP	23° 47' 39,09"	48° 30' 9,59"	2018
LRS 10/18	Paranapanema	SP	23° 47' 39,09"	48° 30' 9,59"	2018
LRS 11/18	Paranapanema	SP	23° 47' 39,09"	48° 30' 9,59"	2018
LRS 12/18	Paranapanema	SP	23° 47' 39,09"	48° 30' 9,59"	2018
PR 01	Pratânia	SP	22° 48' 35"	48° 39' 57"	2018
PR 02	Pratânia	SP	22° 48' 35"	48° 39' 57"	2018
PR 03	Pratânia	SP	22° 48' 35"	48° 39' 57"	2018
PR 04	Pratânia	SP	22° 48' 35"	48° 39' 57"	2018
PR 05	Pratânia	SP	22° 48' 35"	48° 39' 57"	2018
PR 06	Pratânia	SP	22° 48' 35"	48° 39' 57"	2018

Continuação

Isolado	Município	Estado	Latitude	Longitude	Ano de coleta
PR 08	Pratânia	SP	22° 48' 35"	48° 39' 57"	2018
PR 09	Pratânia	SP	22° 48' 35"	48° 39' 57"	2018
PR 10	Pratânia	SP	22° 48' 35"	48° 39' 57"	2018
SC 01	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 02	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 03	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 04	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 05	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 06	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 07	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 08	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 10	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 11	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 13	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 14	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 15	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 16	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 17	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 18	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 19	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 20	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 21	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 22	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 23	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 24	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 25	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 26	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 27	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 28	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 29	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018
SC 30	Socorro	SP	22° 38' 10,6"	46° 32' 27,5"	2018

ANEXOS

ANEXO A. Frequência de isolados de *Alternaria alternata* sensíveis (branco) e resistentes (preto) ao fungicida piraclostrobina distribuídos pelo Estado de São Paulo.

ANEXO B. Frequência de isolados de *Alternaria alternata* sensíveis (branco) e resistentes (preto) ao fungicida azoxistrobina distribuídos pelo Estado de São Paulo.

ANEXO C. Curvas de decaimento obtida com valores de redução da resazurina em função da concentração de piraclostrobina de 14 isolados de *Alternaria alternata* para a obtenção do valor estimado da CE₅₀.

ANEXO D. Curvas de decaimento obtida com valores de redução da resazurina em função da concentração de azoxistrobina de 14 isolados de *Alternaria alternata* para a obtenção do valor estimado da CE_{50} . O isolado LRS 22/17 representa o comportamento observado da maioria dos isolados testados, onde não foi possível obter valores significativos do intercepto x (a), coeficiente angular (b), coeficiente de determinação (R^2).

ANEXO E. Valores de redução da resazurina em função da concentração do fungicida piraclostrobina de 34 isolados de *Alternaria alternata*. Os valores de redução foram obtidos pelo método de microtitulação a base de resazurina

Isolado	Redução da Resazurina (%)						
	Concentração de piraclostrobina ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)						
	0	0,001	0,01	0,1	1	10	100
LRS 09/03	136	46	43	17	15	16	14
LRS 15/03	135	69	43	23	23	19	17
LRS 21/03	117	30	43	23	12	13	13
LRS 35/03	138	72	43	26	19	18	15
LRS 41/03	137	35	43	13	12	13	15
LRS 32/04	132	73	43	32	27	32	26
LRS 01/17	94	73	77	86	51	51	56
LRS 02/17	84	81	71	88	75	64	63
LRS 03/17	93	90	71	98	76	68	64
LRS 04/17	98	82	71	93	85	74	68
LRS 05/17	84	74	86	92	79	62	60
LRS 06/17	83	68	67	82	61	63	59
LRS 07/17	80	79	89	57	72	74	75
LRS 09/17	80	74	80	81	83	73	70
LRS 21/17	92	76	79	81	68	59	62
LRS 22/17	87	87	89	66	58	50	48
LRS 23/17	173	90	83	67	40	40	40
LRS 24/17	177	87	87	82	65	61	51
LRS 25/17	216	103	90	77	87	77	46
LRS 26/17	164	78	78	78	75	67	45
LRS 27/17	188	94	80	47	36	40	32
LRS 29/17	204	101	91	68	55	50	33
LRS 30/17	93	91	76	82	70	73	47
LRS 31/17	183	101	90	68	53	52	52
LRS 32/17	96	89	87	84	106	90	61
LRS 33/17	101	87	95	88	72	59	40
LRS 34/17	177	95	84	80	79	57	39
LRS 35/17	122	79	86	88	88	82	57
LRS 36/17	138	143	78	76	54	52	42
LRS 37/17	125	131	80	88	86	74	61
LRS 38/17	129	63	70	83	84	74	56
LRS 39/17	135	77	72	81	75	78	59
LRS 40/17	135	138	87	85	75	72	55

ANEXO F. Valores de redução da resazurina em função da concentração do fungicida piraclostrobina de 34 isolados de *Alternaria alternata*. Os valores de redução foram obtidos pelo método de microtitulação a base de resazurina

Isolado	Redução da Resazurina (%)						
	Concentração de azoxistrobina ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)						
	0	0,001	0,01	0,1	1	10	100
LRS 01/17	83	81	92	86	89	79	74
LRS 02/17	86	88	95	95	95	85	75
LRS 03/17	76	79	75	80	91	71	73
LRS 04/17	70	71	73	79	90	83	74
LRS 05/17	85	81	94	90	95	79	75
LRS 06/17	86	85	95	91	91	82	66
LRS 07/17	86	86	95	91	92	85	71
LRS 09/17	91	85	91	88	87	85	75
LRS 21/17	80	88	86	87	90	87	40
LRS 22/17	91	88	97	98	99	89	79
LRS 23/17	122	115	106	105	104	97	55
LRS 24/17	129	112	111	126	110	77	42
LRS 25/17	64	51	53	47	40	53	21
LRS 26/17	97	84	85	82	76	68	15
LRS 27/17	112	102	97	91	79	67	39
LRS 29/17	107	100	82	100	94	91	37
LRS 30/17	106	91	84	87	86	76	17
LRS 31/17	106	91	84	86	86	76	40
LRS 32/17	42	43	39	59	47	31	36
LRS 33/17	104	103	95	100	98	83	36
LRS 34/17	105	100	80	96	95	83	44
LRS 35/17	88	78	79	76	75	72	72
LRS 36/17	84	90	91	88	88	82	68
LRS 37/17	85	84	86	82	78	53	36
LRS 38/17	88	82	72	71	60	56	65
LRS 39/17	87	83	82	82	84	83	68
LRS 40/17	81	78	77	89	77	76	68
LRS 09/03	87	35	44	32	28	26	23
LRS 15/03	89	78	25	45	37	37	27
LRS 21/03	90	35	26	21	17	15	15
LRS 35/03	98	67	54	41	40	34	30
LRS 41/03	74	49	30	24	20	20	17
LRS 32/04	72	83	63	50	47	43	36