

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

Avaliação da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerina, a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase

Ana Carolina Botelho dos Reis

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

**Piracicaba
2022**

**Ana Carolina Botelho dos Reis
Engenheira Agrônoma**

**Avaliação da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da
mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da succinato
desidrogenase**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **LILIAN AMORIM**

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

**Piracicaba
2022**

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

Reis, Ana Carolina Botelho dos

Avaliação da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase / Ana Carolina Botelho dos Reis. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011.- - Piracicaba, 2022.

76 p.

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

1. Controle químico 2. Fungicidas ISDH 3. Sensibilidade a fungicidas 4. Tangerinas 5. Doença de plantas I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Inês Venceslau Botelho e Vilmar Pereira dos Reis.

Por todo incentivo e apoio, principalmente, por não medirem esforços para que eu pudesse realizar minha pós-graduação.

Dedico

AGRDECIMENTOS

À Deus, por guiar meus caminhos e por toda proteção.

À toda minha família, especialmente meus pais, Vilmar e Inês, minha avó Marizete e minha tia Solange, por todo apoio, amor e carinho.

À minha orientadora Profa. Dra. Lilian Amorim, pelos ensinamentos, suporte e paciência durante todo meu caminho na pós-graduação.

Ao Dr. Ricardo Feliciano da Silva, por todo conhecimento, auxílio e amizade, principalmente, durante a condução dos meus experimentos.

Ao Dr. Geraldo José da Silva Junior, pelos ensinamentos, contribuições e sugestões para o desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

À técnica do Laboratório de Epidemiologia, Sílvia Lourenço, pelo suporte em meus experimentos e conversas descontraídas.

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior por disponibilizar o Laboratório de Fungos Fitopatogênicos e a Dra. Thaís Bouffleur pelo suporte para os procedimentos de biologia molecular, bem como a Ana Laura Toledo por todo auxílio nos experimentos moleculares.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro durante o curso de mestrado.

Ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia da USP-ESALQ, por fornecer toda estrutura e amparo para o desenvolvimento do curso de mestrado.

À minha amiga, Gleice Renunza, por todo companheirismo, amizade, auxílio e alegrias, estando comigo desde o primeiro dia do curso de mestrado.

Às minhas amigas de Foz do Iguaçu, especialmente, Ana Carolina Freitas e Giuliani Silva, por todo carinho, amizade e suporte mesmo estando distantes.

Aos meus colegas do Laboratório de Epidemiologia, Manoel Penachio, Pamela Dutra, Leonardo Brandão, Ana Laura Toledo e Mateus Amim por todo suporte, amizade, descontração e discussões científicas.

À Profa. Dra. Júlia Ronzella Ottoni, pelo apoio e incentivo para realização da pós-graduação.

“Talvez não tenha conseguido fazer o meu melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. Produção de tangerina	19
3.2. Mancha marrom de alternaria	20
3.2.1. Ciclo da mancha marrom de alternaria em tangerina	21
3.3. Controle da mancha marrom de alternaria	22
3.4. Fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (ISDH)	24
3.4.1. Resistência de fitopatógenos a fungicidas ISDH	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Isolados de <i>Alternaria alternata</i>	29
4.2. Fungicidas	31
4.3. Determinação da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE ₅₀) da germinação de conídios e crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	32
4.3.1. Germinação de conídios de <i>Alternaria alternata</i>	32
4.3.2. Crescimento do tubo germinativo de <i>Alternaria alternata</i>	32
4.3.3. Crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	33
4.4. Concentrações discriminatórias de bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibir o crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	34
4.5. Avaliação <i>in vivo</i> de sensibilidade de isolados de <i>Alternaria alternata</i> com os fungicidas boscalida e pidiflumetofem	35
4.6. Extração de DNA de isolados de <i>Alternaria alternata</i> , reações de polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento das subunidades SDH	36
5. RESULTADOS	39
5.1 Determinação da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE ₅₀) da germinação de conídios de <i>Alternaria alternata</i>	39

5.2 Determinação da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxaproxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE ₅₀) do crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	41
5.3 Concentrações discriminatórias de bixafem, boscalida, fluxaproxade e pidiflumetofem para inibir o crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i>	45
5.4 Avaliação <i>in vivo</i> de sensibilidade de isolados de <i>Alternaria alternata</i> aos fungicidas boscalida e pidiflumetofem	53
5.5 Identificação de pontos de mutações no complexo SDH para isolados de <i>Alternaria alternata</i>	54
6. DISCUSSÃO	57
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS	73

RESUMO

Avaliação da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase

A mancha marrom de alternaria, causada por *Alternaria alternata*, é a principal doença fúngica que afeta tangerinas e seus híbridos. No Brasil, a doença é controlada, principalmente, pelo uso de fungicidas do grupo dos inibidores da quinona externa (IQe) em mistura com inibidores da desmetilação do carbono 14 (IDM), além de produtos cúpricos. Em 2017 houve relatos de ineficiência dos fungicidas sítio-específicos no controle da doença e, em 2021, foi comprovada a resistência de isolados de *A. alternata* coletados em pomares do Estado de São Paulo a fungicidas do grupo IQe. Mediante o cenário de perda de sensibilidade aos fungicidas IQe, utilizados para controle da mancha marrom de alternaria, este estudo objetivou avaliar a sensibilidade de *A. alternata* aos fungicidas bixafem, boscalida, fluxaproxade e pidiflumetofem, todos pertencentes ao grupo dos inibidores da succinato desidrogenase (ISDH). Para atingir esse objetivo, diversos experimentos foram conduzidos, com isolados de *A. alternata* de uma coleção de fenótipos de sensibilidade e resistência a fungicidas do grupo IQe, coletados em diversos municípios do Estado de São Paulo. Inicialmente, a avaliação da sensibilidade de *A. alternata* foi realizada por meio da determinação da concentração efetiva para inibir 50% (CE₅₀) da germinação de conídios, porém nenhum dos fungicidas ISDH testados inibiu a germinação, embora todos afetassem a elongação do tubo germinativo. Assim, a avaliação da sensibilidade aos fungicidas ISDH passou a ser realizada pela inibição do crescimento micelial de *A. alternata*. Foram determinadas as CE₅₀ dos fungicidas para inibição de 37 isolados de *A. alternata* e a sensibilidade de 226 isolados foi avaliada com ensaios onde utilizou-se uma concentração discriminatória para cada um dos fungicidas testados. Todos os isolados de *A. alternata*, exceto o isolado PR 29/21, foram sensíveis aos fungicidas ISDH testados. Os valores de CE₅₀ dos isolados sensíveis variaram de 0,14 a 1,14 µg.ml⁻¹, 0,23 a 8,82 µg.ml⁻¹, 0,10 a 0,97 µg.ml⁻¹, e 0,01 a 0,27 µg.ml⁻¹, respectivamente para os fungicidas bixafem, boscalida, fluxaproxade e pidiflumetofem. A CE₅₀ do isolado PR 29/21 foi >100 µg.ml⁻¹ para boscalida e 15,86 µg.ml⁻¹, 27,20 µg.ml⁻¹ e 1,16 µg.ml⁻¹, respectivamente para bixafem, fluxaproxade e pidiflumetofem. Realizou-se o sequenciamento parcial de subunidades do complexo SDH para identificação de mutações no isolado resistente e em seis isolados adicionais. A mutação H134R na subunidade SDHC, que confere alta resistência ao fungicida boscalida, foi identificada apenas no isolado PR 29/21. Ensaios *in vivo* foram realizados com intuito de verificar a resistência prática aos isolados de *A. alternata* com valores elevados de CE₅₀ a boscalida. O isolado PR 29/21 causou elevada severidade nas folhas tratadas com boscalida, mas o controle da doença foi de 99,6% com o fungicida pidiflumetofem. Os demais isolados foram inibidos pela aplicação dos fungicidas nas folhas de tangerina. Esses resultados mostram que os fungicidas ISDH são uma alternativa para controle da mancha marrom de alternaria em tangerinas, caso venham a ser registrados para controle da doença. Mesmo com a comprovação da sensibilidade de *A. alternata* aos fungicidas ISDH, a identificação de um isolado resistente é um alerta para que medidas anti-resistência sejam

empregadas para promover maior longevidade aos fungicidas sítio-específicos no controle desta doença.

Palavra-chave: Controle químico, Fungicidas ISDH, Sensibilidade a fungicidas, Tangerinas, Doença de plantas

ABSTRACT

Sensitivity evaluation of *Alternaria alternata*, the causal agent of tangerine brown spot, to succinate dehydrogenase inhibitors fungicides

Alternaria brown spot, caused by *Alternaria alternata*, is the main fungal disease that affects tangerines and their hybrids. In Brazil, the disease is mainly controlled by the use of fungicides from the group of Quinone outside inhibitor (QoI) in mixture with 14 α -Demethylation inhibitor (DMI), in addition to copper fungicides. The inefficiency of site-specific fungicides in controlling the disease in tangerine orchards at the State of São Paulo was reported in 2017 and in 2021, the resistance of *A. alternata* isolates to QoI has been proven. Given the scenario of loss of sensitivity to QoI fungicides this study aimed to evaluate the sensitivity of *A. alternata* to the fungicides bixafen, boscalid, fluxapyroxad and pydiflumetofen, all belonging to the group of succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI). To achieve this goal, several experiments were carried out. Initially, the evaluation of the sensitivity of *A. alternata* was performed by determining the effective concentration to inhibit 50% (EC₅₀) of conidia germination, but none of the tested SDHI fungicides inhibited germination, although all affected the germ tube elongation. Thus, the evaluation of sensitivity to SDHI fungicides was performed mycelial growth assays. The EC₅₀ of SDHI fungicides was determined for 37 isolates of *A. alternata*. The sensitivity of additional 226 isolates of *A. alternata* to SDHI fungicides was evaluated by a discriminatory concentration for each of the tested fungicides. All *A. alternata* isolates, except PR 29/21, were sensitive to the tested SDHI fungicides. The EC₅₀ values of the sensitive isolates ranged from 0.14 to 1.14 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0.23 to 8.82 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0.10 to 0.97 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, and 0.01 to 0.27 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively for bixafen, boscalid, fluxapyroxad and pydiflumetofem. The EC₅₀ of isolate PR 29/21 was >100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for boscalid and 15.86 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 27.20 and 1.16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively for bixafen, fluxapyroxad and pydiflumetofem. Partial sequencing of subunits of the SDH complex was performed to identify mutations in the resistant isolate and in six additional isolates. The H134R mutation in the SDHC subunit, which confers high resistance to the boscalid fungicide, was identified only in isolate PR 29/21. *In vivo* assays were carried out in order to verify the practical resistance to *A. alternata* isolates with high EC₅₀ values to boscalid. The PR 29/21 isolate caused high severity in leaves treated with boscalid, but the disease control was 99.6% with the fungicide pydiflumetofem. The other isolates were inhibited by the application of fungicides on tangerine leaves. These results show that SDHI fungicides are an alternative for the control of alternaria brown spot on tangerines, if they are registered to control the disease. Even with the proof of the sensitivity of *A. alternata* to SDHI fungicides, the identification of a resistant isolate is an alert for the use of anti-resistance measures to promote greater longevity to site-specific fungicides in the control of this disease.

Keywords: Chemical control, SDHI fungicides, Sensitivity to fungicides, Tangerines, Plant disease

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo da mancha marrom de alternaria. O fitopatógeno sobrevive em folhas ou frutos aderidos à planta ou caídos ao solo, produz conídios, que são dispersos pelo vento ou chuva e entram em contato com tecido suscetível do hospedeiro; produz toxina específica ao hospedeiro, que é translocada via sistema vascular, dando origem às lesões. Adaptado de Chung (2012).22
- Figura 2. Imagens de conídios germinados do isolado LRS 15/03 de *Alternaria alternata* na presença e na ausência de fungicidas do grupo ISDH. Conídios germinados na ausência de fungicidas (A), a $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (B) e a $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (C) de boscalida e a $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de bixafem (D), fluxapiraxade (E) e pidiflumetofem (F). Imagens ao microscópio ótico, com escala de $100 \mu\text{m}$40
- Figura 3. Tamanho relativo do tubo germinativo dos isolados de *Alternaria alternata* LRS 15/03 (A) e LRS 41/03 (B) em meio de cultura Ágar-Água (AA) com diferentes concentrações de boscalida, bixafem, fluxapiraxade e pidiflumetofem em comparação ao tamanho do tubo germinativo dos mesmos isolados em meio de cultura AA sem adição de fungicida. O tamanho dos tubos germinativos foi determinado após 12 h de incubação em 27°C , na ausência de luz.....41
- Figura 4. Frequência (%) de 36 isolados de *Alternaria alternata* coletados em 2003/2004 ($n=5$), 2017 ($n=10$), 2018 ($n=10$) e 2021 ($n=11$), em relação aos valores da CE_{50} ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) dos fungicidas boscalida (A), bixafem (B), fluxapiraxade (C) e pidiflumetofem (D). O isolado PR 29/21 não está incluso nas figuras.....44
- Figura 5. Distribuição dos valores da concentração efetiva para inibir em 50% (CE_{50}) o crescimento micelial de 36 isolados de *Alternaria alternata*, em frequência acumulada, para os fungicidas boscalida, bixafem, fluxapiraxade e pidiflumetofem. 45
- Figura 6. Crescimento micelial (% em relação ao controle sem fungicida) de 226 isolados de *Alternaria alternata* nas concentrações 10 e $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ para o fungicida boscalida (A), e $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ para bixafem, fluxapiraxade e pidiflumetofem (B). A linha pontilhada horizontal classifica os isolados sensíveis ($< 50\%$ crescimento micelial) e resistentes ($\geq 50\%$ do crescimento micelial). As linhas pontilhadas verticais separam os isolados coletados em anos diferentes. O número de isolados coletados em cada ano é apresentado entre parênteses.....52
- Figura 7. Sequenciamento parcial da subunidade SDHC. Nos códons 400 a 402 contém os nucleotídeos que formam o aminoácido histidina (CAC) no isolado selvagem (linha superior) e arginina (CGC) no isolado com mutação (linha inferior). A flecha indica o ponto de substituição dos aminoácidos e o número acima o códon da mutação.....55

Figura 8. Sequenciamento parcial da subunidade SDHD. Os números superiores correspondem à posição do nucleotídeo que formam os aminoácidos dos pontos de mutações. As flechas indicam o ponto de substituição dos aminoácidos na sequência traduzida, e o número em cima das mesmas são os códons das mutações. Isolado selvagem representa a linha superior da sequência e a inferior o isolado com mutação..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações sobre os isolados de <i>Alternaria alternata</i> utilizados neste trabalho: município de origem, código do isolado, número de isolados, hospedeiro e data da coleta dos isolados.	29
Tabela 2. Características dos fungicidas utilizados neste trabalho: ingrediente ativo, produto comercial, empresa fabricante e concentração do ingrediente ativo (i.a.) nos produtos comerciais.	31
Tabela 3. Informações dos isolados de <i>Alternaria alternata</i> utilizados para determinação da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE ₅₀) do crescimento micelial: município de coleta, código e número do isolado e data da coleta.	33
Tabela 4. Informações dos isolados de <i>Alternaria alternata</i> utilizados para resistência prática de boscalida e pidiflumetofem: município, código do isolado e data da coleta.	35
Tabela 5. Regiões de amplificação para identificação de pontos de mutações do complexo SDH com primers, sequências e condições do termociclador para amplificação.	37
Tabela 6. Valores da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE ₅₀) da germinação de conídios de <i>Alternaria alternata</i>	39
Tabela 7. Valores da concentração efetiva de boscalida, bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE ₅₀) do crescimento micelial de 37 isolados de <i>Alternaria alternata</i>	42
Tabela 8. Inibição do crescimento micelial (%) de 226 isolados de <i>Alternaria alternata</i> com os fungicidas boscalida, nas concentrações de 10 e 100 µg.ml ⁻¹ , bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem na concentração de 10 µg.ml ⁻¹ , em relação à testemunha.	46
Tabela 9. Severidade dos sintomas em folhas de tangerina 'Murcott' com e sem aplicação de fungicida, inoculadas com isolados de <i>Alternaria alternata</i>	53
Tabela 10. Isolados de <i>Alternaria alternata</i> com os valores da determinação da CE ₅₀ para os fungicidas boscalida, bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem, utilizados para identificação de pontos de mutação no complexo SDH pelas substituições de aminoácidos nas subunidades SDHB, SDHC e SDHD.	55

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira contribui para o desenvolvimento socioeconômico do País por meio das receitas geradas nas exportações e na comercialização no mercado nacional, como também pela geração de empregos diretos e indiretos (Lopes et al., 2011). O Brasil produz laranjas, tangerinas, limas e limões, sendo a laranja doce a principal cultura cítrica cultivada. No entanto, a produção de tangerinas tem se destacado, colocando o País como quarto maior produtor mundial (FAOSTAT, 2022). Os principais estados produtores de tangerina do Brasil são São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná (IBGE, 2020).

Dentre as variedades cultivadas de tangerinas no Estado de São Paulo, a 'Ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco) e o tangor 'Murcott' (*Citrus sinensis* L Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco) são as mais produzidas (Chiarini et al., 2017; IEA, 2022). Embora muito cultivadas, essas variedades são suscetíveis à mancha marrom de alternaria, causada pelo fungo necrotrófico *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. patótipo tangerina (Timmer et al., 1998).

A mancha marrom de alternaria é uma doença que afeta tecidos jovens de folhas, frutos e ramos. Nas folhas, os sintomas surgem como pequenas pontuações negras, que podem se expandir para grandes áreas necróticas, enquanto os frutos apresentam lesões marrons ou negras, de tamanho variado, podendo apresentar erupções (Timmer et al., 2003). Os sintomas nos frutos, principalmente naqueles destinados ao mercado *in natura*, causam danos qualitativos (Stuart et al., 2009). Os frutos são suscetíveis desde a queda das pétalas até atingirem cerca de cinco centímetros de diâmetro. Embora a literatura reporta que a suscetibilidade das folhas ocorrem do início de sua expansão até completa formação (Timmer et al., 2000; Bhatia et al., 2003), as folhas da variedade 'Murcott', são suscetíveis até atingirem cerca de três centímetros de comprimento. A mancha marrom de alternaria é de difícil controle, sendo recomendado o manejo integrado, com a combinação de práticas culturais e aplicações de fungicidas (Timmer et al., 2003; Stuart et al., 2009; Ferreira et al., 2016). O uso de fungicidas constitui a principal medida de controle da mancha marrom de alternaria. A frequência de aplicações de fungicidas é variável, podendo chegar até 15 por ano (Timmer et al., 2003). Dentre os fungicidas comerciais mais utilizados e eficientes estão os à base de cobre (de ação 'multissítio' e imóveis na planta), os inibidores da quinona externa (IQe) e os inibidores da desmetilação do carbono 14 (IDM), ambos de ação 'uni-sítio' e com

movibilidade na planta (Reis et al., 2007; Karaoglanidis et al., 2011; Vega & Dewdney, 2015). No entanto, a partir de 2008 no Estado da Flórida, nos Estados Unidos, foram identificados isolados de *A. alternata* patótipo tangerina resistentes aos fungicidas IQe. Desta forma, as opções de produtos para controle da doença diminuíram, dificultando o manejo da mancha marrom (Vega & Dewdney, 2014). Recentemente no Brasil, no ano de 2017, produtores de tangerina relataram a baixa eficiência de fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina, os dois pertencentes ao grupo IQe, para controle da mancha marrom de alternaria. A resistência a fungicidas do grupo IQe de isolados de *A. alternata* coletados em pomares de tangerina do Estado de São Paulo foi comprovada em 2021 (Chitolina et al., 2021). Parte desses isolados também apresentou redução de sensibilidade ao fungicida tebuconazol, do grupo IDM (Amin et al., 2021).

Mediante a comprovação de isolados de *A. alternata* resistentes a dois ingredientes ativos do grupo de fungicidas IQe, é necessário verificar a sensibilidade de *A. alternata* a outros grupos de fungicidas, como os ISDH. Embora no Brasil não haja registro de produtos comerciais ISDH para o manejo da mancha marrom de alternaria, estes são registrados para outras doenças da cultura de citros, como para controle da pinta preta em citros, causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (Agrofit, 2022). Entretanto, nos Estados Unidos existem produtos comerciais ISDH para controle da mancha marrom de alternaria em tangerina, porém sem relatos de resistência do patógeno (Vega & Dewdney, 2015).

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar a sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina aos fungicidas bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem, todos pertencentes ao grupo dos inibidores da succinato desidrogenase. Os objetivos específicos são:

- Determinar concentrações efetivas dos fungicidas bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibição de 50% (CE₅₀) da germinação dos conídios e crescimento micelial de *A. alternata* provenientes de uma coleção de isolados com fenótipos de sensibilidade e de resistência a azoxistrobina;
- Classificar fenotipicamente a sensibilidade ou resistência de isolados de *A. alternata* aos fungicidas bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem com base em concentrações discriminatórias;
- Verificar a presença de pontos de mutações nas subunidade SDHB, SDHC e SDHD do complexo enzimático SDH, em indivíduos de *A. alternata* resistentes;
- Avaliar, em ensaios *in vivo*, a sensibilidade de isolados de *A. alternata* aos fungicidas boscalida e pidiflumetofem.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção de tangerina

A produção mundial de tangerina e seus híbridos no ano de 2020 passou de 38 milhões de toneladas. Os principais países produtores da fruta foram: China, Espanha, Turquia e Brasil (FAOSTAT, 2022). Nesse mesmo ano, o Brasil produziu 1.026.638 toneladas da fruta, sendo a Região Sudeste a maior produtora do País, com destaque para os Estados de São Paulo e Minas Gerais (IBGE, 2022). No Brasil, a maior parte da produção é destinada ao mercado de frutos *in natura* (Azevedo et al., 2010).

Dentre as variedades cultivadas em São Paulo se destacam a tangerina 'Ponkan' e o híbrido tangor 'Murcott', correspondendo a 90% dos pés de tangerineiras e seus híbridos em produção (Fundecitrus, 2019; IEA, 2022). O tangor 'Murcott' é um híbrido de laranja doce com tangerina, com origem nos Estados Unidos e introduzido no Brasil em 1948 pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Esse híbrido foi bem aceito pelo consumidor e é muito consumido até os dias atuais. Além das características qualitativas dos frutos, esse híbrido apresenta resistência à leprose (*Citrus leprosis virus*) e à clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*) (Centro de Citricultura Sylvio Moreira, 2019; Veiga et al., 2019). A tangerina 'Ponkan' é mundialmente muito cultivada pela alta produtividade e por agradar o paladar do consumidor (Pio et al., 2006). Apesar da tangerina 'Ponkan' e do tangor 'Murcott' serem amplamente produzidos e apreciados pelos consumidores, essas variedades são suscetíveis à mancha marrom de alternaria (Pio et al., 2006; Azevedo et al., 2010).

Embora o Brasil tenha destaque na produção mundial de tangerinas, os dados da EMBRAPA (2019) e do IBGE (2022) demonstram decréscimo na área colhida da fruta no País, com redução de quase 6 mil hectares em 2020 em relação a 2005. Segundo Silva & Landau (2020), no ano de 2002, o Brasil atingiu a maior área plantada de tangerinas e seus híbridos, porém de 2003 a 2016 houve um decréscimo de, aproximadamente, 25% na área plantada. Esses declínios nas áreas colhida e plantada podem estar relacionados com o surgimento no País, em 2001, da mancha marrom de alternaria, uma importante doença da cultura de tangerina (Goes et al., 2001; Reis et al., 2007; Coulturato et al., 2009; Michelin et al., 2016).

3.2. Mancha marrom de alternaria

O agente causal da mancha marrom de alternaria é o fungo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., originalmente classificado como *Alternaria citri*, devido à similaridade morfológica de suas estruturas com as da espécie causadora da podridão negra dos citros. No entanto, após análises moleculares, o agente causal da mancha marrom de alternaria foi reclassificado como *A. alternata* patótipo tangerina (Stuart et al., 2009; Huang et al., 2015).

Existem sete patótipos conhecidos de *A. alternata*, dois deles que infectam citros: um causa doença em limão e outro, em tangerina (Li et al., 2021). O patótipo de *A. alternata* patogênico à tangerina, produz toxina seletiva de hospedeiro denominada ACT. Essa toxina é responsável pelos sintomas de manchas necróticas com ou sem halo clorótico nos órgãos afetados. A toxina ACT, além de tóxica para tangerina e seus híbridos, também o é para toranja e laranja doce, mas não causa toxidez a limão (Gai et al., 2019). O patótipo de *A. alternata* patogênico ao limão cravo produz a toxina ACR ou ACRL, que interfere na respiração celular, mau funcionamento da fosforilação oxidativa e extravasamento de eletrólitos nas células de hospedeiro suscetível (Yang; Lin; Chung, 2009). De acordo com Troncoso-Rojas e Tiznado-Hernández (2014), essas toxinas seletivas de hospedeiro inibem o mecanismo de defesa da planta, induzindo à suscetibilidade ao patógeno.

A mancha marrom de alternaria foi identificada pela primeira vez na Austrália no ano de 1903. Nos Estados Unidos, a doença foi encontrada inicialmente em 1974 infectando tangerinas 'Dancy' (Timmer et al., 1998). Em 1989, a mancha marrom de alternaria foi relatada em Israel (Solel, 1991). Nos anos seguintes, também localizada na África do Sul (Schutte et al., 1992), em Cuba (Isla, 1992), na Colômbia (Castrocaicedo et al., 1994); na Turquia (Canihos et al., 1997), na Espanha (Vicent et al., 2000), na Itália (Bella et al., 2001), na Argentina (Peres et al., 2003), no Peru (Marín et al., 2006) e na China (Wang et al., 2010). Atualmente, segundo Aiello et al. (2020), essa doença está disseminada em todos os países produtores de tangerina, causando perdas de produção e qualidade dos frutos (Timmer et al., 1998; Reis et al., 2007).

No Brasil, a mancha marrom de alternaria foi detectada pela primeira vez no Estado do Rio de Janeiro, em 2001, em pomares de tangerina 'Dancy' (Goes et al., 2001). Em São Paulo a doença foi constatada em 2003, nos pomares de tangor 'Murcott' (Reis et al., 2007; Souza et al., 2009). Grande parte das variedades de

tangerinas é suscetível a *A. alternata*, como as tangerinas ‘Dancy’, ‘Ponkan’ e o tanger ‘Murcott’; porém, existem algumas com resistência ao fitopatógeno em condições de campo, como as tangerinas ‘Satsuma’ e ‘Clementina’ (Reis et al., 2007).

3.2.1. Ciclo da mancha marrom de alternaria em tangerina

Alternaria alternata infecta as brotações de tangerineiras e seus híbridos (Huang et al., 2015; Wang et al., 2020). O ciclo da mancha marrom de alternaria (Figura 1) se inicia com a sobrevivência do patógeno em folhas, ramos e frutos mortos aderidos à planta ou depositados ao solo. A esporulação fúngica ocorre pelo desenvolvimento de conidióforos, que irão formar os conídios para posterior disseminação. A abundante formação de esporos acontecem nas lesões de tecido maduro ou morto, raramente ocorre esporulação em tecidos lesionados jovens (Timmer et al., 1998; Timmer et al., 2003; Stuart et al., 2009).

Os conídios são liberados por meio de chuva e vento ou mudanças bruscas de umidade relativa do ar, que contribuem para dispersão e deposição dos esporos no hospedeiro. Após a deposição, o conídio penetra o hospedeiro diretamente ou por aberturas naturais, como estômatos, com auxílio de apressório. Quando o patógeno penetra o hospedeiro, inicia a produção de toxina seletiva ACT, seguida de colonização e reprodução (Rotem, 1994; Timmer et al., 2003; Reis et al., 2006; Troncoso-Rojas & Tiznado-Hernández, 2014). Períodos com molhamento foliar de 8 a 12 horas e temperaturas entre 20 a 28 °C favorecem a infecção do patógeno no hospedeiro (Timmer et al., 2003; Stuart et al., 2009).

Os primeiros sintomas foliares, que ocorrem entre 24 e 36 horas após a infecção, são pequenas manchas escuras de coloração marrom ou preta, envoltas ou não por halo clorótico, que podem se estender por toda a área foliar (Azevedo et al., 2010). O tamanho das lesões varia conforme a distribuição da toxina ACT no tecido vegetal, no qual a área lesionada nem sempre está relacionada com a colonização do patógeno, mas sim com a presença da toxina (Timmer et al., 2000; Kohmoto et al., 1993; Stuart et al., 2009). Nos ramos, os sintomas são semelhantes aos das folhas (Santos Filho et al., 2009). Os sintomas em frutos maduros apresentam lesões de diversos tamanhos, como também podem apresentar erupções corticosas (Timmer et al., 2003; Santos Filho et al., 2009; Ferreira et al., 2016). Em casos de alta severidade a planta pode apresentar desfolha, ramos secos

e queda precoce de frutos (Timmer et al., 2003; Santos Filho et al., 2009; Huang et al., 2015; Wang et al., 2020).

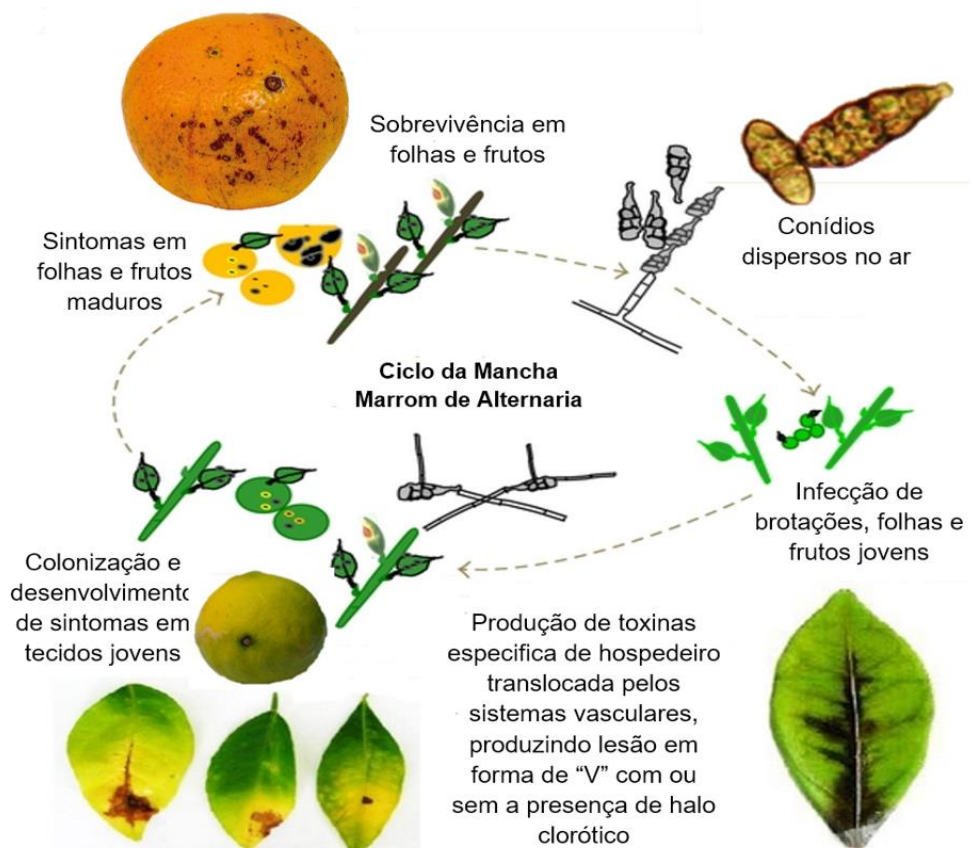


Figura 1. Ciclo da mancha marrom de alternaria. O fitopatógeno sobrevive em folhas ou frutos aderidos à planta ou caídos ao solo, produz conídios, que são dispersos pelo vento ou chuva e entram em contato com tecido suscetível do hospedeiro, produz toxina específica ao hospedeiro que é translocada via sistema vascular, dando origem às lesões. Adaptado de Chung (2012).

3.3. Controle da mancha marrom de alternaria

A mancha marrom de alternaria é de difícil controle em razão da infecção ocorrer, principalmente, em brotações, as quais não são formadas de modo uniforme na planta. A produção assíncrona de brotos, dificulta o manejo do patógeno com aplicação única de fungicidas (Timmer et al., 2000; Ferreira et al., 2016). Assim, são necessárias combinações de práticas culturais, controle químico e genético para seu eficiente manejo. Os tratamentos culturais que contribuem para o controle da doença são: plantio com espaçamento adequado entre plantas, realização de podas de limpeza, eliminação de restos culturais, uso de irrigação localizada e adubação nitrogenada equilibrada (Swart et al., 1998; Vega e Dewdney, 2014; Ferreira et al., 2016).

O emprego do controle genético é um método eficaz e de baixo custo, mas são poucas as variedades disponíveis no mercado resistentes à mancha marrom de alternaria. As tangerinas 'Clementina', 'Satsuma', 'Fremont' e 'Thomas', apresentam alto grau de resistência em condições de campo (Azevedo et al., 2010; Michielin et al., 2016; Porcino et al., 2017), mas essas variedades têm pouca expressão comercial no Brasil (Porcino et al., 2017; CEAGESP, 2022). Além dessas variedades, o Centro de Citricultura Sylvio Moreira, do IAC, lançou no ano de 2018 a cultivar IAC 2019 Maria, resultante do cruzamento entre tangor 'Murcott' e a laranja Pêra IAC, resistente à mancha marrom de alternaria. O híbrido IAC 2019 Maria ainda não é amplamente utilizado, devido à recente introdução no mercado, porém a cultivar é promissora como ferramenta para manejo, não apenas da mancha marrom de alternaria, como também da clorose variegada e da leprose dos citros (Centro de Citricultura Sylvio Moreira, 2019; Veiga et al., 2019).

Embora a utilização de manejos culturais e genético auxiliarem na redução da severidade da doença, a aplicação de fungicidas é fundamental para garantir frutos de alta qualidade exigidos para o mercado de frutas *in natura* (Timmer et al., 2003; Vegan & Dewdney, 2014). Recomenda-se o tratamento químico no início das brotações e na fase reprodutiva, tanto no florescimento quanto na frutificação (Ferreira et al., 2016). Assim, para o eficiente controle da doença nos pomares, e dependendo das condições climáticas, são necessárias diversas aplicações de fungicidas, sendo aqueles à base de cobre os mais utilizados (Timmer et al., 2003).

No Brasil, os fungicidas registrados para manejo da mancha marrom de alternaria em tangerina incluem apenas cinco ingredientes ativos: óxido cuproso, sulfato de cobre e azoxistrobina ou trifloxistrobina (IQe) formulados em mistura com tebuconazol (IDM) (Agrofit, 2022). Os fungicidas cúpricos, multissítios, embora de baixo custo e com menor toxidez para o ambiente e para o homem, podem causar fitotoxidez à planta quando aplicados repetidas vezes e em altas concentrações, além de serem facilmente lavados da superfície vegetal devido à adesão superficial do produto na planta (Coultrato et al., 2009; Ferreira et al., 2016). Azoxistrobina e trifloxistrobina são os fungicidas mais utilizados para controle de *A. alternata* em tangerina e seus híbridos. No entanto, o uso contínuo de fungicidas do grupo IQe pode levar à seleção de isolados resistentes, em função do seu modo de ação (Ma et al., 2003; Karaoglanidis et al., 2011; Chitolina et al., 2021). Por essa razão, esses fungicidas são formulados em mistura com tebuconazol, fungicida sítio-específico e

sistêmico, que atua como inibidor da desmetilação do carbono 14 (IDM). Para reduzir as chances de seleção de isolados resistentes aos fungicidas sítio-específico, recomenda-se também a alternância de produtos com ingredientes ativos (i. a.) diferentes por meio da rotação de fungicidas de ação multissítio (Timmer et al., 2003; Ferreira et al., 2016), além de utilizar o mesmo i. a. até duas vezes por safra (Santos Filho et al., 2009).

Embora essas estratégias sejam empregadas no manejo da mancha marrom de alternaria em tangerinas, verificou-se baixa eficiência no controle da doença com o uso de fungicidas do grupo IQe no Estado de São Paulo, em 2021, diferentemente do que ocorria em anos anteriores. A comprovação de isolados resistentes de *A. alternata* a fungicidas do grupo IQe dificultou seu manejo pelos produtores, que dispõem de reduzido número de ingredientes ativos eficientes (Agrofit, 2022; Chitolina et al., 2021).

Nos Estados Unidos, em 2011, após a ocorrência de isolados de *A. alternata* resistentes aos IQe, foi disponibilizado o uso do fungicida boscalida, pertencente ao grupo dos inibidores da succinato desidrogenase (ISDH) para substituir o uso de azoxistrobina (Vega & Dewdney, 2015).

3.4. Fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (ISDH)

Os fungicidas pertencentes ao grupo ISDH atuam no complexo mitocondrial II, mais especificamente na enzima succinato desidrogenase (SDH). Esses fungicidas bloqueiam o transporte de elétrons da succinato para ubiquinona, além de impedirem a conversão de succinato a fumarato. Assim, os fungicidas ISDH interferem em dois processos importantes: o transporte de elétrons mitocondrial e no ciclo de Krebs (Avenot & Michailides, 2010; Stammler et al., 2015; Klappach & Stammler, 2019). A enzima SDH é composta por quatro subunidades: SDHA, SDHB, SDHC e SDHD, A é uma flavoproteína, que catalisa a oxidação de succinato a fumarato. A SDHB, proteína composta de três aglomerados de ferro-enxofre, que conectam a SDHA com a ubiquinona, além da proteína SDHB ser responsável pelo transporte de elétrons da succinato para ubiquinona; as subunidades SDHC e SDHD são proteínas ancoras na membrana hidrofóbica, no qual ambas proteínas têm um sítio de ligação na ubiquinona (Ackrell, 2000; Sun et al., 2005; Avenot & Michailides, 2010).

O grupo de fungicidas ISDH, antes do surgimento do Comitê de Ação de Resistência a Fungicidas (FRAC), eram denominados como carboxamidas. Após a fundação do FRAC, e a separação de fungicidas por grupo em relação ao seu modo de ação, os grupos de fungicidas passaram a ser nomeados em referência ao seu sítio alvo. Assim, as carboxamidas passaram a denominação de fungicidas ISDH (Stammler et al., 2015).

Os fungicidas ISDH foram lançados no mercado no final da década de 60, com os primeiros i. a. carboxina e oxicarboxina, seguido de diversos outros fungicidas. Até a década de 90, os fungicidas ISDH forneciam reduzido espectro de ação, atuavam basicamente sobre basidiomicetos. Em 2003, após alterações estruturais moleculares de i.a., foi lançado no mercado o fungicida boscalida com amplo espectro de ação sobre os fungos fitopatogênicos, passando a atuar sobre basidiomicetos e ascomicetos, além de aumentar a eficiência do fungicida. Assim, os fungicidas ISDH passaram a ter maior importância no mercado de produtos de proteção de plantas (Avenot & Michailides, 2010; Stammler et al., 2015; Lucas et al., 2015; Klappach & Stammler, 2019).

A partir de boscalida, foram disponibilizados no mercado diferentes i. a., como os fungicidas bixafem, fluopyram, fluxapiraxade, sendo estes conhecidos como fungicidas de segunda geração (Sierotzki & Scalliet, 2013; Stammler et al., 2015; Amaro et al., 2019). Em 2015, foi lançado pidiflumetofem, este fungicida pertence a um novo grupo químico dos ISDH, que controla amplo espectro de patógenos, além de fornecer controle prolongado sobre a doença e não fornecer resistência cruzada com os principais i. a. Os últimos fungicidas ISDH lançados foram isoflucipram, no ano de 2019, e inpirfluxam lançado em 2020. Pidiflumetofem, isoflucipram e inpirfluxam são considerados uma nova geração de fungicidas pertencentes ao grupo ISDH (Jeanmart et al., 2021; Maienfisch & Mangelinckx, 2021). Atualmente existem 24 ingredientes ativos disponíveis no mercado, distribuídos em 12 grupos químicos (FRAC, 2021).

Embora os novos fungicidas ISDH sejam eficientes para o manejo de diversas doenças, sua utilização excessiva, sem a rotação de princípios ativos, tem favorecido o desenvolvimento de resistência ou diminuição da sensibilidade em diferentes fitopatógenos (Avenot & Michailides, 2010). Atualmente, existem diversos patógenos resistentes aos fungicidas ISDH, incluindo isolados de *A. alternata* na

cultura do pistache (Avenot & Michailides, 2007), batata (Ladschoot et al., 2017) e pêsego (Yang et al., 2015).

3.4.1. Resistência de fitopatógenos a fungicidas ISDH

A resistência a fungicidas pode ser definida como uma diminuição parcial ou total da sensibilidade de um microrganismo a uma determinada molécula ou produto antifúngico. Essa característica é hereditária e estável (Ghini & Kimati, 2000; Brent & Hollomon, 2007). A seleção de isolados patogênicos resistentes a fungicidas é favorecida pelo uso contínuo de produtos com mesmo i. a. de ação específica. A resistência a fungicidas pode ocorrer por meio de pontos de mutações ou por outros mecanismos, como superexpressão gênica ou bomba de efluxo (Ma & Michailides, 2005; Lucas et al., 2015).

Os fungicidas ISDH são classificados, segundo o FRAC (2022), como de médio a alto potencial para fungos fitopatogênicos desenvolverem resistência, devido ao seu modo de ação específico. As moléculas carboxina, flutalanil e boscalida, perderam a eficiência no controle de doenças logo após seu lançamento no mercado (Hu et al., 2016). Os primeiros relatos de resistência de fungos fitopatogênicos a fungicidas ISDH ocorreram na década de 1970 para *Ustilago maydis* e *Aspergillus nidulans*. Posteriormente a resistência foi relatada em *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Corynespora cassiicola* e *Podosphaera xanthi* (Veloukas et al., 2013; Sierotzki & Scalliet, 2013; Yang et al., 2015).

A resistência aos fungicidas ISDH ocorre por mutações na enzima SDH. Já foram identificadas mais de 27 mutações distribuídas nas subunidades B, C ou D pela substituição de aminoácidos, para diferentes fitopatógenos (Avenot et al., 2009; Sierotzki & Scalliet, 2013). Os diferentes pontos de mutações conferem variações nos níveis de sensibilidade e essa variação também está relacionada com o i.a. (Avenot et al., 2014; Klappach & Stammler, 2019). Ademais, a resistência cruzada de fungicidas ISDH depende do ponto de mutação, do i.a., como também da espécie fúngica (Sierotzki & Scalliet, 2013).

As variações de sensibilidade ou resistência e os pontos de mutações puderam ser verificados em *A. alternata* patótipo pêsego no trabalho de (Yang et al., 2015). Os autores observaram que as substituições de histidina (H) por tirosina (Y) ou arginina (R) na posição 277 (H277Y/R) na subunidade SDHB, e a mutação H134R na subunidade SDHC, conferem alta resistência aos fungicidas boscalida e

penthiopirade. Já para fluxapiraxade os genótipos são de redução de sensibilidade ou resistência para os isolados com mutações H277Y/R, e resistência para os isolados com mutação H134R. Para o fungicida fluopiram, as mutações H277Y/R concederam genótipos sensibilidade ou redução da sensibilidade, a mutação H134R forneceu redução da sensibilidade ou resistência. Já a substituição de histidina (H) por leucina (L) no códon 277 (H277L) conferiu genótipo de resistência para os fungicidas boscalida, penthiopirade, fluxapiraxade e fluopiram. Esses resultados mostram que há variações na sensibilidade, resistência ou resistência cruzada depende do ponto de mutação e do i.a. analisado (Sierotzki & Scalliet, 2013; Yang et al., 2015).

Além dos pontos de mutações na subunidade SDHB H277R/Y/L, também foram identificadas para *A. alternata* em pistache substituições de prolina (P) por alanina (A), arginina (R), isoleucina (I), fenilalanina (F) e aspartato (D) na posição 230 (P230A/R/I/F/D), substituição de aminoácido asparagina (N) no códon 235 por aspartato (D), treonina (T), glutamato (E) e glicina (G) (N235D/T/E/G). Na subunidade SDHC, além da mutação H134R, também foi identificada a substituição de serina (S) por arginina (R) na posição 135 (S135R). Já na subunidade SDHD foram identificadas as mutações D123E e H133P. Todos esses pontos de mutações descritos conferem genótipo de resistência a boscalida para *A. alternata* em pistache (Avenot et al., 2014; Avenot et al., 2019).

Para *A. alternata* patótipo tangerina não há registro de isolados resistentes aos fungicidas ISDH. Ainda assim, Vega e Dewdney (2014) sugerem a rotação de produtos com diferentes modos de ação, como também evitar o uso seguido de produtos do grupo IQe e ISDH, para que não ocorra a múltipla resistência, a fim de garantir a eficiência do fungicida por mais tempo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolados de *Alternaria alternata*

Os isolados de *A. alternata* utilizados neste trabalho foram coletados em diferentes municípios do Estado de São Paulo, nos anos de 2003, 2004, 2017, 2018 e 2021 (Tabela 1). Os isolados de 2003 e 2004 foram coletados logo após a identificação da mancha marrom de alternaria nos pomares de tangerina do Estado de São Paulo e classificados como linha de base (baseline) para avaliação da sensibilidade a fungicidas do grupo dos inibidores da succinato desidrogenase (ISDH). Já os isolados de 2017, 2018 e 2021 foram coletados após relatos de falhas no controle da doença, mesmo após aplicações de fungicidas inibidores da quinona externa (IQe) formulados em mistura com fungicidas inibidores da desmetilação do Carbono 14 (IDM).

Tabela 1. Informações sobre os isolados de *Alternaria alternata* utilizados neste trabalho: município de origem, código do isolado, número de isolados, hospedeiro e data da coleta dos isolados.

Município	Código	Número de isolados	Hospedeiro	Data de coleta (mês/ano)
Casa Branca	LRS 15/03	1	'Murcott'	02/03
Botucatu	LRS 21/03	1	'Murcott'	02/03
Capão Bonito	LRS 35/03 e 41/03	2	'Nova'	05/03
Aguai	LRS 32/04	1	'Ponkan'	04/04
Porto Feliz	LRS 01/17 a 09/17	9	'Murcott'	01/17
São Pedro do Turvo	LRS 21/17 a 25/17	5	'Murcott'	04/17
São Pedro do Turvo	LRS 27/17 a 30/17	4	'Murcott'	04/17
Ubirajara	LRS 31/17 a 40/17	10	'Murcott'	04/17
Bariri	BA 1/18 a 15/18	15	'Ponkan'	04/18
Bariri	BA 17/18 a 29/18	13	'Ponkan'	04/18
Buri	BU 1/18 e 2/18	2	'Ponkan'	04/18
Conchal	CH 1/18 a 26/18	26	'Ponkan'	04/18
Conchal	CH 28/21 a 40/21	13	'Murcott'	01/21
Paranapanema	LRS 5/18 e 6/18	2	'Ponkan'	04/18
Paranapanema	LRS 8/18 a 12/18	5	'Ponkan'	04/18
Paranapanema	PP 1/21 a 25/21	25	'Murcott'	01/21
Pratânia	PR 1/18 a 10/18	10	'Ponkan'	04/18
Pratânia	PR 11/21 e 12/21	2	'Ponkan'	01/21
Pratânia	PR 14/21 a 19/21	6	'Ponkan'	01/21
Pratânia	PR 21/21 a 31/21	11	'Ponkan'	01/21

Tabela 1. Continuação.

Município	Código	Número de isolados	Hospedeiro	Data de coleta (mês/ano)
Pratânia	PR 33/21 a 36/21	4	'Ponkan'	01/21
Pratânia	PR 38/21 a 44/21	7	'Ponkan'	01/21
Socorro	SC 1/18 a 8/18	8	'Murcott'	04/18
Socorro	SC 10/18 a 30/18	21	'Murcott'	04/18
Socorro	SC 31/21 a 54/21	24	'Ponkan'	01/21

Os isolados dos anos de 2003, 2004 e 2017 foram cedidos pelo Dr. E. Feichtenberger, do Instituto Biológico de São Paulo, e permanecem armazenados na micoteca 'Dra. Victoria Rossetti', na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba. Os isolados de 2018 foram coletados pelo Me. G. M. Chitolina (ESALQ – USP) e pelo Dr. G. J. Silva Jr (Fundecitrus) e permanecem armazenados no Laboratório de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo (ESALQ – USP). Os isolados de 2021 foram provenientes de frutos coletados pelo Dr. G. J. Silva Jr, e estão armazenados no Laboratório de Fitopatologia da ESALQ – USP.

Todos os isolados foram obtidos por isolamento indireto, após desinfestação superficial da casca dos frutos cítricos, e cultivados em meio de cultura V8 (100 ml de suco V8, 900 ml de água destilada, 20 g de ágar e 10 g de carbonato de cálcio), conforme descrito em Chitolina et al. (2021). Culturas monospóricas de cada um desses isolados foram obtidas como se segue: placas de Petri com meio de cultura V8 contendo discos de micélio de *Alternaria alternata* de 0,5 cm de diâmetro foram incubadas em câmara de crescimento a 20 °C, com fotoperíodo de 12 h, em luz próxima ao ultravioleta (NUV) por sete dias. Após o período de incubação, 5 ml de água destilada estéril foram depositados sobre a placa e os esporos foram suspensos com auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão de conídios foi transferida para um Becker, após filtragem em gaze e ajustada para a concentração de 10^3 conídios.ml⁻¹ com auxílio de câmara de Neubauer. Depositou-se três alíquotas de 30 µl de cada suspensão de conídios próximo ao bordo de uma placa de Petri com meio ágar-água (AA), com distância de 1,5 cm entre elas. As placas foram inclinadas em ângulo de, aproximadamente, 60° para deflúvio da suspensão sobre o meio de cultura, de um bordo para outro. Após o deflúvio, as placas retornaram à posição horizontal e foram incubadas em câmara B.O.D. a 27 °C, na ausência de luz por 4 horas. Com auxílio de microscópio ótico Axio Lab.A1 (Carl

Zeiss), identificou-se um conídio de *A. alternata* germinado e isolado dos demais em cada uma das placas. Esses conídios foram repicados para placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), as quais foram armazenadas por quatro dias na temperatura de 27 °C, na ausência de luz. Após o crescimento das culturas monospóricas, estas foram preservadas em papel filtro e armazenadas a -20 °C (Gonçalves et al., 2016).

4.2. Fungicidas

Os ingredientes ativos dos fungicidas utilizados nos experimentos foram bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem (Tabela 2) todos pertencentes ao grupo ISDH. O fungicida boscalida foi lançado pela empresa BASF no ano 2003. Em 2010 a BAYER lançou bixafem; em 2012 a BASF lançou fluxapiroxade e em 2015 a Syngenta lançou pidiflumetofem, sendo este um dos fungicidas mais recentes do grupo ISDH (Stammler et al., 2015; Amaro et al., 2019; Jeanmart et al., 2021).

As diluições seriadas para os fungicidas boscalida e pidiflumetofem foram em água destilada estéril a fim de se obter as soluções estoques de 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ingrediente ativo. Para os fungicidas fluxapiroxade e bixafem as diluições foram em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter as soluções estoques de 1; 10; 100; 1000; 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tabela 2. Características dos fungicidas utilizados neste trabalho: ingrediente ativo, produto comercial, empresa fabricante e concentração do ingrediente ativo (i.a.) nos produtos comerciais.

Ingrediente ativo (i.a.)	Produto Comercial	Empresa	Concentração do i.a.
Bixafem	Produto técnico	Sigma	100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
Boscalida	Cantus®	Basf	500 $\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$
Fluxapiroxade	Produto técnico	Sigma	100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
Pidiflumetofem	Produto técnico	Syngenta	183,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

As concentrações finais para determinação da concentração efetiva dos fungicidas ISDH para inibir 50% (CE_{50}) da germinação de conídios e do crescimento micelial de *A. alternata* usadas para bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem foram 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Para boscalida a concentração final foi de 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.3. Determinação da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxapirroxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE₅₀) da germinação de conídios e crescimento micelial de *Alternaria alternata*

4.3.1. Germinação de conídios de *Alternaria alternata*

A determinação da CE₅₀ do fungicida boscalida foi realizada para dez isolados, sendo quatro de 2003, um de 2004 e cinco isolados de 2017. No entanto, para os fungicidas bixafem, fluxapirroxade e pidiflumetofem foram utilizados cinco isolados (quatro de 2003 e um de 2004). A determinação da CE₅₀ foi baseada na metodologia de Vega & Dewdney (2015).

Soluções estoques foram adicionadas em meio AA (1,5%) para alcançar as concentrações finais desejadas, descritas no item 4.2. Conídios foram obtidos de colônias com sete dias de idade, cultivadas em meio V8, e a suspensão foi ajustada para a concentração de 2×10^4 conídios.ml⁻¹, com auxílio da câmara de Neubauer. Depositou-se três alíquotas de 30 µl de cada suspensão de conídios sobre placas de Petri contendo meio AA com adição ou não de fungicida. Foram utilizadas três placas de Petri para cada concentração de fungicida por isolado. As placas foram incubadas a 27 °C na ausência de luz por 12 h. Passado o período de incubação, a germinação dos conídios foi paralisada pela adição de uma alíquota de 50 µl de lactoglicerol sobre cada local de deposição dos conídios.

Em cada placa foram avaliados 100 conídios de forma aleatória. Considerou-se germinado o conídio que apresentava tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento do mesmo ou pela presença de mais de um tubo germinativo por conídio de tamanho igual ou maior que o mesmo. A determinação da CE₅₀ foi verificada por meio de regressão linear entre os valores da porcentagem de inibição (calculada em relação ao tratamento controle; concentração 0 µg.ml⁻¹) e as concentrações dos fungicidas correspondentes transformadas em log₁₀. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições e o experimento foi conduzido duas vezes.

4.3.2 Crescimento do tubo germinativo de *Alternaria alternata*

O tamanho do tubo germinativo dos conídios foi medido em dois isolados de *A. alternata*, LRS 15/03 e LRS 41/03. A medição foi realizada para todas as concentrações de i.a. utilizados na determinação da CE₅₀ de bixafem, boscalida, fluxapirroxade e pidiflumetofem. Para isso, foram selecionados 30 conídios

aleatoriamente, por concentração de i.a.. O tubo germinativo foi medido com auxílio do microscópio ótico Axio Lab (Carl Zeiss) com programa de imagem Zen Blue. Quando o conídio apresentava mais de um tubo germinativo, todos eram medidos e o valor final correspondeu à média por conídio. O tamanho relativo do tubo germinativo foi calculado pela divisão entre a média dos valores obtidos em cada concentração de fungicida e a média dos valores obtidos no tratamento controle, sem fungicida.

4.3.3. Crescimento micelial de *Alternaria alternata*

A determinação da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxapiraxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE₅₀) do crescimento micelial foi realizada para trinta e sete isolados de *A. alternata* coletados em 2003, 2004, 2017, 2018 e 2021 (Tabela 3).

Tabela 3. Informações dos isolados de *Alternaria alternata* utilizados para determinação da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxapiraxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE₅₀) do crescimento micelial: município de coleta, código e número do isolado e data da coleta.

Município	Código	Número de isolados	Data de coleta (mês/ano)
Casa Branca	LRS 15/03	1	02/03
Botucatu	LRS 21/03	1	02/03
Capão Bonito	LRS 35/03 e 41/03	2	05/03
Aguai	LRS 32/04	1	04/04
Porto Feliz	LRS 01/17, 02/17, 06/17 e 07/17	4	01/17
São Pedro do Turvo	LRS 21/17, 22/17, 25/17 e 30/17	4	04/17
Ubirajara	LRS 31/17 e 35/17	2	04/17
Bariri	BA 7/18 e 20/18	2	04/18
Buri	BU 1/18	1	04/18
Conchal	CH 03/18, 04/18 e 12/18	3	04/18
Conchal	CH 28/21 e CH29/21	2	01/21
Paranapanema	LRS 11/18	1	04/18
Paranapanema	PP 1/21 a 3/21	3	01/21
Pratânia	PR 5/18	1	04/18
Pratânia	PR 29/21	1	01/21
Pratânia	PR 42/21 a 44/21	3	01/21
Socorro	SC 7/18 e 14/18	2	04/18
Socorro	SC 31/21 a 33/21	3	01/21

Os fungicidas foram acrescidos em meio BDA para se obter as concentrações desejadas, conforme descrito no item 4.2. Então, discos de micélio (0,5 cm de

diâmetro) foram retirados da borda de colônias com sete dias de crescimento, cultivadas em meio BDA, e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA acrescido ou não de fungicida. As placas foram incubadas a 27 °C, na ausência de luz por sete dias. A metodologia foi baseada no trabalho de Vega & Dewdney (2015).

O tamanho das colônias foi medido nos dois sentidos perpendiculares da placa. Assim, foi calculado o diâmetro médio da colônia descontando o tamanho do disco micelial. A CE_{50} foi determinada por meio de regressão linear entre as porcentagens de inibição do crescimento micelial e as concentrações dos fungicidas correspondentes, transformadas em \log^{10} . Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições e o experimento foi conduzido duas vezes.

4.4. Concentrações discriminatórias de bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibir o crescimento micelial de *Alternaria alternata*

As concentrações discriminatórias utilizadas foram determinadas após os resultados da determinação da CE_{50} do crescimento micelial dos isolados de *A. alternata* e com base no trabalho preliminar de Avenot & Michailides (2010). O experimento foi conduzido com 226 isolados (Tabela 1) para os quatro fungicidas ISDH. As concentrações de i.a. utilizadas foram de 10 e 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para boscalida e de 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem.

A condução e a avaliação do ensaio foi realizada de forma similar ao ensaio da determinação da CE_{50} de crescimento micelial (item 4.3.3). A porcentagem de inibição foi calculada pela divisão entre o diâmetro médio da colônia em meio com fungicida pelo diâmetro médio da colônia do tratamento controle (concentração 0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Realizou-se três repetições por isolado para cada fungicida testado. O experimento foi realizado duas vezes. As concentrações de fungicida descritas acima foram utilizadas para verificar o fenótipo de sensibilidade ou resistência dos isolados. Considerou-se isolados sensíveis aqueles com porcentagens de crescimento micelial < 50% e resistentes os isolados com crescimento micelial \geq 50% (Russell, 2002).

4.5. Avaliação *in vivo* de sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* com os fungicidas boscalida e pidiflumetofem

Os isolados utilizados nos ensaios de verificação de sensibilidade *in vivo* foram escolhidos com base nos valores da CE₅₀ do fungicida boscalida para o crescimento micelial. Foram selecionados sete isolados (Tabela 4), com um isolado coletado nos anos de 2003, 2004, 2017, 2018 e três, em 2021.

Tabela 4. Informações dos isolados de *Alternaria alternata* utilizados para resistência prática de boscalida e pidiflumetofem: município, código do isolado e data da coleta.

Município	Código	Data de coleta (mês/ano)
Capão Bonito	LRS 41/03	05/03
Aguai	LRS 32/04	04/04
São Pedro do Turvo	LRS 21/17	04/17
Bariri	BA 7/18	04/18
Conchal	CH 29/21	01/21
Pratânia	PR 29/21	01/21
Socorro	SC 33/21	01/21

Como os fungicidas ISDH não estão registrados para a mancha marrom de alternaria em tangerina, o cálculo da concentração de ingrediente ativo a ser utilizado, correspondeu a 10 e/ou 20 vezes o valor mais alto obtido na determinação da CE₅₀ de cada fungicida testado, boscalida e pidiflumetofem. As concentrações de ingrediente ativo para boscalida foram de 75 e 150 µg.ml⁻¹ e para pidiflumetofem de 25 µg.ml⁻¹. Realizou-se o ensaio *in vivo* com folhas destacadas, com metodologia baseada em Chitolina (2019). Os fungicidas bixafem e fluxaproxade não foram utilizados para o ensaio *in vivo* por serem insolúveis em água, e se diluídos em DMSO, não representaria o uso prático desses fungicidas. Ademais, bixafem e fluxaproxade são formulados comercialmente em mistura com outros fungicidas, dificultando a análise.

Folhas jovens de tangerina 'Murcott', de tamanho de 3 a 3,5 cm de comprimento, cultivadas em casa de vegetação, foram coletadas, lavadas em água corrente, seguida de imersão em álcool 70% por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 60 segundos. Após a desinfestação superficial, as folhas foram enxaguadas em água destilada estéril e colocadas para secar sobre

papel filtro em fluxo laminar por, aproximadamente, 40 minutos. Após secas, pulverizou-se a face abaxial das folhas com fungicida ou água destilada estéril até ponto de escorrimento. As folhas retornaram ao fluxo laminar para secagem por 3 h e 30 minutos, ou até estarem completamente secas.

A inoculação das folhas foi realizada na face abaxial com suspensão de conídios na concentração de 10^5 conídios.ml⁻¹ para os isolados BA 7/18 e PR29/21, e 10^4 conídios.ml⁻¹ para os demais isolados ou com água destilada estéril, sendo este o controle negativo. A diferença de concentração na suspensão de conídios está relacionada à agressividade do patógeno. Isolados menos agressivos foram inoculados em maior concentração e isolados mais agressivos foram inoculados em menor concentração.

Duas lâminas de vidro para microscopia foram depositadas em caixa tipo Gerbox contendo no fundo papel filtro e algodão umedecido. As folhas inoculadas e as folhas do tratamento testemunha foram depositados sobre as lâminas com a face abaxial voltada para cima. Após vedadas, as caixas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. A incidência da doença foi avaliada 72 h após a inoculação. A porcentagem da severidade da doença foi quantificada por meio do programa Quant (Vale et al., 2001). O experimento foi composto de 4 tratamentos, folhas pulverizadas com água ou fungicida, com e sem inoculação, com 5 folhas por tratamento, sendo elas as repetições. Na análise estatística foram utilizados os testes Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade das variâncias e de Tukey para verificar a significância entre tratamentos, ambos testes realizados pelo programa estatístico Statistica 10.0.

4.6. Extração de DNA de isolados de *Alternaria alternata*, reações de polimerase em cadeia (PCR) e sequenciamento das subunidades SDH

Extrações de DNA foram realizadas para os sete isolados de *A. alternata* utilizados no ensaio *in vivo*. Micélio de colônias, com sete dias de idade, cultivadas em meio BDA foram macerados com areia de aquário estéril para extração de DNA. Seguiu-se protocolo para culturas de leveduras (*Yeast Cultures*) modificado do kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega). As extrações de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop[™] 1000 (Thermo Fisher Scientific[™]).

As regiões genômicas amplificadas para caracterização molecular do complexo SDH foram as subunidades: proteína ferro-enxofre (*SdhB*), proteína CybL (*SdhC*) e proteína CybS (*SdhD*) (Tabela 5).

Reações de polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em volume total de 25 µl, contendo 12,5 µl GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega), 1 µl de cada primer, 8,5 µl de Nuclease Free Water, 2 µl de DNA ou Nuclease Free Water (controle negativo). As condições de amplificação para os genes pertencentes ao complexo SDH estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Regiões de amplificação para identificação e pontos de mutações do complexo SDH com primers, sequências e condições do termociclador para amplificação.

Primer	Sequência (5' – 3')	Gene	Condições Termociclador
^a Primer set 4	CGACGGACTCTACGAATGC	<i>SdhB</i>	^a 95 °C – 5 min 40 ciclos: 94 °C – 40 s 51 °C – 50 s 72 °C – 1 min
^a Primer set 4	GCATGTCCTTGAGCAGTTGAG		
^b SDHC-F4 ^b SDHC-R4	CCA GCG GAG GTA TGT CAT AAT AG TCC ATC CAG TGC GGA TAA CC	<i>SdhC</i>	72 °C – 10 min
^a SdhD - SeqS1	CATCCAAGTCGTTCCGATATT	<i>SdhD</i>	
^a SdhD - SeqR1	CGTTAGCCACGGTAACCACT		

^aAvenot et al., 2019.

^bVega e Dewdney, 2015.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% acrescido de SYBR[®] Safe DNA Gel Stain em tampão de carregamento 0,5x Tris-borato-EDTA (TBE). Realizou-se a purificação com kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Os produtos da PCR purificados foram enviados para sequenciamento. O produto da PCR foi sequenciado em ambas as direções e as sequências consenso foram obtidas utilizando o software Sequencher v.5.4.1 (Gene Codes Corporation, 2016). As sequências dos fragmentos de DNA amplificados foram comparados com as sequências de *A. alternata* disponíveis no GenBank e analisadas pelo programa BioEdit versão 7.2.5.

Os isolados selvagens (*wild-type*) utilizados como controle para identificação de pontos de mutação no complexo SDH foram G23-R2-L1-1S, AR-SBL-4S e G14-

7-2S para as subunidades SDHB, SDHC e SDHD, respectivamente (Vega & Dewdney, 2015).

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxaproxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE₅₀) da germinação de conídios de *Alternaria alternata*

Os valores da CE₅₀ estimados para a germinação de conídios de *A. alternata* foram superiores aos da maior concentração testada (100 µg.ml⁻¹ para boscalida e 10 µg.ml⁻¹ para bixafem, fluxaproxade e pidiflumetofem), inclusive para os isolados classificados como baseline, conforme Tabela 6. Houve altas taxas de germinação de conídios, mesmo nas concentrações mais altas de i. a., (Figura 2). Com base nos valores de CE₅₀ os isolados seriam classificados fenotipicamente como resistentes, pois não houve inibição da germinação com uso dos fungicidas do grupo ISDH.

Tabela 6. Valores da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxaproxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE₅₀) da germinação de conídios de *Alternaria alternata*.

Isolado	Boscalida	Bixafem	Fluxaproxade	Pidiflumetofem
	CE ₅₀ (µg.ml ⁻¹)			
LRS 15/03	>100	>10	>10	>10
LRS 21/03	>100	>10	>10	>10
LRS 35/03	>100	>10	>10	>10
LRS 41/03	>100	>10	>10	>10
LRS 32/04	>100	>10	>10	>10
LRS 01/17	>100	- ^a	-	-
LRS 02/17	>100	-	-	-
LRS 21/17	>100	-	-	-
LRS 22/17	>100	-	-	-
LRS 31/17	>100	-	-	-

^atraços indicam isolados que não foram avaliados.

Os isolados expostos aos fungicidas boscalida e pidiflumetofem apresentaram crescimento irregular no tubo germinativo nas concentrações mais altas (Figura 2C, F), o que não foi observado na ausência de fungicida. Estas deformações também não foram observadas nos tubos germinativos dos isolados expostos aos fungicidas bixafem e fluxaproxade.

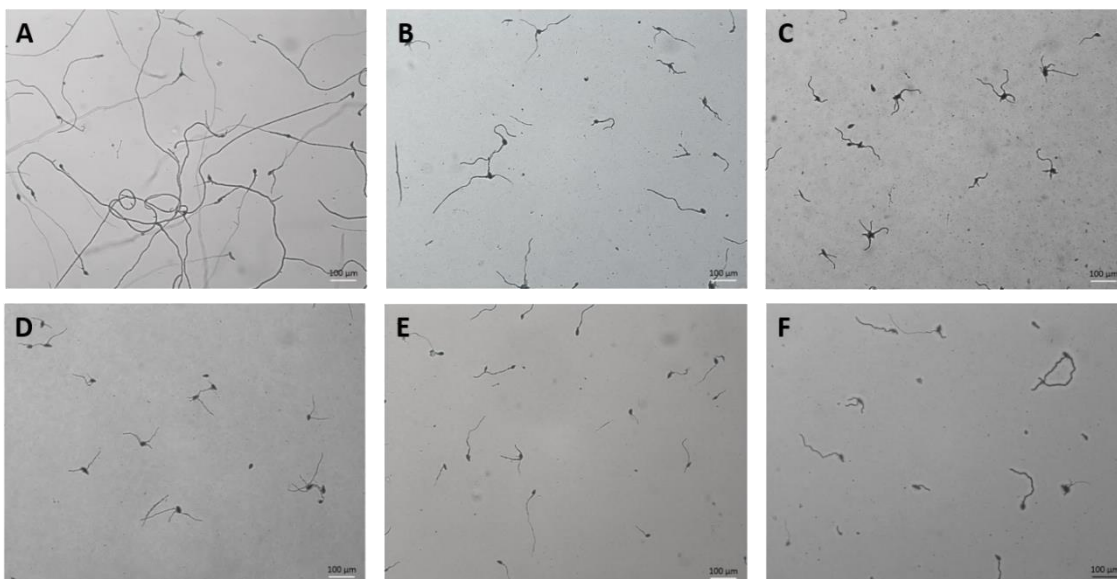


Figura 2. Imagens de conídios germinados do isolado LRS 15/03 de *Alternaria alternata* na presença e na ausência de fungicidas do grupo ISDH. Conídios germinados na ausência de fungicidas (A), a $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (B) e a $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (C) de boscalida e a $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de bixafem (D), fluxapiroxade (E) e pidiflumetofem (F). Imagens ao microscópio ótico, com escala de $100 \mu\text{m}$.

Os fungicidas analisados não impediram a germinação dos conídios de *A. alternata*, mas afetaram a elongação do tubo germinativo (Figura 2). O aumento na concentração do ingrediente ativo, resultou em redução do tamanho do tubo germinativo (Figura 3 e Anexo A). A redução do tubo germinativo do isolado LRS 15/03, na concentração $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ em relação ao tratamento controle, foi de 80,5%, 83,4%, 83,5% e 89,2%, respectivamente, para boscalida, bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem. Para o isolado LRS 41/03, a diminuição do tubo germinativo foi maior, com 82,7%, 88,7%, 88,3% e 88,9%, respectivamente para boscalida, bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem.

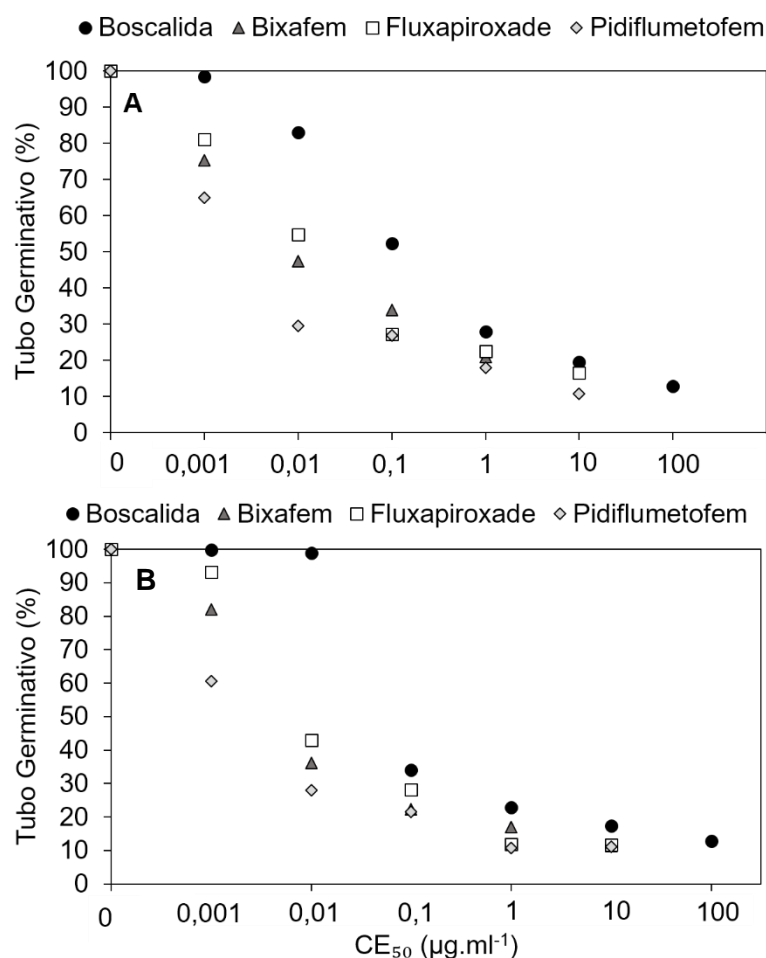


Figura 3. Tamanho relativo do tubo germinativo dos isolados de *Alternaria alternata* LRS 15/03 (A) e LRS 41/03 (B) em meio de cultura Ágar-Água (AA) com diferentes concentrações de boscalida, bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem em comparação ao tamanho do tubo germinativo dos mesmos isolados em meio de cultura AA sem adição de fungicida. O tamanho dos tubos germinativos foi determinado após 12 h de incubação em 27 °C, na ausência de luz.

5.2 Determinação da concentração efetiva de bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE₅₀) do crescimento micelial de *Alternaria alternata*

Os valores da CE₅₀ para os isolados de *A. alternata* classificados como baseline variaram entre 0,44 a 8,82 µg.ml⁻¹, 0,14 a 0,39 µg.ml⁻¹, 0,26 a 0,97 µg.ml⁻¹ e de 0,07 a 0,18 µg.ml⁻¹, respectivamente, para boscalida, bixafem fluxapiroxade, e pidiflumetofem (Tabela 7). Para os demais isolados as variações da CE₅₀ foram de 0,23 a 7,61 µg.ml⁻¹, 0,18 a 1,14 µg.ml⁻¹, 0,10 a 0,99 µg.ml⁻¹ e 0,01 a 0,27 µg.ml⁻¹, respectivamente, para boscalida, bixafem e pidiflumetofem (Tabela 7).

O isolado PR 29/21, coletado em 2021, teve valores da CE₅₀ >100 µg.ml⁻¹ para boscalida e de 15,86 µg.ml⁻¹, 27,20 e 1,16 µg.ml⁻¹, para bixafem, fluxapiroxade

e pidiflumetofem, respectivamente (Tabela 7). Estes valores são mais altos do que o verificado para os 36 isolados testados. Assim, o isolado teve fator de resistência >1000 vezes em relação ao segundo isolado com maior valor de CE_{50} (LRS 41/03), como também >1000 vezes em relação ao isolado mais sensível (SC 7/18) para boscalida. Para bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem o fator de resistência do isolado PR 29/21 em relação aos isolados com maior e menor valores da CE_{50} variaram de 14 a 88 (isolados BA 7/18 e SC 7/18), 28 a 272 (isolados CH 3/18 e SC 7/18) e 4 a 116 vezes (isolados LRS 22/17 e SC 7/18), respectivamente. Esses resultados indicam que o isolado PR 29/21 é resistente aos fungicidas boscalida, bixafem e fluxapiroxade e tem sensibilidade reduzida a pidiflumetofem, em comparação aos demais isolados avaliados. Embora o valor da CE_{50} do isolado PR 29/21 para o fungicida pidiflumetofem seja alto, ainda é um valor menor em relação aos de boscalida, bixafem e fluxapiroxade.

Tabela 7. Valores da concentração efetiva de boscalida, bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem para inibir 50% (CE_{50}) do crescimento micelial de 37 isolados de *Alternaria alternata*.

Isolado	Boscalida	Bixafem	CE_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	
			Fluxapiroxade	Pidiflumetofem
LRS 15/03	1,33	0,16	0,83	0,12
LRS 21/03	0,44	0,23	0,26	0,07
LRS 35/03	7,16	0,23	0,63	0,11
LRS 41/03	8,82	0,39	0,97	0,18
LRS 32/04	0,75	0,14	0,35	0,11
LRS 01/17	2,01	0,20	0,65	0,17
LRS 02/17	3,73	0,26	0,93	0,04
LRS 06/17	1,69	0,52	0,53	0,11
LRS 07/17	1,96	0,44	0,52	0,07
LRS 21/17	7,61	0,36	0,70	0,13
LRS 22/17	5,69	0,81	0,56	0,27
LRS 25/17	6,14	1,13	0,84	0,08
LRS 30/17	2,37	0,54	0,54	0,07
LRS 31/17	6,70	0,33	0,46	0,20
LRS 35/17	5,33	0,95	0,69	0,15
LRS 11/18	0,82	0,21	0,27	0,04

Tabela 7. Continuação.

Isolado	Boscalida	Bixafem	Fluxapiroxade	Pidiflumetofem
	CE ₅₀ (µg.ml ⁻¹)			
BA 7/18	6,53	1,14	0,84	0,08
BA 20/18	3,20	0,85	0,70	0,16
BU 1/18	0,41	0,23	0,11	0,02
CH 3/18	2,72	0,57	0,99	0,07
CH 4/18	0,65	0,20	0,26	0,04
CH 12/18	2,16	0,79	0,66	0,11
PR 5/18	1,10	0,42	0,48	0,06
SC 7/18	0,23	0,18	0,10	0,01
SC 14/18	1,84	0,36	0,60	0,05
CH 28/21	2,20	0,66	0,57	0,07
CH 29/21	0,58	0,29	0,24	0,05
PP 01/21	2,08	0,75	0,47	0,08
PP 02/21	1,75	0,78	0,67	0,06
PP 03/21	1,31	0,72	0,57	0,07
PR 29/21	>100	15,86	27,20	1,16
PR 42/21	1,13	0,70	0,61	0,06
PR 43/21	1,63	0,65	0,57	0,09
PR 44/21	1,77	0,62	0,66	0,07
SC 31/21	1,17	0,96	0,63	0,08
SC 32/21	2,07	0,59	0,62	0,08
SC 33/21	4,82	1,11	0,67	0,14

Os isolados LRS 35/03, LRS 41/03, LRS 21/17, LRS 22/17, LRS 25/17, LRS 31/17, LRS 35/17 e BA 7/18 tiveram os valores da CE₅₀ de boscalida entre 5 e 8,82 µg.ml⁻¹. Para bixafem os isolados LRS 25/17, BA 7/18 e SC 33/21 tiveram valores pouco maior que 1 µg.ml⁻¹, correspondendo aos valores mais altos para esse fungicida. Os valores da CE₅₀ mais altos para fluxapiroxade foram 0,93, 0,97 e 0,99 para os isolados LRS 02/17, LRS 41/03 e CH 3/18, respectivamente. Para pidiflumetofem os valores mais altos foram 0,20 e 0,27 µg.ml⁻¹ para os isolados LRS 31/17 e LRS 22/17.

Os isolados coletados no ano de 2021 tiveram, de modo geral, valores da CE₅₀ similares entre os isolados coletados nos demais anos para os fungicidas testados (Figura 4), como mostra a distribuição de frequência da CE₅₀ para 36 isolados de *A. alternata* (não incluído o isolado PR 29/21). Apenas para o fungicida boscalida, os isolados coletados em 2017 e dois isolados de 2003 apresentaram os valores mais altos de CE₅₀. Esses resultados mostram que os diferentes anos de

coletas dos isolados de *A. alternata* não estão relacionados à alteração nos valores da CE_{50} para os fungicidas ISDH.

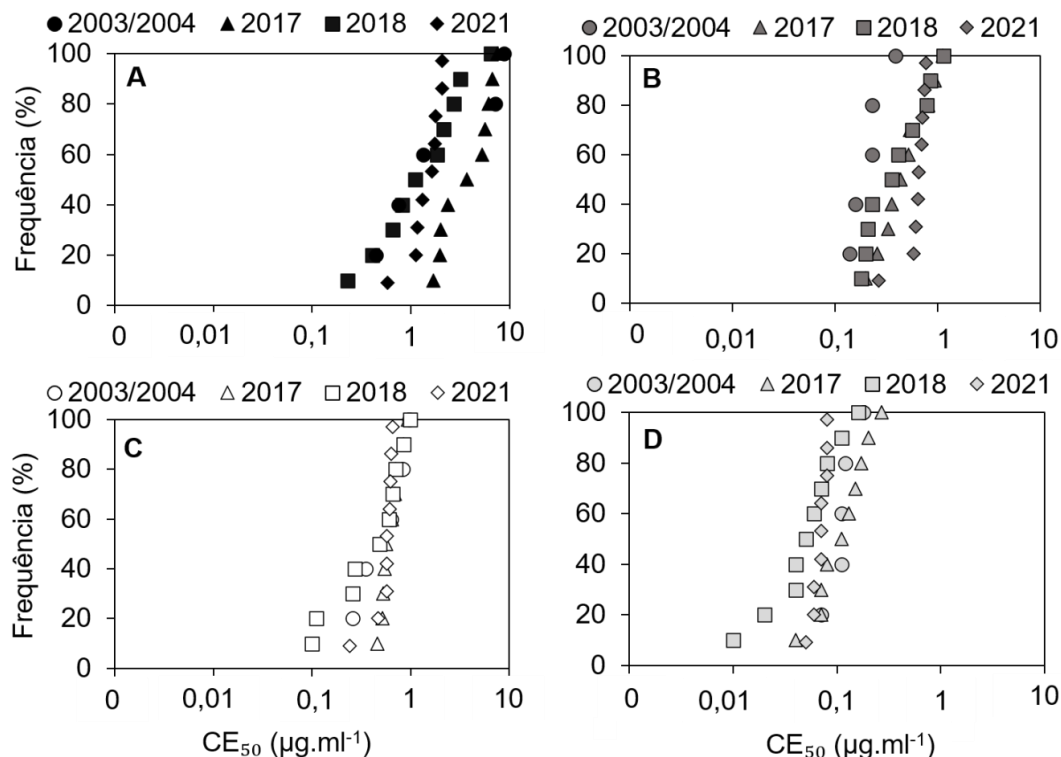


Figura 4. Frequência (%) de 36 isolados de *Alternaria alternata* coletados em 2003/2004 ($n=5$), em 2017 ($n=10$), 2018 ($n=10$) e 2021 ($n=11$), em relação aos valores da CE_{50} ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) dos fungicidas boscalida (A), bixafem (B), fluxapiroxade (C) e pidiflumetofem (D). O isolado PR 29/21 não está incluído nas figuras.

A frequência acumulada dos valores da CE_{50} para os fungicidas ISDH (Figura 5), considerando todos os isolados, independentemente do ano de coleta, mostra que a eficiência de bixafem na inibição de *A. alternata* está na faixa de 0,10 a 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ como fluxapiroxade, o que difere dos demais fungicidas que apresentam maior diferença de faixa de valores da CE_{50} . Boscalida é o fungicida com menor eficiência e pidiflumetofem o de maior eficiência na inibição de *A. alternaria*. Isso sugere que a eficiência dos fungicidas está relacionada ao seu grupo químico, uma vez que bixafem e fluxapiroxade pertencem ao grupo “pyrazole – 4 – carboxamide”, enquanto boscalida pertence ao grupo “pyridine – carboxamides” e pidiflumetofem ao grupo “N-methoxy-(phenylethyl)-pyrazole-carboxamides”. Embora valores da CE_{50} de bixafem e de fluxapiroxade tenham ficado na mesma faixa de valores, não houve correlação significativa entre os valores de CE_{50} dos diferentes fungicidas avaliados (Anexo C).

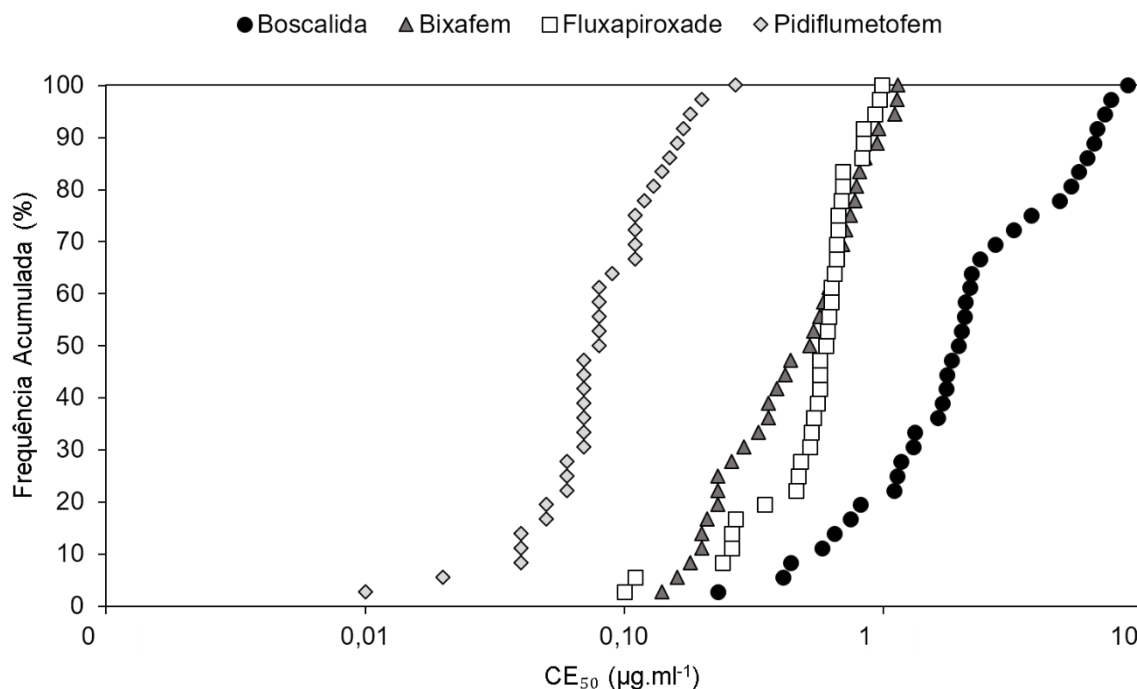


Figura 5. Distribuição dos valores da concentração efetiva (CE_{50}) para inibir em 50% o crescimento micelial de 36 isolados de *Alternaria alternata* em frequência acumulada para os fungicidas boscalida, bixafem, fluxapiróxade e pidiflumetofem.

5.3 Concentrações discriminatórias de bixafem, boscalida, fluxapiróxade e pidiflumetofem para inibir o crescimento micelial de *Alternaria alternata*

Todos os 226 isolados de *A. alternata*, com exceção do PR 29/21, foram sensíveis aos fungicidas ISDH testados (Figura 6). As concentrações discriminatórias de 10 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de boscalida promoveram níveis similares de inibição do crescimento micelial de *A. alternata* (Tabela 8, Figura 6A) s. Os isolados que tiveram inibições igual ou maior a 97% para boscalida a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ foram LRS 08/17, BA 7/18, BA 17/18, CH 2/18, CH 6/17, CH 7/18, CH 14/18, CH 25/18, PR 3/18 e PR 5/18. O isolado PR 29/21 teve a menor inibição do crescimento micelial com 11,8%, sendo o único isolado fenotipicamente resistente ao fungicida boscalida.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial de *A. alternata* promovida por bixafem foi semelhante àquela promovida por fluxapiróxade na maioria dos isolados testados (Tabela 8, Figura 6B). No entanto, para alguns isolados, como os coletados em 2003 e 2004, a porcentagem de inibição foi maior para bixafem do que fluxapiróxade. Já para isolados coletados em 2021, a inibição foi maior para fluxapiróxade. A inibição do isolado PR 29/21 na dose discriminatória de bixafem e fluxapiróxade foi de 42,2%, e fenotipicamente esse isolado foi classificado como resistente a esses fungicidas.

Pidiflumetofem proporcionou as maiores porcentagens de inibição no crescimento micelial de *A. alternata*, em relação aos demais fungicidas avaliados (Tabela 8, Figura 6B). A maioria dos isolados tiveram inibição maior que 95%, vários deles com 100% de inibição. A menor porcentagem de inibição foi do isolado PR 29/21 com 68,5%, o que mostra uma sensibilidade reduzida a pidiflumetofem.

Tabela 8. Inibição do crescimento micelial (%) de 226 isolados de *Alternaria alternata* com os fungicidas boscalida, nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem na concentração de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, em relação à testemunha.

Isolados	Inibição do Crescimento Micelial (%)				
	Boscalida		Bixafem	Fluxapiroxade	Pidiflumetofem
	10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$		
LRS 15/03	68,7	73,1	90,5	68,1	91,9
LRS 21/03	78,5	80,5	89,4	82,9	98,5
LRS 35/03	51,9	56,1	93,3	66,4	98,1
LRS 41/03	54,6	55,5	96,3	68,5	81,7
LRS 32/04	78,6	80,8	97,3	80,1	98,0
LRS 01/17	67,1	70,5	94,7	79,4	99,7
LRS 02/17	65,3	70,9	95,8	76,7	100,0
LRS 03/17	68,7	83,1	83,7	88,4	98,5
LRS 04/17	71,9	78,8	88,9	93,4	100,0
LRS 05/17	63,5	77,0	88,5	91,9	99,2
LRS 06/17	63,5	72,5	97,6	97,3	99,0
LRS 07/17	67,0	70,5	84,3	88,1	96,6
LRS 08/17	64,7	70,2	87,2	89,1	94,4
LRS 09/17	72,3	77,2	90,6	91,6	99,8
LRS 21/17	55,6	60,9	91,8	79,6	98,7
LRS 22/17	52,6	58,5	91,1	74,2	92,9
LRS 23/17	69,6	74,2	89,6	93,9	97,8
LRS 24/17	79,3	82,3	91,0	94,7	96,1
LRS 25/17	65,4	73,8	97,2	96,1	97,7
LRS 27/17	70,2	81,8	96,7	98,5	98,5
LRS 29/17	65,9	76,3	85,1	89,9	86,5
LRS 30/17	65,4	88,9	94,6	95,9	98,9
LRS 31/17	55,8	64,7	96,2	82,6	98,3
LRS 32/17	94,4	95,4	95,6	96,4	99,3
LRS 33/17	86,4	92,9	92,8	95,0	99,0
LRS 34/17	71,4	88,3	92,3	93,3	96,0
LRS 35/17	57,6	76,0	84,2	84,9	93,0
LRS 36/17	61,6	74,7	82,9	89,0	92,0

Tabela 8. Continuação.

Isolados	Inibição do Crescimento Micelial (%)				
	Boscalida		Bixafem	Fluxapiroxade	Pidiflumetofem
	10 µg.ml ⁻¹	100 µg.ml ⁻¹	10 µg.ml ⁻¹		
LRS 37/17	75,8	85,2	90,0	92,0	92,0
LRS 38/17	77,2	88,0	82,8	88,9	96,2
LRS 39/17	72,2	86,0	86,7	89,9	93,4
LRS 40/17	64,7	77,0	84,5	85,2	92,0
LRS 05/18	90,4	91,3	98,8	99,5	98,4
LRS 06/18	82,0	90,4	93,4	95,6	99,5
LRS 08/18	95,9	97,1	97,1	99,5	98,9
LRS 09/18	90,7	91,1	96,1	96,8	98,7
LRS 10/18	91,0	88,4	88,7	95,3	96,2
LRS 11/18	92,5	95,2	85,1	96,3	99,3
LRS 12/18	74,2	82,1	86,4	90,8	93,6
BA 1/18	64,7	79,2	88,8	98,5	98,5
BA 2/18	74,8	92,0	93,0	98,7	98,4
BA 3/18	66,9	77,5	84,0	92,1	97,7
BA 4/18	84,4	91,3	85,4	94,4	99,7
BA 5/18	60,8	69,3	86,3	87,9	99,3
BA 6/18	83,5	96,3	98,4	99,6	100,0
BA 7/18	90,6	97,5	88,2	100,0	100,0
BA 8/18	90,0	91,4	93,6	100,0	100,0
BA 9/18	74,4	78,8	84,8	92,6	88,5
BA 10/18	82,0	85,9	100,0	100,0	100,0
BA 11/18	67,6	86,6	87,8	96,2	99,2
BA 12/18	92,3	95,3	95,7	100,0	100,0
BA 13/18	71,0	90,6	88,7	97,4	98,6
BA 14/18	67,3	71,4	78,8	92,1	95,6
BA 15/18	67,1	82,9	80,5	87,9	99,7
BA 17/18	97,5	98,5	98,3	97,5	100,0
BA 18/18	88,1	85,2	86,2	95,0	100,0
BA 19/18	77,6	83,7	99,2	99,2	100,0
BA 20/18	56,5	69,9	89,3	98,0	99,7
BA 21/18	72,3	90,1	85,4	93,3	97,0
BA 22/18	83,1	90,7	89,5	95,2	98,6
BA 23/18	81,5	87,0	97,3	99,0	97,7
BA 24/18	88,4	91,1	92,7	95,0	99,4
BA 25/18	87,5	89,9	87,4	92,2	99,5
BA 26/18	75,7	81,9	89,0	92,4	98,0
BA 27/18	67,6	75,0	95,2	97,2	96,4
BA 28/18	84,8	91,7	95,2	96,3	98,2
BA 29/18	90,4	95,7	98,2	99,8	100,0
BU 1/18	84,5	92,8	86,0	98,1	98,2
BU 2/18	69,5	72,0	89,4	92,2	99,4

Tabela 8. Continuação.

Isolados	Inibição do Crescimento Micelial (%)				
	Boscalida		Bixafem	Fluxapiroxade	Pidiflumetofem
	10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$		
CH 1/18	77,6	80,7	95,5	94,7	98,5
CH 2/18	97,9	98,1	98,5	99,3	100,0
CH 3/18	68,4	69,5	87,6	93,6	99,6
CH 4/18	78,7	82,2	96,3	96,6	100,0
CH 5/18	80,7	90,7	98,3	99,4	98,4
CH 6/18	96,9	98,4	98,4	98,4	98,6
CH 7/18	99,0	99,3	90,4	99,9	99,8
CH 8/18	78,8	81,5	90,5	94,9	98,6
CH 9/18	88,5	91,7	96,5	98,3	97,1
CH 10/18	85,7	93,3	95,1	97,4	96,5
CH 11/18	81,1	85,4	92,7	94,8	99,3
CH 12/18	62,5	70,9	87,5	93,9	93,0
CH 13/18	54,8	60,0	93,9	95,8	98,1
CH 14/18	96,3	99,5	99,6	99,5	99,9
CH 15/18	81,8	82,2	96,4	98,7	98,1
CH 16/18	93,2	95,3	98,4	97,8	98,4
CH 17/18	80,6	87,0	89,2	94,3	96,6
CH 18/18	87,0	88,7	92,5	95,5	99,0
CH 19/18	87,8	91,3	80,1	97,5	97,7
CH 20/18	71,1	85,2	94,5	95,9	94,7
CH 21/18	88,9	94,8	93,4	100,0	100,0
CH 22/18	73,1	77,0	93,0	97,1	100,0
CH 23/18	81,6	89,0	95,3	98,1	98,2
CH 24/18	91,5	95,3	97,7	100,0	99,8
CH 25/18	96,8	97,8	98,1	100,0	97,3
CH 26/18	72,8	81,9	96,9	97,8	95,5
PR 1/18	90,9	97,6	98,2	99,5	99,5
PR 2/18	95,4	95,7	93,1	99,1	100,0
PR 3/18	91,5	98,0	94,3	100,0	95,2
PR 4/18	59,5	67,6	91,3	96,3	99,0
PR 5/18	94,3	97,4	98,2	98,8	99,7
PR 6/18	74,1	80,2	90,9	95,4	98,5
PR 7/18	76,8	80,7	94,0	95,6	95,0
PR 8/18	64,4	83,5	78,8	87,4	97,0
PR 9/18	63,1	70,1	82,9	89,5	87,9
PR 10/18	73,2	83,2	92,0	96,3	91,5
SC 1/18	63,6	67,0	80,7	90,7	94,5
SC 2/18	88,1	91,2	98,4	97,5	99,9
SC 3/18	66,7	74,4	80,4	82,9	94,6
SC 4/18	61,1	78,7	90,8	95,5	95,2
SC 5/18	86,7	94,2	93,5	100,0	98,6
SC 6/18	60,6	66,7	79,5	95,9	86,7

Tabela 8. Continuação.

Isolados	Inibição do Crescimento Micelial (%)				
	Boscalida		Bixafem	Fluxapiroxade	Pidiflumetofem
	10 µg.ml ⁻¹	100 µg.ml ⁻¹	10 µg.ml ⁻¹		
SC 7/18	71,2	72,3	87,3	94,4	97,4
SC 8/18	71,3	79,9	91,3	94,7	96,0
SC 10/18	73,4	78,1	86,5	88,2	96,5
SC 11/18	70,3	74,6	89,2	95,8	99,4
SC 12/18	77,4	82,1	95,7	96,8	97,1
SC 13/18	79,9	90,8	91,6	95,8	100,0
SC 14/18	74,0	76,9	99,8	98,0	98,0
SC 15/18	95,0	96,1	96,7	100,0	99,8
SC 16/18	71,7	77,7	98,0	99,8	93,4
SC 17/18	68,9	84,0	87,6	98,7	92,7
SC 18/18	83,0	86,5	96,3	99,8	94,7
SC 19/18	69,1	84,9	90,5	97,4	98,5
SC 20/18	55,7	72,5	85,7	97,1	100,0
SC 21/18	65,0	86,0	99,3	99,6	100,0
SC 22/18	63,7	76,8	85,5	95,2	98,9
SC 23/18	85,6	89,9	100,0	99,6	100,0
SC 24/18	65,5	75,2	91,1	97,2	99,5
SC 25/18	73,2	84,8	96,6	99,5	96,4
SC 26/18	93,0	97,0	100,0	100,0	100,0
SC 27/18	64,8	72,2	92,6	97,3	96,3
SC 28/18	84,0	89,1	91,9	100,0	98,3
SC 29/18	69,2	90,2	93,5	100,0	98,8
SC 30/18	59,0	70,5	91,2	100,0	93,8
PR 11/21	63,2	73,2	83,3	97,3	97,1
PR 12/21	72,7	80,3	93,7	99,6	99,3
PR 14/21	67,8	71,9	82,5	98,3	99,1
PR 15/21	72,2	81,5	96,7	98,7	99,6
PR 16/21	69,5	76,6	83,3	98,7	98,9
PR 17/21	66,6	75,7	88,5	99,4	97,4
PR 18/21	65,1	70,6	81,7	96,7	99,1
PR 19/21	68,7	71,4	85,0	97,7	99,5
PR 21/21	62,7	68,0	79,7	95,6	99,6
PR 22/21	64,7	70,1	87,2	97,9	98,5
PR 23/21	70,8	73,7	85,2	97,6	99,5
PR 24/21	70,2	72,7	83,3	92,1	92,4
PR 25/21	73,0	76,1	82,6	96,5	97,0
PR 26/21	73,8	75,4	80,5	96,0	96,9
PR 27/21	71,9	75,3	79,8	95,6	97,5
PR 28/21	81,2	81,6	89,8	96,2	98,4
PR 29/21*	5,5	11,8	42,2	42,2	68,5

*Isolado com fenótipo resistente.

Tabela 8. Continuação.

Isolados	Inibição do Crescimento Micelial (%)				
	Boscalida		Bixafem	Fluxapiroxade	Pidiflumetofem
	10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$		
PR 30/21	73,8	72,3	80,3	96,5	92,5
PR 31/21	74,0	74,1	82,8	96,2	98,5
PR 33/21	71,6	72,8	80,5	97,4	98,8
PR 34/21	79,5	82,1	90,7	99,7	100,0
PR 35/21	68,2	73,8	84,7	95,2	98,7
PR 36/21	70,2	74,5	81,1	95,4	99,4
PR 38/21	82,1	93,5	90,1	99,3	100,0
PR 39/21	70,8	74,1	80,0	96,0	99,7
PR 40/21	68,7	73,2	79,0	96,5	99,7
PR 41/21	81,9	84,2	88,0	92,1	98,4
PR 42/21	94,7	96,0	97,8	99,5	100,0
PR 43/21	69,0	73,1	86,4	91,0	96,6
PR 44/21	67,5	71,6	86,9	92,0	95,4
CH 28/21	70,3	77,6	90,9	95,1	98,7
CH 29/21	86,8	88,8	91,8	94,8	97,5
CH 30/21	76,3	81,4	87,7	97,1	100,0
CH 31/21	65,2	73,7	93,6	99,0	99,3
CH 32/21	75,4	79,2	82,7	88,9	94,2
CH 33/21	80,4	88,4	97,1	98,5	98,8
CH 34/21	85,3	85,4	97,3	98,5	98,3
CH 35/21	87,0	89,6	95,7	97,2	98,0
CH 36/21	89,4	90,4	97,1	96,5	98,3
CH 37/21	60,5	67,3	94,8	94,9	94,5
CH 38/21	85,4	90,1	92,0	98,3	99,2
CH 39/21	74,5	87,4	84,8	97,2	97,5
CH 40/21	89,6	93,7	95,7	98,1	99,1
PP 01/21	69,8	72,2	82,0	91,4	91,9
PP 02/21	71,2	76,0	95,9	94,6	100,0
PP 03/21	79,9	80,8	90,0	95,8	96,3
PP 04/21	70,3	80,9	88,4	96,5	97,4
PP 05/21	65,3	73,0	89,7	95,7	99,2
PP 06/21	60,0	70,0	89,8	95,7	98,3
PP 07/21	61,8	76,3	88,3	99,0	100,0
PP 08/21	70,7	76,8	83,6	86,2	96,8
PP 09/21	71,3	77,4	85,7	91,8	96,7
PP 10/21	69,7	75,0	86,8	85,1	97,5
PP 11/21	70,5	73,8	88,3	93,6	99,8
PP 12/21	64,3	69,8	93,2	97,0	91,4
PP 13/21	62,2	67,4	82,4	91,0	88,5
PP 14/21	65,9	76,6	82,7	88,3	98,3
PP 15/21	69,7	76,3	82,9	89,1	97,1
PP 16/21	74,7	83,4	88,4	97,3	92,3

Tabela 8. Continuação.

Isolados	Inibição do Crescimento Micelial (%)				
	Boscalida		Bixafem	Fluxapiroxade	Pidiflumetofem
	10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$		
PP 17/21	67,5	76,7	89,4	97,0	94,3
PP 18/21	68,8	75,5	87,2	96,1	97,0
PP 19/21	60,6	72,2	88,0	96,7	97,6
PP 20/21	70,6	78,8	91,6	96,1	99,9
PP 21/21	61,3	76,0	90,4	96,3	98,2
PP 22/21	67,2	79,0	90,7	97,6	97,4
PP 23/21	67,9	81,7	92,3	97,1	98,0
PP 24/21	57,1	70,2	91,9	95,9	98,5
PP 25/21	65,6	78,0	89,7	95,7	98,6
SC 31/21	81,3	85,3	88,8	100,0	100,0
SC 32/21	73,5	78,3	91,8	97,8	99,6
SC 33/21	61,4	70,7	84,6	94,3	93,2
SC 34/21	88,4	91,1	87,6	88,7	99,6
SC 35/21	61,8	72,4	82,9	85,9	93,1
SC 36/21	57,5	69,3	80,2	92,2	98,3
SC 37/21	70,0	78,0	87,8	88,1	92,3
SC 38/21	64,2	78,4	93,8	96,5	100,0
SC 39/21	75,1	80,2	92,0	92,1	98,2
SC 40/21	78,8	80,5	84,6	88,2	96,2
SC 41/21	75,8	78,7	97,1	100,0	100,0
SC 42/21	62,6	68,2	85,7	88,8	98,7
SC 43/21	58,2	68,3	82,8	94,6	100,0
SC 44/21	70,7	75,2	84,0	96,0	99,2
SC 45/21	69,6	73,4	94,3	92,7	99,0
SC 46/21	73,1	78,3	98,5	98,3	100,0
SC 47/21	65,2	69,5	94,0	86,0	99,6
SC 48/21	63,3	71,7	91,6	96,0	100,0
SC 49/21	72,8	83,2	96,4	100,0	100,0
SC 50/21	65,4	72,0	85,2	90,4	100,0
SC 51/21	63,9	76,1	94,2	97,9	100,0
SC 52/21	71,6	82,1	97,3	99,6	100,0
SC 53/21	58,4	68,8	85,2	91,2	100,0
SC 54/21	65,5	71,2	88,4	94,6	98,5

Alguns isolados, como BA 10/18 e SC 26/18, mostraram alta sensibilidade aos fungicidas bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem na dose discriminatória de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Os isolados CH 21/18, SC 31/21, SC 41/21 e SC 49/21 também foram altamente sensíveis a fluxapiroxade e pidiflumetofem, com 100% de inibição na dose de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

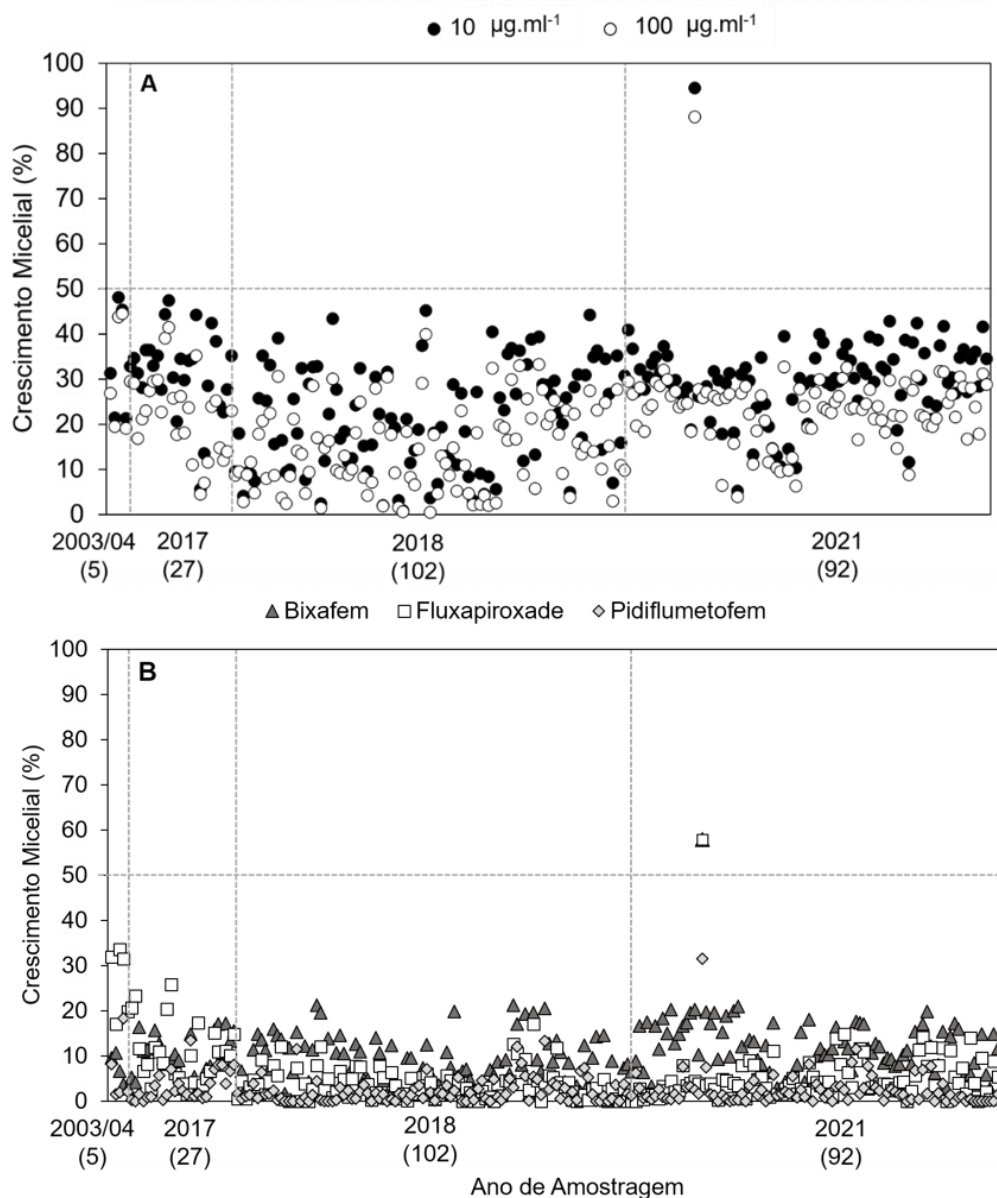


Figura 6. Crescimento micelial (% em relação ao controle sem fungicida) de 226 isolados de *Alternaria alternata* nas concentrações 10 e 100 µg.ml⁻¹ para o fungicida boscalida (A), e 10 µg.ml⁻¹ para bixafem, fluxapiraxade e pidiflumetofem (B). A linha pontilhada horizontal classifica os isolados sensíveis (< 50% crescimento micelial) e resistentes (≥ 50% do crescimento micelial). As linhas pontilhadas verticais separam os isolados coletados em anos diferentes. O número de isolados coletados em cada ano é apresentado entre parênteses.

Os resultados de concentrações discriminatórias para os fungicidas boscalida, bixafem, fluxapiraxade e pidiflumetofem com os isolados de *A. alternata* mostram que os mesmos são sensíveis aos fungicidas do grupo ISDH. No entanto, a identificação de um isolado resistente ou de baixa sensibilidade em meio aos 226 isolados avaliados, sugere que apesar de sensíveis, existe um risco de resistência

prática com o uso continuado desses fungicidas sem a adoção de práticas anti-resistência.

5.4 Avaliação *in vivo* de sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* aos fungicidas boscalida e pidiflumetofem

A sensibilidade *in vivo* de sete isolados de *A. alternata* (Tabela 9) foram testados com boscalida, no qual o isolado LRS 32/04 obteve a menor porcentagem de severidade dos sintomas na concentração de 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Embora o isolado BA 7/18 apresentou as menores porcentagens de severidade dos sintomas nas folhas tratadas com os fungicidas boscalida e pidiflumetofem, esses resultados não foram utilizados como base para verificar a eficiência dos fungicidas para o isolado, uma vez que este também apresentou baixa severidade dos sintomas no tratamento controle. O isolado PR 29/21 resultou na maior severidade nas duas concentrações testadas para boscalida, como também observou-se que as folhas com fungicida teve porcentagem mais alta de severidade do que folhas sem fungicidas.

Tabela 9. Severidade dos sintomas em folhas de tangerina 'Murcott' com e sem aplicação de fungicida, inoculadas com isolados de *Alternaria alternata*.

Isolado	Controle	Boscalida		Pidiflumetofem
		75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Severidade dos sintomas (%)*				
LRS 41/03	46,8 (\pm 12,4) b**	24,5 (\pm 11,3) b	7,1 (\pm 2,1) b	0,2 (\pm 0,1) a
LRS 32/04	71,2 (\pm 8,0) c	14,0 (\pm 6,8) b	3,3 (\pm 1,0) a	1,3 (\pm 0,1) a
LRS 21/17	83,9 (\pm 5,2) c	30,1 (\pm 14,0) bc	16,6 (\pm 3,2) b	2,6 (\pm 2,2) a
BA 7/18	13,1 (\pm 4,7) b	0,2 (\pm 0,1) a	<0,1 (\pm <0,1) a	0,0 (\pm 0,0) a
CH 29/21	97,6 (\pm 1,0) c	34,5 (\pm 13,0) b	22,9 (\pm 6,1) b	1,8 (\pm 1,5) a
PR 29/21	49,5 (\pm 19,8) b	70,7 (\pm 12,8) b	56,0 (\pm 18,7) b	0,2 (\pm 0,2) a
SC 33/21	84,4 (\pm 3,3) c	32,2 (\pm 9,1) bc	15,4 (\pm 7,0) ab	4,1 (\pm 2,0) a

*Resultados da média de 5 folhas de tangerina para porcentagem da severidade dos sintomas.

**Médias com mesma letra não diferem estatisticamente entre si, na linha, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, após transformação logarítmica.

A porcentagem de controle dos isolados LRS 41/17, LRS 32/04, LRS 21/17, BA 7/18, CH 29/21 e SC 33/21 na concentração de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de boscalida foram, respectivamente, 47,6%, 80,3%, 64,1%, 98,5%, 64,7% e 61,8%, já na concentração 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para os mesmos isolados foram 84,8%, 95,4%, 80,2%, 99,8%, 76,5%, 81,8% de controle. O isolado PR 29/21 não apresentou redução na porcentagem de sintomas em nenhuma das concentrações de boscalida testada, o que se observou

foi um aumento de 42,8% e 13,1% de sintomas nas folhas tratadas com boscalida nas concentrações de 75 e 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, em relação ao tratamento controle.

O fungicida pidiflumetofem teve ótimo controle em todos os isolados avaliados. No qual, a porcentagem de controle foi de 99,6%, 98,2%, 99,6%, 100%, 98,2 e 95,1% para os isolados LRS 41/17, LRS 32/04, LRS 21/17, BA 7/18, CH 29/21 e SC 33/21, respectivamente. Para o isolado PR 29/21, diferente do observado para boscalida, o controle foi de 99,6% nas folhas aplicadas com pidiflumetofem, no qual se mostra que não há resistência cruzada entre boscalida e pidiflumetofem.

As imagens das folhas com e sem fungicidas inoculadas com os sete isolados de *A. alternata* estão apresentadas no Anexo D.

5.5 Identificação de pontos de mutações no complexo SDH para isolados de *Alternaria alternata*.

As ampliações das regiões do complexo SDH para identificação de pontos de mutações podem ser observadas no Anexo E.

Isolados de *A. alternata* foram avaliados quanto à presença de mutação no complexo SDH. O sequenciamento parcial da proteína ferro-enxofre (*SdhB*) não identificou nenhuma substituição de aminoácidos nos sete isolados analisados, Tabela 10. No entanto, para as proteínas CybL (*SdhC*) e CybS (*SdhD*), observou-se pontos de mutações em 1 e 3 isolados, respectivamente. Foram depositadas as sequências parciais das três subunidades do complexo SDH analisadas no GenBank (Anexo B).

Tabela 10. Isolados de *Alternaria alternata* com os valores da determinação da CE₅₀ para os fungicidas boscalida, bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem, utilizados para identificação de pontos de mutação no complexo SDH pelas substituições de aminoácidos nas subunidades SDHB, SDHC e SDHD.

Isolado	Boscalida	Bixafem	Fluxapiroxade	Pidiflumetofem	Complexo SDH		
	CE ₅₀ (µg.ml ⁻¹)				SDHB	SDHC	SDHD
LRS 41/03	8,82	0,39	0,97	0,18
LRS 32/04	0,75	0,14	0,35	0,11
LRS 21/17	7,61	0,36	0,7	0,13	A47T
BA 7/18	6,53	1,14	0,84	0,08
CH 29/21	0,58	0,29	0,24	0,05
PR 29/21	>100	15,86	27,2	1,16	...	H134R	A47T
SC 33/21	4,82	1,11	0,67	0,14	Q18H, T28A, M31I, A47T

Na subunidade SDHC foi identificado uma mutação pela substituição de histidina (CAC) por arginina (CGC) na posição 134 (H134R) para o isolado PR 29/21, Figura 7. Essa mutação concede fenótipo de alta resistência para *A. alternata* ao fungicida boscalida e moderada resistência ao fungicida fluxapiroxade, conforme foi comprovado em trabalhos preliminares de Avenot et al. (2014) e Yang et al. (2015). A identificação da mutação H134R para o isolado PR 29/21 corrobora com o alto valor da CE₅₀, não apenas para boscalida, como para os demais fungicidas ISDH testados.

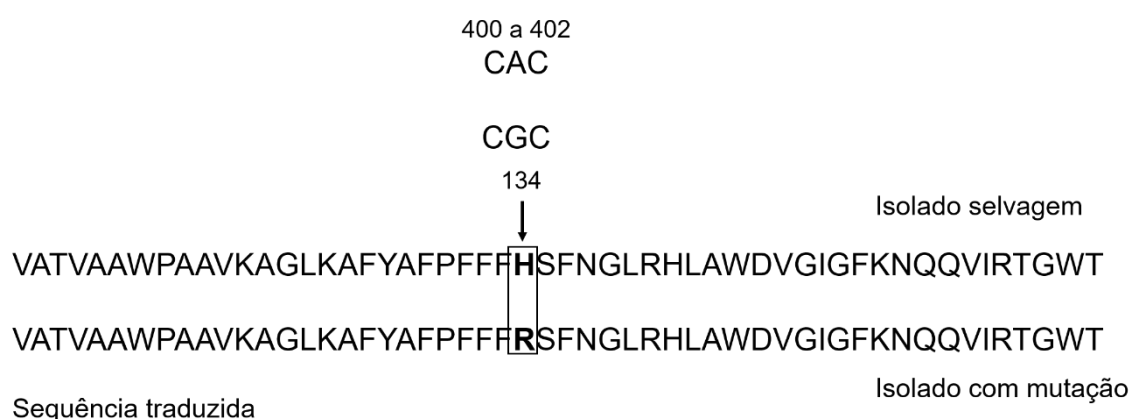


Figura 7. Sequenciamento parcial da subunidade SDHC. Nos códons 400 a 402 contém os nucleotídeos que formam o aminoácido histidina (CAC) no isolado selvagem (linha superior) e arginina (CGC) no isolado com mutação (linha inferior). A flecha indica o ponto de substituição dos aminoácidos e o número acima o códon da mutação.

Na subunidade SDHD foram encontrados 4 pontos de mutações (Figura 8) em 3 dos 7 isolados avaliados. Os isolados LRS 21/17 e PR 29/21 tiveram a substituição de alanina (ACC) por treonina (GCC) na posição 47 (A47T). Já para o isolado SC 33/21 identificou-se 4 pontos de mutações, por meio da substituição de glutamina (CAG) por histidina (CAC) no códon 18 (Q18H), treonina (GCG) por alanina (ACA) na posição 28 (T28A), metionina (ATC) por isoleucina (ATG) no códon 31 (M31I) e a mutação A47T, a mesma dos isolados LRS 21/17 e PR 29/21.



Figura 8. Sequenciamento parcial da subunidade SDHD. Os números superiores correspondem à posição do nucleotídeo que formam os aminoácidos dos pontos de mutações. As flechas indicam o ponto de substituição dos aminoácidos na sequência traduzida, e o número em cima das mesmas são os códon das mutações. Isolado selvagem representa a linha superior da sequência e a inferior o isolado com mutação.

Pontos de mutações encontrados na proteína CybS (*SdhD*) não estão relacionadas com alterações nos valores da determinação da CE_{50} , como foi observado em trabalho preliminar de Yang et al. (2015) com *A. alternata* em pêssgo. Como observado na Tabela 10, para o isolado SC 33/21 que embora contém 4 pontos de substituições de aminoácidos, os valores da CE_{50} são baixos para todos fungicidas ISDH avaliados.

6. DISCUSSÃO

Os testes de sensibilidade de patógenos a fungicidas com sítio-alvo na respiração fúngica, como os do grupo ISDH, são, comumente, feitos por meio da germinação de conídios. No entanto, este trabalho mostrou que a avaliação da sensibilidade de *Alternaria alternata* aos fungicidas bixafem, boscalida, fluxapiroxade e pidiflumetofem por meio da germinação de conídios não é adequado, uma vez que os fungicidas causam distorções no tubo germinativo e redução no seu tamanho, mas não impedem a germinação dos conídios. Sugere-se que o teste de sensibilidade por meio do crescimento micelial seja mais apropriado para a espécie fúngica e os fungicidas testados neste trabalho. O teste de sensibilidade de *A. alternata* pela germinação de conídios resulta em falso fenótipo de resistência dos isolados, como também foi observado por Vega & Dewdney (2015) para o mesmo patógeno com o fungicida boscalida. Leroux e colaboradores (2010) testaram diversos fungicidas ISDH e observaram que eles afetaram a alongação do tubo germinativo de *Botrytis cinerea*, mas não impediram a germinação dos esporos, o que corrobora com os resultados apresentados neste trabalho. Por sua vez, o fungicida fluopyram, também do grupo ISDH, na concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, ocasionou completa inibição na germinação dos conídios de *Botrytis cinerea*, com valores semelhantes de CE_{50} tanto para a germinação quanto para o crescimento micelial (Veloukas & Karaoglanidis, 2012). Assim, o efeito inibitório dos fungicidas ISDH na germinação é variável, dependendo do ingrediente ativo e da espécie fúngica.

Neste trabalho, os resultados com os fungicidas do grupo ISDH mostraram que os isolados de *A. alternata* são sensíveis a estes fungicidas, porém com variação na sensibilidade dependendo do ingrediente ativo utilizado. Além disso, verificou-se que não há diminuição na sensibilidade dos isolados coletados em 2021 em relação aos isolados coletados em 2003/04. Ademais, foi observado que não há múltipla resistência entre fungicidas ISDH e IQe, uma vez que os isolados de 2017 e 2018 utilizados neste trabalho pertencem a uma coleção de fenótipos de resistência aos fungicidas azoxistrobina e piraclostrobina (IQe). Resultados similares a esses também foram observados por Vega & Dewdney (2015), que por meio de uma coleção de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina resistentes a azoxistrobina avaliaram a sensibilidade desses isolados ao fungicida boscalida, onde todos os isolados analisados foram sensíveis.

Dentre os fungicidas testados, boscalida apresentou os maiores valores da CE_{50} , com média geral de $2,83 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e as menores porcentagem de inibição do crescimento micelial. Bixafem e fluxapiraxade mostraram médias similares, com de valores da CE_{50} de $0,54$ e $0,58 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Pidiflumetofem mostrou melhor efetividade na inibição do patógeno em todos os experimentos, com média da CE_{50} de $0,09 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. O valor da média da CE_{50} de pidiflumetofem foi 30 vezes menor do que o valor médio de boscalida. A diferença de sensibilidade de *A. alternata* entre os fungicidas testados parece estar também relacionada ao ano de lançamento do produto. Boscalida foi o primeiro fungicida ISDH de segunda geração lançado no mercado, que forneceu maior espectro de ação sobre patógenos, seguido de bixafem, fluxapiraxade e pidiflumetofem (Stammler et al., 2015; Jeanmart et al., 2021). O fungicida pidiflumetofem se diferencia dos demais por pertencer a um grupo químico diferente (*N-methoxy-(phenylethyl)-pyrazole-carboxamides*). A alta eficiência de pidiflumetofem no controle de doenças de plantas, parece estar relacionada à alta propriedade de ligação do fungicida com as enzimas do complexo mitocondrial II, além de maior aderência e distribuição na planta (Olaya et al., 2016; Maienfisch & Mangelinckx, 2021).

Dentre todos isolados de *A. alternata* avaliados quanto à sensibilidade aos fungicidas ISDH, apenas um teve genótipo de resistência: o isolado PR 29/21. Os valores da CE_{50} para esse isolado foram de >100 , $15,86$, $27,20$ e $1,16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para boscalida, bixafem, fluxapiraxade e pidiflumetofem, respectivamente. Isso sugere que, embora *A. alternata* seja sensível aos fungicidas ISDH, existem isolados naturalmente resistentes. Deve-se, portanto, ter cuidado na utilização de fungicidas sitio-específico, para não selecionar isolados resistentes e perder a eficiência dos fungicidas desse grupo. Segundo a lista do ano de 2019 de patógenos de risco do Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas (FRAC), *A. alternata* é considerado patógeno de alto risco de resistência em campo a diversos grupos de fungicidas por apresentar resistência em curto período de tempo de exposição a fungicidas, o que compromete a longevidade de eficiência dos produtos disponíveis no mercado.

As folhas tratadas com pidiflumetofem no ensaio *in vivo* mostraram as menores severidades de sintomas, comprovando a alta sensibilidade de *A. alternata* a esse fungicida. A alta eficiência de pidiflumetofem foi também observada para o isolado PR 29/21, classificado como genótipo resistente aos demais fungicidas ISDH. Folhas de tangerinas pulverizadas com pidiflumetofem mostraram severidade

de 0,2% de sintomas, enquanto para boscalida na maior concentração testada (150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de i.a.), a severidade do isolado PR 29/21 foi de 56%. Avenot e Michailides (2007) também avaliaram a eficácia de boscalida em testes *in vivo*, com folhas destacadas de pistache. A eficácia do fungicida em isolados sensíveis foi de 46,22% enquanto para os isolados resistentes a eficácia ficou em apenas 1,80%, mostrando que boscalida não é eficiente no controle de *A. alternata* em pistache. Esses resultados de resistência prática se assemelham aos encontrados neste trabalho, uma vez que as folhas de tangerina tratadas com fungicida boscalida apresentaram alta porcentagem de severidade dos sintomas.

Após a identificação da resistência aos fungicidas ISDH no isolado PR 29/21, realizou-se o sequenciamento parcial do complexo SDH em vários isolados, com propósito de identificar pontos de mutações nas regiões de interesse amplificadas. Dentre os sete isolados avaliados, o PR 29/21 apresentou mutação H134R na subunidade SDHC. Essa mutação confere alta resistência ao fungicida boscalida e resistência a fluxapiroxade (Yang et al., 2015; Fan et al., 2015), o que confirma os resultados *in vitro* e *in vivo* observados neste trabalho. O crescimento micelial, a produção de esporos, a capacidade de germinação e de infecção de isolados de *A. alternata* de pêssago com mutações H277Y (encontrada na subunidade SDHB) e H134R é similar à de isolados sem as mutações (Fan et al., 2015). Os isolados sensíveis de *A. alternata* do pêssago não apresentaram nenhuma vantagem competitiva em relação aos resistentes (Fan et al., 2015). Assim, deve-se evitar a pressão de seleção com uso frequente de fungicidas ISDH para não selecionar os isolados resistentes e perder a eficiência dos fungicidas sitio-específico.

As quatro mutações encontradas na subunidade SDHD, Q18H, T28A, M31I, A47T, não foram relacionadas à resistência aos fungicidas ISDH. Vega & Dewdney (2015) em trabalho de avaliação de sensibilidade de *A. alternata* em citros a fungicidas ISDH, identificaram as mutações T28A e A47T em isolados sensíveis, e não relacionaram essas mutações com alteração de sensibilidade nos isolados testados. Esses mesmos autores identificaram maior polimorfismo na subunidade SDHD em relação às demais subunidades, e consideraram essa variabilidade natural em isolados selvagens.

Os resultados do nosso trabalho com fungicidas ISDH, mostram que estes são eficientes para manejo da mancha marrom de alternaria, uma vez que grande parte dos isolados de *A. alternata* testados são sensíveis a esses fungicidas,

principalmente, ao pidiflumetofem. No entanto, as estratégias anti-resistência devem ser aplicadas para prolongar a eficiência dos produtos no manejo da doença, uma vez que foi encontrado um isolado com resistência aos fungicidas ISDH em pomares no Estado de São Paulo. As estratégias anti-resistência, segundo o FRAC (2022), incluem: rotação ou alternância de fungicidas com modos de ação diferentes, como também emprego de fungicidas multissítio; utilização da concentração de i. a. recomendado pelo fabricante; utilização de fungicidas sitio-específico como preventivo e não como erradicante; adoção de práticas de manejo integrado, por meio das combinações de técnicas culturais com controle químico, biológico e genético.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi comprovada a eficiência de fungicidas ISDH no controle da mancha marrom de alternaria em tangerinas. Dentre os fungicidas testados pidiflumetofem obteve os melhores resultados de sensibilidade de *A. alternata*, seguido de bixafem e fluxapiroxade. Os ensaios de sensibilidade com boscalida, mostraram que o fungicida tem baixa eficiência no controle dos isolados de *A. alternata*. Neste trabalho também foi observado que o fungicida pidiflumetofem apresentou ótimo controle nos ensaios *in vitro* e *in vivo* para o isolado resistente a boscalida, bixafem e fluxapiroxade, o que sugere não haver resistência cruzada entre pidiflumetofem e os demais fungicidas ISDH testados. A identificação de um isolado com genótipo e fenótipo de resistência demonstra que apesar dos fungicidas ISDH não serem utilizados para controle de *A. alternata*, existem isolados resistentes na natureza, no qual deve-se ter cuidado com o uso de fungicidas sitio-específico para não selecionar esses isolados resistentes.

Os fungicidas bixafem, fluxapiroxade e pidiflumetofem são uma opção para os produtores de tangerineiras para manejo da mancha marrom de alternaria, que dispõem de poucas opções de produtos. Dentre os fungicidas registrados para a doença, já existem isolados de *A. alternata* resistentes no Estado de São Paulo, como aos fungicidas do grupo IQe (Chitolina et al., 2021). A perda da eficiência de produtos do grupo IQe, principais produtos para controle da mancha marrom de alternaria, dificultou o manejo dessa doença pelos produtores de tangerinas.

Embora os fungicidas ISDH sejam uma opção de controle da doença mancha marrom de alternaria, esses produtos não estão em registro para cultura de tangerina ou para doença. Assim, se faz necessário o registro de mais fungicidas com diferentes modos de ação, para que os produtores de tangerina possam manejar a doença da melhor forma possível, e assim, garantir frutos de alta qualidade exigidos pelo mercado *in natura*.

REFERÊNCIAS

- Ackrell, B. A. C. Progress in understanding structure–function relationships in respiratory chain complex II. **FEBS Letters**, v. 466, n. 1, p. 1-5, 2000.
- Agrofit – **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2022. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 jan. 2022.
- Aiello, D.; Guarnaccia, V.; Azzaro, A.; Polizzi, G. *Alternaria* brown spot on new clones of sweet orange and lemon in Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 59, n. 1, p. 131-145, 2020.
- Amaro, A. C. E; Baron, D.; Ono, E. O.; Rodrigues, J. D. Physiological effects of strobilurin and carboxamides on plants: an overview. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 1, p. 1-10, 2019.
- Amim, M. G.; Amorim, L.; Parisi, M. C. M.; Silva Júnior, G. J. Sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas do grupo dos inibidores da desmetilação do carbono 14. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 52, 2021. **Anais...** Evento Online, p. 379. 2021.
- Avenot, H. F., Sellam, A., Karaoglanidis, G., Michailides, T. J. Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. **Phytopathology**, v. 98, n. 6, p. 736-742, 2008.
- Avenot, H.; Sellam, A.; Michailides, T. Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits *AaSDHC* and *AaSDHD* of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. **Plant Pathology**, v. 58, n.6, p. 1134-1143, 2009.

- Avenot, H. F.; Michailides, T. J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. **Crop protection**, v. 29, n. 7, p. 643-651, 2010.
- Avenot, H. F.; Van Den Biggelaar, H.; Morgan, D. P.; Moral, J.; Joosten, M. H. A. J.; Michailides, T. J. Sensitivities of baseline isolates and boscalid-resistant mutants of *Alternaria alternata* from pistachio to fluopyram, penthiopyrad, and fluxapyroxad. **Plant Disease**, v. 98, n. 2, p. 197-205, 2014.
- Avenot, H. F.; Luna, M.; Michailides, T. J. Phenotypic and molecular characterization of resistance to the SDHI fungicide fluopyram in populations of *Alternaria alternata* from pistachio orchards in California. **Crop Protection**, v. 124, p. 104838, 2019.
- 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.
- 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, p. 1089-1093. 2003.
- Bella, P.; Guarino, C.; La Rosa, R.; Catara, A. Severe infections of *Alternaria* spp. on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 231, 2001.
- 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**, n. 1, v. 2., p. 9, 2007
- Canihos, Y.; Erkilic, A.; Timmer, L. W. First report of *Alternaria* brown spot of *Minneola* tangelo in Turkey. **Plant Disease**, v. 81, n. 10, p. 1214-1214, 1997.

- Castro-Caicedo, B. L.; Leguizamón-Caycedo, J. E.; López-Ríos, J. A.; La mancha foliar de los cítricos en la zona cafetera. **Avances Técnicos Cenicafé**, v. 198, p. 26, 1994.
- CEAGESP. Tangerina. 2022. Disponível em: <<https://ceagesp.gov.br/hortiescolha/hortipedia/tangerina/>>. Acesso em: 02 mar. 2022.
- Centro de Citricultura Sylvio Moreira. O Centro de Citricultura em 2019: foco nos objetivos para o centenário. **Informativo Centro de Citricultura**, n. 295, p. 3, 2019.
- Chiarini, R. F.; Jacomino, A. P.; Arruda-Palharini, M. C. de; Silva, A. P. G. da; 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.
- Chitolina, G. de M. Caracterização da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da quinona externa. 2019. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.
- Chitolina, G. M.; Silva-Junior, G. J.; Feichtenberger, E.; Pereira, R. G.; Amorim, L. Distribution of *Alternaria alternata* isolates with resistance to quinone outside inhibitor (QoI) fungicides in Brazilian orchards of tangerines and their hybrids. **Crop Protection**, v. 141, p. 105493, 2021.
- Chung, K. R. Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. **Scientifica**, p. 1–17, 2012.
- Colturato, A. B.; Paulossi, T.; Venâncio, W. S.; Furtado, E. L. Efficiency and cost of chemical control of alternaria brown spot. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 210-215, 2009.

EMBRAPA. Produção brasileira de tangerina em 2018. 2019. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/tangerina/b1_tangerina.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2022.

FAOSTAT - The Food and Agriculture Organization. 2020. Disponível em:<<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> >. Acesso em: 04 fev. 2022.

Fan, Z.; Yang, J. H.; Fan, F.; Luo, C. X.; Schnabel, G. Fitness and competitive ability of *Alternaria alternata* field isolates with resistance to SDHI, QoI, and MBC fungicides. **Plant Disease**, v. 99, n. 12, p. 1744-1750, 2015.

Ferreira, E. A.; Moreira, S. I.; Perina, F. J.; Alves, E. Mancha-marrom-de-Alternaria em tangerineiras e seus híbridos: identificação e manejo. EPAMIG. **Circular Técnica**. 2016.

FRAC. Pathogen Risk List. 2019. Disponível em: <<https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2022.

FRAC. Classification of Fungicides. 2021. Disponível em:<https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-mode-of-action-poster/frac-moa-poster-2021.pdf?sfvrsn=a6f6499a_2>. Acesso em: 20 fev. 2022.

FRAC. Fungicide Resistance Management. 2022. Disponível em: <<https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/background>>. Acesso em: 12 fev. 2022.

Fundecitrus. Fungo causador da mancha marrom de alternaria resistente às estrobilurinas é encontrado em pomares paulistas. 2019. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/fungo-causador-da-mancha-marrom-de-alternaria-resistente-as-estrobilurinas-e-encontrado-em-pomares-paulistas/868#:~:text=A%20mancha%20marrom%20de%20alternaria,geralmente%20muito%20afetados%20pela%20doen%C3%A7a.>>>. Acesso em: 08 fev. 2022.

Gai, Y.; Liu, B.; Ma, H.; Chen, X.; Moenga, S.; Riely, B.; Fayyaz, A.; Wang, M.; Li, H. The methionine biosynthesis regulator AaMetR contributes to oxidative stress tolerance and virulence in *Alternaria alternata*. **Microbiological research**, v. 219, p. 94- 109, 2019.

Ghini, R.; Kimati, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 78, 2002.

Gene Codes Corporation. SEQUENCHER version 5.4.1 sequence analysis software. 2016. Disponível em: <<http://www.genecodes.com>>. Acesso em 20 nov. 2021.

Goes, A. de; Montes de Oca, A. G.; Reis, R. F. Ocorrência de la mancha de *Alternaria* en mandarina Dancy en el estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. Suppl., p. 386, 2001.

Hu, M. J.; Fernández-Ortuño, D.; Schnabel, G. Monitoring resistance to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea* from strawberry fields. **Plant Disease**, v. 100, n. 5, p. 959- 965, 2016.

Huang, F.; Fu, Y.; Nie, D.; Stewart, J. E.; Peever, T. L.; LI, H. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. **Fungal biology**, v. 119, n. 5, p. 320-330, 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal. 2022. Disponível em:<<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 05 fev. 2022.

IEA – Instituto de Economia Agrícola. A Cultura da Tangerina no Estado de São Paulo. 2014. Disponível em:<<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?%20codTexto=1356>>. Acesso em: 29 jun. 2020.

IEA – Instituto de Economia Agrícola. Estatísticas da Produção Paulista. 2020. Disponível

em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1>.

Acesso em: 04 fev. 2022.

Isla, L. H. La mancha parda de los cítricos en Cuba. Levante Agrícola: **Revista internacional de cítricos**, n. 317, p. 49-50, 1992.

Jeanmart, S.; Edmunds, A. J.; Lamberth, C.; Pouliot, M.; Morris, J. A. Synthetic approaches to the 2015–2018 new agrochemicals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 116162, 2021.

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

Klappach, K.; Stammler, G. Resistance of plant pathogens to succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicides (FRAC Code 7). In: Stevenson K. L.; McGrath M. T.; Wyenandt C. A. **Fungicide resistance in North America**. American Phytopathological Society, p. 85-95, 2019.

Leroux, P.; Gredt, M.; Leroch, M.; Walker, A. S. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6615-6630, 2010.

Li, L.; Ma, H.; Zheng, F.; Chen, Y.; Wang, M.; Jiao, C.; Li, H.; Gai, Y. The transcription regulator ACTR controls ACT-toxin biosynthesis and pathogenicity in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Microbiological Research**, v. 248, p. 126747, 2021.

Lucas, J. A.; Hawkins, N. J.; Fraaije, B. A. The evolution of fungicide resistance. **Advances in applied microbiology**, v. 90, p. 29-92, 2015.

- 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.
- Maienfisch, P.; Mangelinckx, S. Recent innovation in crop protection research. In: Recent Highlights in the Discovery and Optimization of Crop Protection Products. **Academic Press**, p. 1-23, 2021.
- Marín, J. E.; Fernández, H. S.; Peres, N. A.; Andrew, M.; Peever, T. L.; Timmer, L. W. First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. **Plant disease**, v. 90, n. 5, p. 686-686, 2006.
- Neves, D. L.; Bradley, C. A. Baseline sensitivity of *Cercospora zea-maydis* to pydiflumetofen, a new succinate dehydrogenase inhibitor fungicide. **Crop Protection**, v. 119, p. 177-179, 2019.
- Olaya, G.; Linley, R.; Edlebeck, K.; Harp, T. ADEPIDYN (TM) fungicide: Cross resistance patterns in *Alternaria solani*. In: **Phytopathology**. 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA: AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC, 2016. p. 12-12.
- Peres, N. A. R.; Agostini, J. P.; Timmer, L. W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, v. 87, n. 6, p. 750-750, 2003.
- Pio, R. M.; Azevedo, F. A. D.; Negri, J. D. D.; Figueiredo, J. O. D.; Castro, J. L. D. Características da variedade Fremont quando comparadas com as das tangerinas 'Ponkan' e 'Clementina Nules'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 222- 226, 2006.
- Reis, R. F., Goes, de A., Mondal, S. N., Shilts, T., Brentu, F. C., & Timmer, L. W. (2006). Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. **Plant disease**, v.90, n. 8, p. 1051-1054, 2006.

- Reis, R. F.; De Almeida, T. F.; Stuchi, E. S.; de Goes, A. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the Alternaria brown spot. **Scientia horticultrae**, v. 113, n. 4, p. 336-342, 2007.
- Russell, P. E. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Brussels, Belgium: **Crop Life International**, 2002.
- Santos Filho, H. P.; Laranjeira, F. F.; Oliveira, A. A. R. Mancha marrom de alternaria em tangerinas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. **Citros em foco**, 2009.
- Schutte, G. C.; Beefon, K. V. The use of triazoles to control Alternaria brown spot of Minneola tangelo in the winter rainfall region of South Africa. **Proceedings of the International Citrus Congress**, v. 7, p. 1070-1074, 1992.
- Sierotzki, H.; Scalliet, G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. **Phytopathology**, v. 103, p. 880-887, 2013.
- Silva, G. A. da; Landau, E. C. Evolução da produção de tangerina (*Citrus reticulata*, Rutaceae). **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2020.
- Solel, Z. Alternaria brown spot on Minneola tangelos in Israel. **Plant Pathology**, v. 40, n. 1, p. 145-147, 1991.
- Souza, M. C. de; Stuchi, E. S.; Goes, A. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. **Scientia Horticultrae**, v. 123, n. 1, p. 1-4, 2009.
- Stammler, G.; Wolf, A.; Glaetli, A.; Klappach, K. Respiration Inhibitors: Complex II. In: Ishii, H.; Hollomon, D. W. **Fungicide Resistance in Plant Pathogens**. Springer, p. 105-117, 2015.
- Stuart, R. M.; Bastianel, M.; Azevedo, F. A. de; Machado, M. A. Alternaria brown spot. **Citrus Research & Technology**, v. 30, n. 1-2, p. 29-44, 2009.

- Sun, F.; Huo, X.; Zhai, Y.; Wang, A.; Xu, J.; Su, D.; Bartlam, M.; Rao, Z. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. **Cell**, v. 121, n. 7, p. 1043-1057, 2005.
- Timmer, L. W.; Solel, Z.; Gottwald, T. R.; Ibanez, A. M.; Zitko, S. E. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. **Phytopathology**, v. 88, n. 11, p. 1218-1223, 1998.
- Timmer, L. W.; Peever, T. L.; Solel, Z. V. I.; Akimitsu, K. *Alternaria* diseases of citrus—Novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 42, n. 2, p. 99-112, 2003.
- Tonial, F.; Maia, B. H.; Sobottka, A. M.; Savi, D. C.; Vicente, V. A.; Gomes, R. R.; Glienke, C. Biological activity of *Diaporthe terebinthifolii* extracts against *Phyllosticta citricarpa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 5, 2017.
- Troncoso-Rojas, R.; Tiznado-Hernández, M. E. *Alternaria alternata* (black rot, black spot). In: **Postharvest decay**. Academic Press, p. 147-187. 2014.
- Vale, F.X.R.; Fernandes Filho, E.I.; Liberato, J.R. 2001. "QUANT - A software plant disease severity assessment" in **Proceedings** of 8th International Congress of Plant Pathology, Pathology. Christchurch: New Zealand.
- 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, 2014.
- Vega, B.; Dewdney, M. M. Sensitivity of *Alternaria alternata* from citrus to boscalid and polymorphism in iron-sulfur and in anchored membrane subunits of succinate dehydrogenase. **Plant disease**, v. 99, n. 2, p. 231-239, 2015.
- Veiga, J. C.; Barbará, M. A.; Silva, B. M. P.; Toledo Valentini, S. R.; Cristofani-Yaly, M.; Bron, I. U. Refrigeração e cera na conservação pós-colheita da tangerina IAC 2019Maria. **Citrus Research & Technology**, v.40, p. 1-9, 2019.

- Veloukas, T.; Karaoglanidis, G. S. Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. **Pest Management Science**, v. 68, n. 6, p. 858-864, 2013.
- Vicent, A.; Armengol, J.; Sales, R.; Garcia-Jimenez, J.; Alfaro-Lassala, F. First report of Alternaria brown spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, v. 84, n. 9, p. 1044-1044, 2000
- Wang, X. F.; Li, Z. A.; Tang, K. Z.; Zhou, C. Y.; Yi, L. First report of Alternaria brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Yunnan Province, China. **Plant Disease**, v. 94, n. 3, p. 375-375, 2010.
- Yang, J. H.; Brannen, P. M.; Schnabel, G. Resistance in *Alternaria alternata* to SDHI fungicides causes rare disease outbreak in peach orchards. **Plant disease**, v. 99, n. 1, p. 65-70, 2015.
- Yang, S. L.; Lin, C. H.; Chung, K. R. Coordinate control of oxidative stress tolerance, vegetative growth, and fungal pathogenicity via the AP1 pathway in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 2, p. 100-110, 2009.

ANEXOS

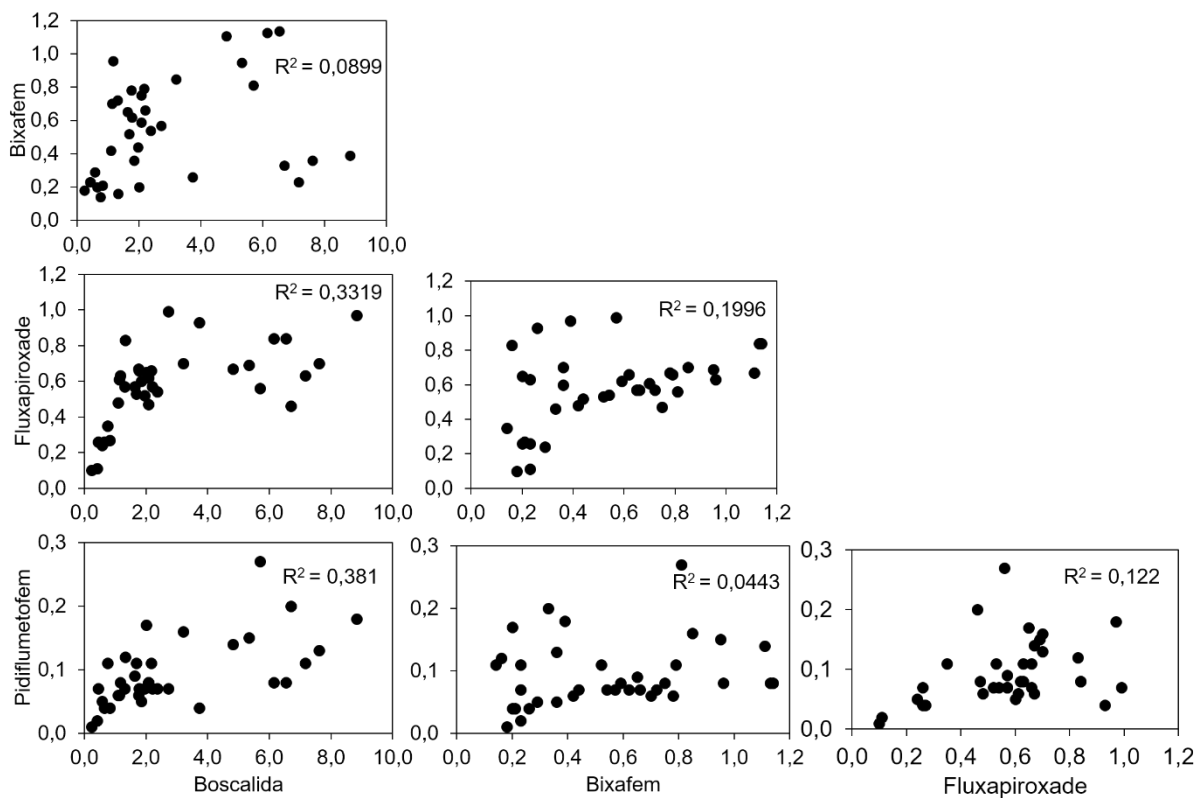
ANEXO A. Média do tamanho do tubo germinativo de conídios dos isolados LRS 15/03 e LRS 41/03 de *Alternaria alternata* para diferentes concentrações dos ingredientes ativos boscalida, bixafem, fluxapiraxade e pidiflumetofem. Erro padrão das médias estão apresentados entre parênteses.

Isolado	Tamanho do tubo germinativo (μm)						
	Concentração de ingrediente ativo ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)						
	0	0,001	0,01	0,1	1	10	100
Boscalida							
LRS 15/03	548,3 ($\pm 44,8$)	540,1 ($\pm 39,6$)	455,4 ($\pm 32,4$)	287,1 ($\pm 24,5$)	153,1 ($\pm 12,3$)	106,8 ($\pm 12,0$)	70,6 ($\pm 8,8$)
LRS 41/03	478,4 ($\pm 27,7$)	477,3 ($\pm 36,1$)	473,0 ($\pm 31,2$)	163,1 ($\pm 14,7$)	109,6 ($\pm 12,4$)	82,9 ($\pm 7,3$)	61,1 ($\pm 6,2$)
Bixafem							
LRS 15/03	649,7 ($\pm 31,7$)	489,7 ($\pm 44,9$)	307,9 ($\pm 31,1$)	220,2 ($\pm 21,5$)	135,5 ($\pm 15,7$)	107,7 ($\pm 10,8$)	- ^a
LRS 41/03	551,7 ($\pm 33,0$)	452,5 ($\pm 33,5$)	198,9 ($\pm 19,6$)	120,6 ($\pm 10,4$)	99,5 ($\pm 10,1$)	64,3 ($\pm 4,8$)	-
Fluxapiraxade							
LRS 15/03	676,0 ($\pm 62,9$)	548,1 ($\pm 58,8$)	370,2 ($\pm 50,7$)	183,8 ($\pm 23,1$)	151,8 ($\pm 12,0$)	111,5 ($\pm 16,7$)	-
LRS 41/03	549,8 ($\pm 44,3$)	511,8 ($\pm 33,4$)	250,5 ($\pm 19,9$)	148,5 ($\pm 14,4$)	70,9 ($\pm 2,6$)	63,8 ($\pm 3,9$)	-
Pidiflumetofem							
LRS 15/03	623,7 ($\pm 47,1$)	405,3 ($\pm 52,1$)	184,6 ($\pm 19,5$)	167,7 ($\pm 17,4$)	111,6 ($\pm 17,4$)	118,0 ($\pm 16,4$)	-
LRS 41/03	592,3 ($\pm 48,0$)	358,9 ($\pm 65,3$)	165,2 ($\pm 16,1$)	127,3 ($\pm 12,6$)	65,3 ($\pm 7,3$)	65,9 ($\pm 7,5$)	-

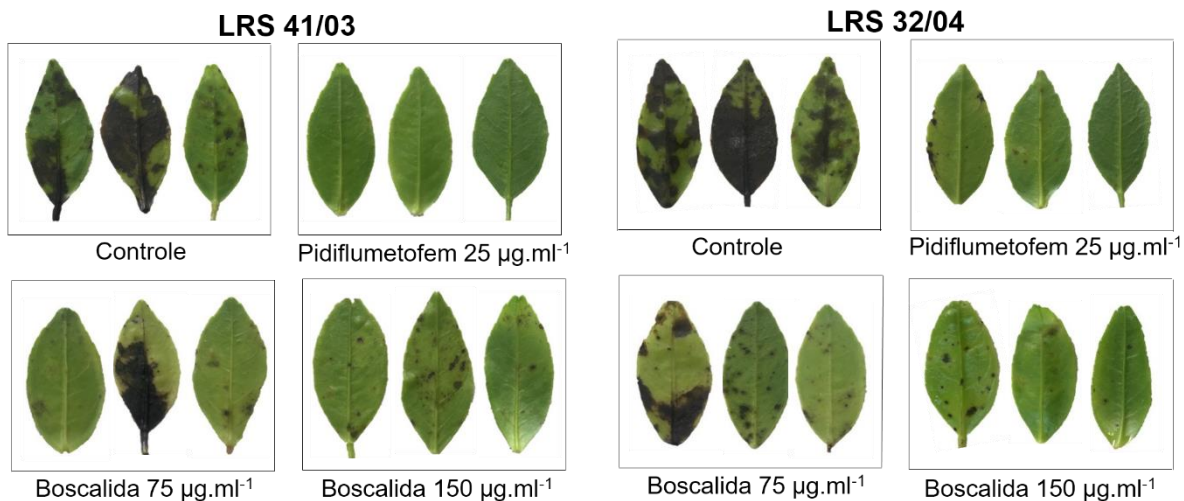
^a traços indicam ausência de germinação.

ANEXO B. Código de acesso no GenBank da sequência de DNA das subunidades SDHB, SDHC e SDHD utilizados para identificação de pontos de mutações para 7 isolados de *Alternaria alternata*.

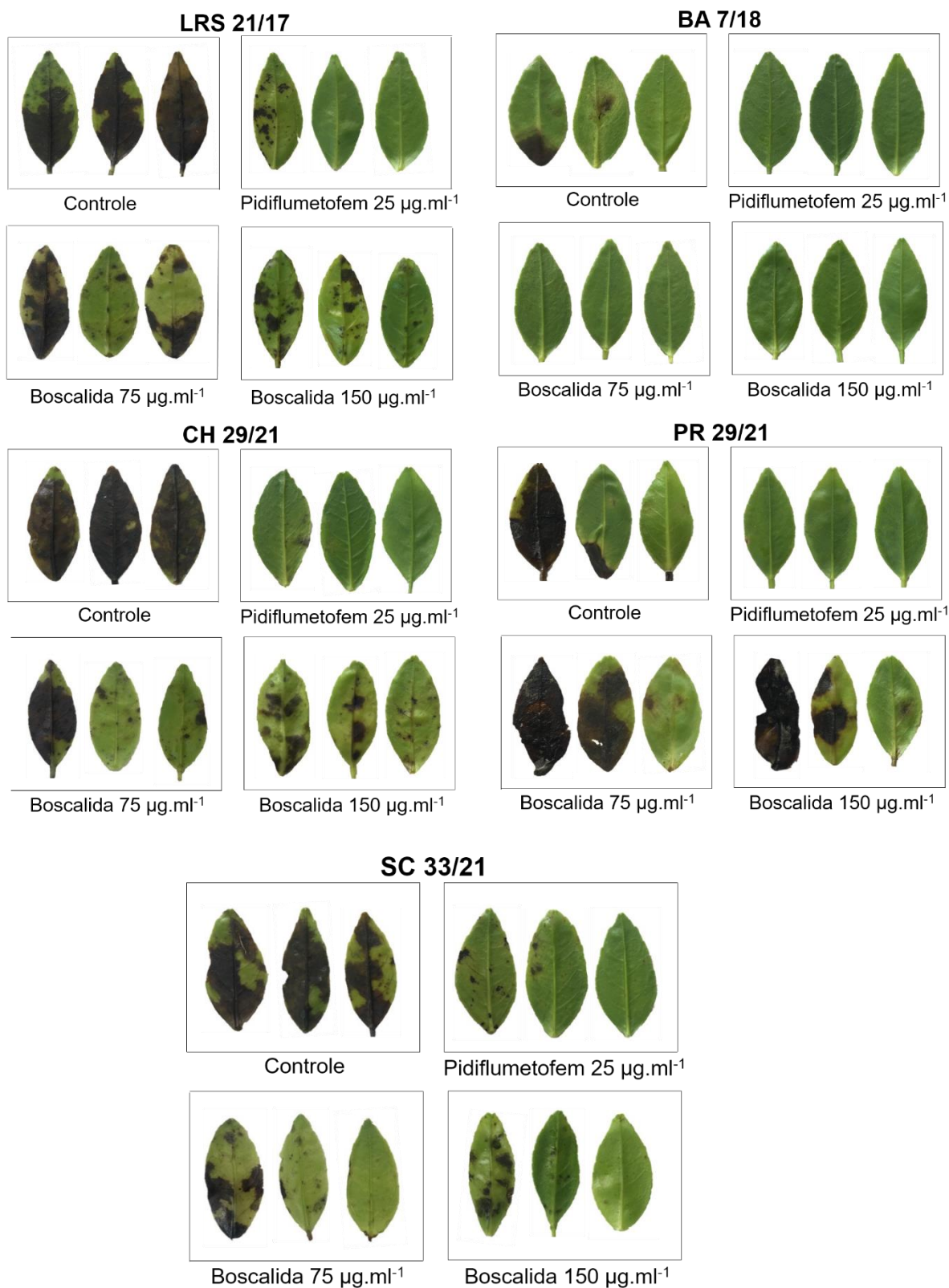
Isolados	Número de acesso no GenBank		
	Subunidades		
	SDHB	SDHC	SDHD
LRS 41/03	OM047189	OL632014	OM047196
LRS 32/04	OM047190	OL632015	OM047197
LRS 21/17	OM047191	OL632016	OM047198
BA 7/18	OM047195	OL632020	OM047202
CH 29/21	OM047192	OL632017	OM047199
PR 29/21	OM047193	OL632018	OM047200
SC 33/21	OM047194	OL632019	OM047201



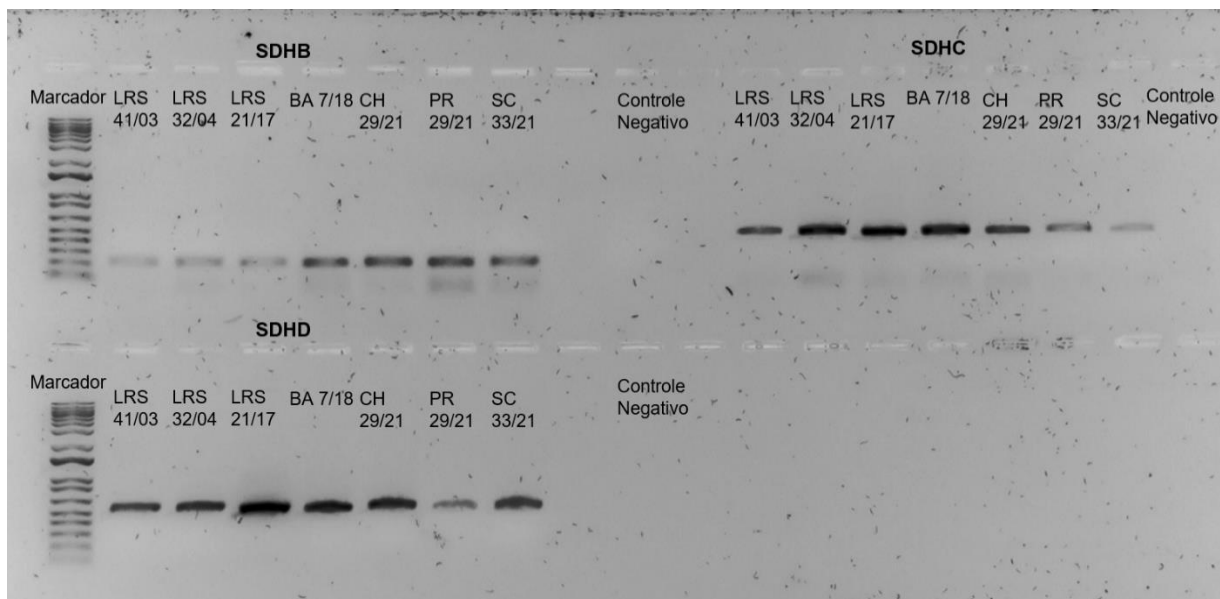
ANEXO C. Relação entre os valores da CE_{50} dos fungicidas bixafem, boscalida, fluxapiraxade e pidiflumetofem.



ANEXO D. Resultado das folhas de tangerinas sem ou com fungicidas inoculadas com diferentes isolados de *Alternaria alternata* para o teste de resistência prática.



ANEXO D (Continuação). Resultado das folhas de tangerinas sem ou com fungicidas inoculadas com diferentes isolados de *Alternaria alternata* para o teste de resistência prática.



ANEXO E. Qualidade dos produtos da PCR de sete isolados de *Alteraria alternata*. Bandas destacadas referem-se às regiões amplificadas, para que após sequenciadas, essas regiões possam ser comparadas com sequências de isolados selvagens para identificação de pontos de mutações nas subunidade SDHB, SDHC e SDHD.