



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
*PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

## **Dissertação de Mestrado**

# **Sensibilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* a ditiocarbamato, estrobilurina e triazol**

**Andreza Verônica de Souza Silva**

**Recife – PE  
2022**

**ANDREZA VERÔNICA DE SOUZA SILVA**

**Sensibilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* a  
ditiocarbamato, estrobilurina e triazol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador(a): Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara

Coorientador(a): Willie Anderson dos Santos Vieira

**RECIFE-PE  
FEV - 2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S586s

Silva, Andreza Verônica de Souza

Sensibilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* a ditiocarbamato, estrobilurina e triazol / Andreza Verônica de Souza Silva. - 2022.

47 f.

Orientador: Marcos Paz Saraiva Camara.

Coorientador: Willie Anderson dos Santos Vieira.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2022.

1. Alternariose. 2. Brassica oleracea. 3. brássicas. 4. fungicidas. I. Camara, Marcos Paz Saraiva, orient. II. Vieira, Willie Anderson dos Santos, coorient. III. Título

CDD 632

---

**Sensibilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* a  
ditiocarbamato, estrobilurina e triazol**

**Andreza Verônica de Souza Silva**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 23/02/2022

**ORIENTADOR(A):**

---

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

**EXAMINADORES:**

---

Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

---

Dr.<sup>a</sup>. Josiene Silva Veloso (UFRPE)

**RECIFE-PE**  
**Fevereiro – 2022**

*“Seja forte e corajoso! Não tenha medo nem desanime, pois o Senhor, seu Deus, estará com você por onde você andar”*

**Josué 1.9**

*Aos meus primeiros e grandes apoiadores,  
meus pais Maria e Expedito  
e a todos os familiares e amigos.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu porto seguro.

Aos meus pais, irmãos e familiares por todo o apoio imensurável.

Ao meu amado companheiro Gilmar, por todo amor e carinho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco por sediar o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Aos professores do PPGF em Fitopatologia, por todos os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado.

Ao professor Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara por todos os ensinamentos repassados, e pela oportunidade de ser sua orientada.

Ao Pós Doutorando Willie Vieira, por todos os ensinamentos teóricos e práticos para a elaboração e execução deste trabalho.

Aos funcionários do PPGF, Romildo por sanar todas as dúvidas. A Mirleide e Glaucia por todas as palavras em momentos difíceis.

Ao laboratório de Micologia por toda a estadia e disponibilidade de equipamentos e infraestrutura. E aos colegas de laboratório Gabriele, Ingrid, Athaise, Anthony por todos os momentos de trabalho.

Aos meus colegas do LIAFT, Tatiane, Ana Flavia, Thais, Walisson, Dionísio, Bruno, Roselane, Carlos, Pedro, David, Marcelo, Larissa e Rodolfo, por todo o companheirismo e aprendizado.

Aos queridos professores Jandiê, Arnoldo, Vivian, Dora e Rafael que me auxiliaram em minha estadia e adaptação em Recife. Aos pastores Fredson e Pastora Veronica por todas as palavras de conforto e carinho, além de todos os irmãos da igreja.

A Dina e família, por todo o apoio e carinho.

A Edinalda e Jemima por serem companheiras ao longo dessa jornada, por toda a paciência e horas de conversa.

A Talia, Jaqueline e Irlan pela amizade e me apoiarem mesmo a distância.

A Rayra e Gienah por não me deixarem desanimar e me impulsionarem a prosseguir.

E a todos que não citei, meu MUITO OBRIGADA!

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	7
GENERAL ABSTRACT .....	8
<b>Capítulo I.....</b>	<b>9</b>
Introdução Geral .....	10
1.Brássicas e Importância Econômica .....	10
2.A mancha de Alternária.....	12
3.Medidas Gerais de Controle da Alternariose .....	13
4.Controle químico .....	14
5.Resistência a fungicidas .....	17
<b>Capítulo II .....</b>	<b>25</b>
Resumo .....	27
Introdução.....	28
Materiais e Métodos .....	29
Resultados.....	33
Discussão.....	35
Agradecimentos .....	37
Referencias Bibliograficas.....	37
<b>Capítulo III.....</b>	<b>46</b>
Conclusões Gerais .....	47

## RESUMO GERAL

A Mancha de *Alternaria* é uma das doenças predominante na cultura das brássicas, provocada por várias espécies de *Alternaria*, sendo a *A. brassicicola* a espécie presente nos cultivos de couve no Brasil. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade *in vitro* e *in vivo* de *A. brassicicola* a ditiocarbamato (mancozebe), estrobilurina (azoxistrobina) e triazol (difeconazole), bem como os componentes de adaptabilidade deles. Um total de trinta isolados de *A. brassicicola* provenientes de áreas produtoras do Brasil foram utilizados para a obtenção da sensibilidade *in vitro*. A sensibilidade *in vitro* dos isolados foi avaliada, a partir da estimativa da concentração capaz de inibir 50% do crescimento micelial (CE<sub>50</sub>). Seis isolados foram classificados em sensíveis com CE<sub>50</sub> variando de 153,5 a 383,3 µg.mL<sup>-1</sup> para mancozebe, de 6,5 a 9,4 µg.mL<sup>-1</sup> para azoxistrobina e de 3,6 a 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> para difeconazole, e seis isolados em não sensíveis com CE<sub>50</sub> para mancozebe acima de 500 µg.mL<sup>-1</sup>, para azoxistrobina >10,2 µg.mL<sup>-1</sup> e difeconazole >5,1 µg.mL<sup>-1</sup>. Doze isolados foram utilizados nos ensaios de sensibilidade *in vivo*, e foi avaliada através diâmetro da lesão das plantas de couve utilizando doses comerciais de mancozebe, azoxistrobina e difeconazole. Os doze isolados selecionados no teste *in vitro* em sensíveis e não sensíveis foram comparados quanto ao crescimento micelial, a produção de conídios, a germinação de conídios e a virulência. A maioria dos isolados testados *in vitro* foram sensíveis aos fungicidas. Todas as plantas não tratadas com fungicidas e inoculadas com os isolados sensíveis apresentaram sintomas típicos da Alternariose. O percentual de inibição de crescimento micelial variou entre os isolados sensíveis e não sensíveis de *A. brassicicola*. Observa-se diferença entre os fungicidas, como o difeconazole, que apresentou 80,85% de inibição do diâmetro da lesão para isolados sensíveis e 87,14% para isolados não sensíveis. Houve diferença estatística na taxa de crescimento micelial para o princípio ativo mancozebe, na produção de conídios e virulência para azoxistrobina. Os resultados indicam a presença de indivíduos sensíveis e não sensíveis nas áreas produtoras, com boas características de adaptabilidade, mostrando a necessidade de adoção de medidas de controle mais eficientes e estratégicas para o monitoramento de populações não sensíveis.

**Palavras-chaves:** Alternariose, *Brassica oleracea*, brássicas, fungicidas.

## GENERAL ABSTRACT

*Alternaria* leaf spot is one of the predominant diseases in brassica crops, caused by several species of *Alternaria*, with *A. brassicicola* being the species present in cabbage crops in Brazil. The present work aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* sensitivity of *A. brassicicola* to dithiocarbamate (mancozeb), strobilurin (azoxystrobin) and triazole (difeconazole), as well as their adaptability components. A total of thirty *A. brassicicola* isolates from producing areas in Brazil were used to obtain *in vitro* sensitivity. The *in vitro* sensitivity of the isolates was evaluated by estimating the concentration capable of inhibiting 50% of mycelial growth (EC50). Six isolates were classified as sensitive with EC50 ranging from 153.5 to 383.3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for mancozeb, from 6.5 to 9.4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for azoxystrobin and from 3.6 to 5.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for difeconazole, and six isolates in non-susceptible strains with EC50 for mancozeb above 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , for azoxystrobin  $>10.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and difeconazole  $>5.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Twelve isolates were used in the *in vivo* susceptibility assays, and the lesion diameter of cabbage plants was evaluated using commercial doses of mancozeb, azoxystrobin and difeconazole. The twelve isolates selected in the *in vitro* test in sensitive and non-sensitive were compared in terms of mycelial growth, conidia production, conidia germination and virulence. Most isolates tested *in vitro* were sensitive to fungicides. All plants not treated with fungicides and inoculated with susceptible isolates showed typical symptoms of Alternariose. The percentage of inhibition of mycelial growth varied between sensitive and non-sensitive isolates of *A. brassicicola*. There is a difference between fungicides, such as difeconazole, which showed 80.85% inhibition of lesion diameter for sensitive isolates and 87.14% for non-sensitive isolates. There was a statistical difference in the mycelial growth rate for the active ingredient mancozeb, in the production of conidia and virulence for azoxystrobin. The results indicate the presence of sensitive and non-sensitive individuals in producing areas, with good adaptability characteristics, showing the need to adopt more efficient and strategic control measures for monitoring non-sensitive populations.

**Keywords:** Alternariose, *Brassica oleracea*, brassicas, fungicides

## **CAPÍTULO I**

### **Introdução Geral**

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Brássicas e Importância Econômica

A família Brassicaceae (Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida) compreende o maior número de culturas oleráceas de grande importância econômica, que se distribuem entre hortaliças, herbáceas e tuberosas, compondo-se de várias espécies vegetais distintas (ARAÚJO, 2019). As brássicas são encontradas na maior parte do mundo, principalmente na região temperada do hemisfério norte e nos países ao redor da bacia do Mediterrâneo e no Sudoeste e centro da Ásia (WARWICK, 2011; ZYLA; FIDLER; BABULA-SKOWRONSKA, 2021). Esta família tem 372 gêneros vegetais, e 15.710 espécies classificadas (THE PLANT LIST, 2022).

A família Brassicaceae pode ser identificada através do androceu. Esta estrutura, frequentemente apresenta seis estames tetradínamos, podendo ou não ser numerosos. A inflorescência, na maioria das espécies, é constituída por flores pedunculadas e perianto tetrâmero, ou seja, cálice e corola com quatro peças dispostas em forma de cruz, o que justifica o nome antigo da família (Cruciferae). O fruto é do tipo síliqua, deiscentes ou aquênios (MOREIRA; BRAGANÇA, 2011).

A produção mundial de brássicas em 2017 foi de aproximadamente 97,4 milhões de toneladas, sendo China e Índia os maiores produtores mundiais (FAO, 2019). O Brasil nesse mesmo período produziu 82,6 mil toneladas (HORTIFRUTI, 2019). No ano de 2017 as brássicas como brócolis, couve, couve-flor e repolho, obtiveram produção significativa, entre elas o repolho com 467.622 toneladas em São Paulo, seguido por couve com 161.986 t, e couve-flor em uma colheita de 140.067 t, levando ainda em consideração a produção de brócolis no Rio Grande do Sul com 150.017 t (IBGE, 2017).

As brássicas apresentam níveis elevados de proteínas, carboidratos, fibras, cálcio, ferro, vitamina A, niacina (vitamina B3) e vitamina C quando comparado com outras hortaliças folhosas (MAYNARD; HOCHMUTH, 2007). Além disso, possuem uma excelente fonte de carotenoides, componentes com propriedades importantes para a saúde humana (LEFSRUD et al., 2007). Devido a suas propriedades nutracêuticas o consumo de brássicas tem aumentado no Brasil (NOVO et al., 2010).

Dentre as principais variedades relevantes na economia do Brasil, estão a couve-manteiga, a couve-flor, o repolho e o brócolis (DIXON, 2007).

A couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) está entre os principais vegetais

cultivados em todo mundo (RIGUEIRA et al., 2016). Sua produção e consumo tem aumentado devido as suas propriedades nutricionais e medicinais, além de ser fonte de vitaminas A, C e niacina, proteínas, carboidratos, fibras, cálcio, ferro e iodo (TRANI et al., 2015).

O brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) também obteve um potencial aumento no consumo e crescimento no agronegócio, a razão é a utilização na culinária, suas propriedades nutricionais que trazem benefícios a saúde (SOUZA et al., 2022), é fonte de cálcio, ferro, fósforo, fibras e vitaminas A e C (SILVA; CHALCO, 2017).

De acordo com IBGE (2017), o maior produtor de couve-flor foi Tuiuti – SP com 36.338 toneladas produzidas. A couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) possui importância econômica entre as brássicas por sua inflorescência imatura comercializável, principalmente para agricultura familiar por ser uma cultura comum e bastante lucrativa para mão de obra (OLIVEIRA et al., 2018). Assim como o brócolis é uma hortaliça rica em cálcio e fósforo, além de fonte de folato e vitamina C (SILVA; CHALCO, 2017).

No Brasil, o repolho é uma cultura de fácil produção e conservação pós-colheita, sendo a espécie mais importante no grupo das brássicas (ALVES et al., 2021). O repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) é uma hortaliça nutritiva rica em cálcio e vitamina C (PERIN et al., 2015), conhecida por suas várias camadas de folhas arredondadas de cheiro característico sobrepostas que formam uma cabeça, a qual é a parte comestível (MOREIRA; VIDIGAL, 2015). Segundo Fontes e Nick (2019), o setor de maior importância na produção hortícola se concentra nas regiões Sul e Sudeste. Dentre as hortaliças, a produção do cultivo de repolho está entre as maiores no Brasil com aproximadamente 467 mil toneladas (IBGE, 2017).

A maioria das áreas de cultivos dessa família derivam da propagação vegetativa, que é um fator influenciador para o crescimento das doenças de plantas, levando isto em consideração, algumas empresas produtoras de sementes têm procurado desenvolver materiais híbridos, entretanto, muitas vezes, essas cultivares não apresentam as características exigidas pelo consumidor, como tamanho, coloração, sabor e crocância. Apesar da grande adaptação às condições edafoclimáticas, as brássicas, apresentam uma baixa produtividade, atribuídas, dentre outros fatores, à ocorrência de doenças (FILGUEIRA, 2013; MOREIRA, 2008; IPA/CEAGEPE/EMATER-PE, 1997).

Destacam-se como as principais doenças das brássicas: a hérnia-das-crucíferas (*Plasmodiophora brassicae*); a podridão-negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*); a podridão-mole (*Pectobacterium carotovorum*); o nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), e a alternariose (*Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire, *A. brassicae* e *A. alternata*), caracterizados como agentes que provocam diferentes sintomas que promovem perdas

significativas na produtividade, através da redução na fotossíntese e pelo apodrecimento dos tecidos das plantas (MARINGONI, 2005; FILGUEIRA, 2013; REIS, 2010).

## 2. A mancha de alternaria

A mancha-de-alternaria ou alternariose, causada por espécies de *Alternaria*, é considerada a doença fúngica mais comum e com alto potencial destrutivo nas brássicas (MARINGONI, 2005; MEHTA et al., 2005). Essa doença pode aumentar a redução prematura da área foliar, a queda de vigor das plantas, danos nas folhas e caule, bem como a redução do ciclo e do potencial de produção das brássicas (TOFOLI et al., 2015).

A alternariose é favorecida por temperaturas elevadas entre 23 à 30 °C e alta umidade relativa. Para que ocorra a infecção há necessidade de, pelo menos, nove horas de molhamento foliar. A disseminação dos agentes causais pode ocorrer através de sementes infectadas, mudas doentes e pelo vento. Esses ainda podem sobreviver em restos culturais, em hospedeiras alternativas e plantas voluntárias (PERUCH et al., 2006).

Os sintomas aparecem entre dois e 15 dias após a infecção, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro e das condições ambientais (SAHARAN et al, 2005). Na Inglaterra, as maiores capturas de conídios de *A. brassicicola* ocorrem após um período de chuva ou de molhamento foliar prolongado, com duração superior a 3 horas e temperatura acima de 13° C (ROTEM, 1994).

A germinação dos conídios é favorecida pela umidade, que varia de 40 a 95%, geralmente provocada pelas chuvas, irrigação e orvalho. Essa presença de água na superfície foliar contribui no desenvolvimento do tubo germinativo, infecção e produção de conídios do fungo. A produção de conídios ocorre em temperaturas variando de 14 a 26°C (TOFOLI et al., 2015).

Esse patógeno pode sobreviver em diversas plantas hospedeiras, no solo, máquinas e implementos agrícolas, materiais propagativos e ferramentas utilizadas no manejo de diversos cultivos (AGRIOS, 2005). Geralmente, os conídios deste gênero possuem alta resistência em níveis de umidade baixos, indicando a viabilidade prolongada destes conídios (TOFOLI et al., 2015).

A disseminação destes conídios ocorre através da água, ventos, insetos, equipamentos, pessoas, e animais que entraram em contato com materiais contendo estruturas do fungo. Estes conídios infectam e penetram rapidamente na superfície foliar, após essa fase, os fungos colonizam intercelularmente o hospedeiro provocando as alterações nos processos fisiológicos,

e causando o aparecimento de sintomas (TOFOLI et al., 2015).

Os fungos *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. raphani*, *A. alternata*, *A. brassicifolli* e *A. broccoli-italicae* são comumente encontrados no cultivo de brássicas. *Alternaria brassicae* induzem sintomas em forma de lesões arredondadas de coloração marrom, com formação de zonas ou anéis concêntricos (TOFOLI et al.,2015). Em infecções mais severas, as lesões coalescem e as folhas amarelam e secam. Ao passo que as infecções primárias causadas por *A. brassicae* são menos invasivas, enquanto as infecções secundárias podem ser ocasionadas por *A. brassicicola* (RAJARAMMOHAN, 2019). *A. brassicicola*, causa necroses nos cotilédones durante fase de produção de mudas, e como consequência ocorrer a queda de vigor e tombamento (“damping-off”) generalizado de mudas. Em plantas adultas os sintomas são caracterizados por lesões circulares ou ovaladas, com tamanho variável, sendo essas facilmente identificadas pela presença de anéis concêntricos e halos amarelados ao redor das mesmas. Ataques severos podem ocasionar intensa desfolha e lesões necróticas no caule e nas inflorescências, em ambas alternarias (TOFOLI et al.,2015).

### **3. Medidas gerais de controle da alternariose**

O manejo integrado de doenças consiste na utilização de táticas disponíveis para manter a população de patógenos abaixo do nível de dano econômico, possibilitando, minimizar os efeitos deletérios ao meio ambiente (AMORIM et al., 2011). Dentre as estratégias de manejo utilizadas, destaca-se a eliminação dos restos culturais infectados após a colheita das plantas, rotação de culturas durante dois a três anos com plantas não hospedeiras, sementes saudáveis e o controle químico (MARINGONI, 2005; VERMA; SAHARAN, 1994; MARINGONI, 2005; KOIKE; GLADDERS; PAULUS, 2006).

A utilização de cultivares resistentes é considerada uma das melhores alternativas no controle de doenças de plantas, uma vez que proporciona facilidade de emprego, economicidade e menor impacto ambiental. No entanto, todas as cultivares comerciais de brássicas são essencialmente suscetíveis ao patógeno (RODRIGUES et al., 2004; SAHARAN; MEHTA; SANGWAN, 2005; DIXON, 2007; TEWARI, 2007).

No sistema de produção convencional, o controle da alternariose baseia-se, principalmente, em pulverizações de fungicidas, sejam elas preventivas ou após o aparecimento dos primeiros sintomas (STUART et al., 2017). Entretanto, existem relatos da crescente detecção de isolados de *A. brassicicola* resistentes a vários grupos de fungicidas em decorrência do uso intensivo de fungicidas (HUANG; LEVY, 1995). Além disso, o uso intensivo de

agroquímicos para o controle de doenças em culturas de importância econômica tem promovido diversos problemas ambientais, tais como: contaminação da água, alimentos, solo e, intoxicação dos homens e animais (MORANDI; BETTIOL, 2009), sendo necessária a adoção de práticas integradas de manejo para o controle efetivo da doença. Dentre as alternativas existentes para reduzir o uso de agroquímicos no manejo de doenças, o controle biológico é um dos mais estudados (MORANDI; BETTIOL, 2009).

No Brasil, o controle químico tem sido realizado principalmente com fungicidas à base de tebuconazol, difeconazole, iprodione, e algumas estrobilurinas como azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina (NOSSLLALA, 2016). Em alguns estados do País, o controle da alternariose baseia-se em pulverizações preventivas ou após o aparecimento dos primeiros sintomas, com fungicidas a base de clorotalonil, mancozebe ou oxicloreto de cobre (STUART et al., 2017).

## **5. Controle Químico**

A aplicação de fungicidas na parte aérea visa prevenir a infecção do hospedeiro ou paralisar a colonização que já tenha se estabelecido e, além destes, visa à redução de fontes de inóculo. O controle deve levar em conta todos os patossistemas na cultura além do estágio fenológico da cultura afetada, os danos causados pelo agente causal, o custo da aplicação do controle químico e o espectro de ação do fungicida (REIS; REIS; CARMONA, 2010).

Os fungicidas são classificados quanto a mobilidade, função, espectro de ação, natureza química e modo de ação. Quanto a mobilidade nas plantas, são de contato, conhecidos como protetores, quando permanecem na superfície foliar das plantas. E sistêmicos ou penetrantes quando absorvidos pelas folhas (ZAMBOLIM; VENANCIO; OLIVEIRA, 2007).

Quanto a função, podem ser preventivos, quando atuam por contato nas folhas, como os fungicidas de contato, e podem ser curativos, quando possuem a capacidade de penetrar nas plantas, afetando as estruturas do fungo mesmo após a infecção, como os fungicidas sistêmicos, que possuem as duas funções tanto preventiva, como a curativa (FRAC, 2016).

Quanto ao espectro de ação, podem atuar como inibidores de vários processos metabólicos vitais (multisítios), ou ter ação específica sobre a célula fúngica (sítio específico) (BESTOR; ROBERTSON; MUELLER, 2011; FRAC, 2016). Estes processos incluem a inibição da biossíntese de esteróis, síntese de ácidos nucleicos, inibição da mitose e divisão celular, inibição da síntese de proteínas e aminoácidos, e inibição da respiração (ZAMBOLIM; VENANCIO; OLIVEIRA, 2007).

Os fungicidas que apresentam interferência generalizada nas funções celulares ou atividade multisítio, provocam ação múltipla dos compostos em diferentes grupos enzimáticos e metabólitos vitais. Os fungicidas mais comumente utilizados são mancozebe (ditiocarbamatos), clorotalonil (cloronitrilas), cúpricos e sulfurados. São classificados como baixo risco para desenvolvimento de resistência, devido aos múltiplos sítios de atuação (FRAC, 2016; RODRIGUES, 2006).

Quanto à natureza química apresentam-se como inorgânicos, quando não possuem moléculas de carbono, como o cobre, e o enxofre. E orgânicos, quando possuem moléculas de carbono em sua estrutura (BESTOR; ROBERTSON; MUELLER, 2011).

Quanto ao modo de ação os fungicidas classificam-se em protetores (ação de contato); de contato (ação erradicante); sistêmicos (ação sistêmica e erradicante) e penetrante (ação de profundidade). No Brasil, utiliza-se para o controle da alternariose, fungicidas com os seguintes princípios ativos: mancozebe (grupo dos ditiocarbamatos), azoxistrobina (estrobilurinas); difeconazole (triazóis), fluxapiraxade (carboxamida), sendo estes também registrados para o controle do gênero *Alternaria* em diversas culturas (MAPA, 2008).

Os ditiocarbamatos, fungicidas de contato multisítios, possuem amplo espectro de ação, interferindo em vários sítios metabólicos do fungo. São efetivos quando aplicados de forma preventiva, antes da penetração do patógeno no hospedeiro, reduzindo a ocorrência da doença. Quando aplicados sob a superfície foliar atuam como barreira, impedindo a germinação dos conídios e do tubo germinativo. Os fungicidas pertencentes aos ditiocarbamatos, ao entrar em contato com o fungo, promovem alterações no processo enzimático dos fungos, afetando em seis locais da célula, núcleo, retículo endoplasmático liso e rugoso, membrana plasmática, mitocôndria e ribossomos (GULLINO, 2010). O princípio ativo mancozebe inativa os grupos de sulfídricos de aminoácidos e enzimas na célula do fungo, provocando a desorganização na respiração, produção de adenosinas trifosfato e no metabolismo de lipídios do patógeno. Os principais fungicidas são o mancozebe, o propinebe, o thiram (EHR; KEMMITT, 2002; REIS; REIS; CARMONA, 2010; TOFOLI, 2011).

As estrobilurinas atuam na inibição da respiração mitocondrial, agindo sobre a quinona oxidase (Inibidores da Quinona oxidase-QoIs). Esses fungicidas bloqueiam a transferência de elétron entre o citocromo *b* e *c* se ligando ao sítio da quinona oxidase pertencente ao complexo enzimático da mitocôndria *bc*, componente da cadeia transportadora de elétrons. Os ingredientes ativos do grupo químico estrobilurina mais comuns são a azoxistrobina, cresoxim metílico, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina (FRAC, 2016; PEREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009; REIS; REIS; CARMONA, 2010).

Os triazóis, fungicidas sistêmicos, possuem ampla utilização na agricultura, com atuação na inibição da biossíntese do ergosterol na membrana celular. Com a aplicação de fungicidas pertencentes a este grupo, há uma redução ou interrupção na disponibilidade de ergosterol na membrana celular, ocasionando o rompimento da membrana e extravasamento de solutos iônicos (ZAMBOLIM; VENANCIO; OLIVEIRA, 2007). Possuem função preventiva, quando aplicados na superfície foliar entram em contato com os conídios e função curativa quando atuam na inibição do crescimento micelial (PEREIRA et al., 2009).

A desmetilação do Ergosterol ocorre quando é realizada a ligação do fungicida ao sítio alvo, na posição C-14, onde é catalisada pelo citocromo P-450 (enzima esterol-C-14 demetilase). O processo biossintético de formação de esteróis continua, porém em vez de se formar ergosterol e outros esteróis demetilados, formam-se compostos metilados. Os esteróis metilados cumprem algumas funções na constituição das membranas, mas não conseguem executar outras funções específicas, o que leva a um desequilíbrio entre os lipídios das membranas, com inibição de fosfolipídios e acúmulo de ácidos graxos livres, que chegam a ser níveis tóxicos para os fungos. A falta de ações específicas dos esteróis demetilados, mais o desequilíbrio lipídico, levam os fungos à morte (ZAMBOLIM; VENANCIO; OLIVEIRA, 2007).

Os ingredientes ativos do grupo químico triazol mais comuns são os difeconazole, propiconazol, protioconazol, tebuconazol e ciproconazol (FRAC, 2016; REIS; REIS; CARMONA, 2010; WISE et al., 2009).

As carboxamidas são inibidores da succinato desidrogenase – SDHs, e atuam diretamente na inibição da respiração do fungo. Estes fungicidas possuem ação específica na infecção, inibindo a formação do tubo germinativo, a produção de conídios, e a germinação, na formação de apressórios, e impedindo o crescimento micelial do fungo. Essas características lhe conferem ação sistêmica e protetora (TOFOLI, 2011). Alguns ingredientes ativos que pertencem a este grupo são fluxapiraxade, boscalida e fluopiram (FRAC, 2016).

Para a Mancha de Alternaria, o controle químico tem sido a medida mais viável e mais rápida, entretanto, os insucessos no controle químico são atribuídos ao fato da perda de sensibilidade do fungo, pois esse controle é empregado em grande escala e em diferentes condições edafoclimáticas. Existem inúmeras causas que podem estar relacionadas a este insucesso do controle a campo, como por exemplo, a diagnose incorreta do agente causal, o local de plantio, o clima favorável ao aparecimento de doenças, a espécie da planta, a aplicação de fungicidas inadequada (PEREIRA et al., 2009).

## 6. Resistência a Fungicidas

A resistência a fungicidas é uma característica herdável e estável, resultando em uma seleção de mutações nas populações dos fungos (FRAC, 2016). Este conceito é utilizado para as populações de fungos, que por meio de mecanismos bioquímicos e moleculares, sofreram mutações genéticas que reduzem a sensibilidade aos fungicidas (PEREIRA et al, 2009). A resistência no patógeno, pode afetar a eficiência de uma determinada dose de fungicida, que antes controlava a doença (FRAC, 2016).

A resistência aos fungicidas surge em sua grande maioria, quando os fungicidas sistêmicos são utilizados constantemente nas áreas de cultivo, provocando o aumento da pressão de seleção nas populações de fungos. Para os fungicidas protetores ou de contato, essa ocorrência de resistência é rara (PEREIRA et al., 2009). Uma outra característica dos fungicidas sistêmicos em relação a resistência é que eles podem causar fitotoxidez nas plantas, quando aplicados em doses elevadas. Por isso, o número de aplicações destes fungicidas são baixas, sendo essa uma estratégia anti-resistência (GHINI; KIMATI, 2000).

Dentre os mecanismos envolvidos na resistência, o principal refere-se as modificações que ocorrem no sítio de ação do produto, reduzindo a afinidade do fungicida. Ainda podem estar associados a rotas metabólicas alternativas ao sítio de ação, na redução da absorção ou no aumento do efluxo do fungicida, a conversão do produto ao ingrediente ativo, a produção da enzima alvo do fungicida e a detoxificação do produto (BRENT, 1995; GHINI; KIMATI, 2000). Os mecanismos de resistência podem variar nos diferentes grupos químicos de fungicidas existentes para cada tipo de organismo, ocasionando populações resistentes aos fungicidas (BRENT; HOLLOMON, 2007).

A resistência aos fungicidas está dividida em resistência cruzada, múltipla, qualitativa ou oligogênica e, quantitativa ou multigênica. A resistência cruzada ocorre quando um patógeno possui resistência de dois ou mais fungicidas, que possuam o mesmo mecanismo de ação. A resistência múltipla ocorre quando os fatores genéticos conferem resistência a dois ou mais fungicidas com mecanismos de ação diferentes. A resistência qualitativa ocorre quando fungicidas de sítio específico são aplicados constantemente a campo, implicando na ocorrência de um ou poucos genes dominantes na população. E a resistência quantitativa acontece quando um conjunto de genes perdem sensibilidade aos fungicidas (GHINI; KIMATI, 2000).

A resistência em genes específicos pode ser pré-existent em algumas células na população fúngica, antes mesmo da aplicação de fungicidas. A presença da resistência nesses isolados permite que eles se desenvolvam e sejam menos afetados pelo fungicida (BRENT, 1995; BRENT; HOLLOMON, 2007; CAPOTE et al., 2013; MA; FELTS; MICHAILIDES,

2003). Quanto maior for a afinidade do fungicida com o gene do patógeno, maior será a sensibilidade do organismo (ISHII, 2004).

Dentre as características que tornam os fungos propícios a resistência, estão a capacidade de produção de conídios, disseminação e sobrevivência. Essas características afetam nas gerações futuras do fungo, tornando-os capaz de produzirem conídios, sobreviverem e se adaptarem a ambientes diversos. Outra característica importante é o tipo de reprodução do patógeno, sexuada ou assexuada. Na reprodução sexuada os fungos apresentam maior variabilidade genética, e com isso, se adaptam com maior facilidade às diferentes condições edafoclimáticas (PEREIRA et al., 2009).

A adaptabilidade de um alelo mutante depende dos genes que sofreram mutação para resistência. O surgimento de problemas de resistência depende, em grande parte, da pressão de seleção exercida pela inadequada aplicação de fungicidas. Reduções de dose, utilização continuada de poucos ingredientes ativos em áreas extensas, ou inadequada cobertura do dossel das plantas, são possíveis causas do surgimento de isolados mutantes (FORCELINI et al., 2001).

Com o aumento da pressão de seleção nas populações fúngicas no decorrer dos anos, houve um acréscimo considerável de fungos resistentes a diferentes fungicidas, e para evitar o surgimento de patógenos resistentes, é recomendado o uso de estratégias anti-resistência (GHINI; KIMATI, 2000). As estratégias anti-resistência consistem em não utilizar os fungicidas com mecanismos de ação de sítio específico de forma isolada e constante no cultivo, reduzir o número de aplicações do fungicida sistêmico em cada período de produção, realizar o uso alternado de fungicidas com diferentes modos de ação, aplicar a dose comercial recomendada, evitar o uso de fungicidas de sítio específico como erradicantes, realizar o monitoramento de produção e aplicar o manejo integrado de doenças (PEREIRA et al., 2009).

O conhecimento do comportamento de cada grupo químico é fundamental para o estabelecimento de estratégias anti-resistência, uma vez que cada um dele caracteriza-se por um modelo típico de desenvolvimento de resistência. A redução da eficiência do controle químico observada em campo pode estar associada à predominância de populações de *A. brassicicola* que apresentam menor sensibilidade aos fungicidas atualmente registrados no Brasil (GHINI; KIMATI, 2000).

A ocorrência de resistência é comprovada com base em estudos, sobre os mecanismos moleculares de resistência que se associam aos fungicidas. Alguns relatos já descrevem que para o grupo químico das estrobilurinas, há a presença de mutações pontuais no gene *cyt b*, e que podem acontecer até onze mutações e atuarem isoladas ou combinadas. A mutação nos

códons 143 (G143A), 129 (F129L) e 137 (G137R) conferem resistência a fungicidas a base de estrobilurinas (OLIVEIRA et al., 2015). Para o grupo dos triazóis, inibidores da desmetilação, foi confirmada a presença de seis mutações no gene da enzima *cyp51* (citocromo P450 1,4 $\alpha$ -desmetilase), atuando nos códons 120 (F120L), 131 (Y131F/H), 142 (K142R), 145 (I145F) e 475 (I475T) (SCHMITZ et al., 2014). Não há registros de resistência para mancozebe, e ele é utilizado associado a outros fungicidas, por ser um fungicida multisítio e ter ação protetora (MONTEIRO et al., 2019).

Os princípios ativos, mancozebe, azoxistrobina e difeconazole são aplicados em cultivos brasileiros de brássicas para controlar a Alternariose. Este trabalho teve como hipóteses, i) a sensibilidade dos isolados variam nos fungicidas mancozebe, azoxistrobina e difeconazole e ii) a ocorrência de isolados sensíveis e não sensíveis a campo. Os objetivos do presente estudo foram: i) Avaliar a sensibilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* a diferentes princípios ativos, ii) Determinar as concentrações efetivas de mancozebe, azoxistrobina e difeconazole para a inibição de 50% (CE50) do crescimento micelial de isolados de *A. brassicicola*. iii) Testar *in vivo* a sensibilidade de isolados de *A. brassicicola* aos diferentes princípios ativos. iv) Determinar a distribuição de isolados de *A. brassicicola* resistentes aos princípios ativos, v) Confirmar a ocorrência de resistência prática de isolados de *A. brassicicola* aos princípios ativos mancozebe, azoxistrobina e difeconazole.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, George N. **Plant pathology**. Elsevier, 2005.

ALEXANDER, H. M.; ANTONOVICS, J.; KELLY, A. W. Variação genotípica em resistência a doenças de plantas - resistência fisiológica em relação à transmissão de doenças de campo. **Journal of Ecology**, p. 325-333, 1993.

ALVES, A. U.; NETO, J. G. A.; CARDOSO, E. A.; GOMES, M. C. Produção de repolho sob influência de boro. **Nativa, Sinop**, v. 9, n. 2, p. 142-146, mar./abr. 2021.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia** Volume 1–Princípios e Conceitos. 2011.

ARAUJO, R. G. V. Potencial de bactérias endofíticas para promoção de crescimento em couve da folha (*Brassica Oleracea* Var. *Acephala*). 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Alagoas.

AZEVÊDO, S. S.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Levantamento da intensidade da podridão negra e da alternariose do repolho no agreste de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras para quantificação dessas doenças. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 299-306, 2000.

- BESTOR, N. R. C.; ROBERTSON, A. E.; MUELLER, D. S. Effect of foliar fungicides on late-season anthracnose stem blight on soybean. **Plant Health Research**, v. 15, n. 3, p. 118-121, 2011.
- BRENT, K. J. Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como manejá-la. **Brussels-Belgium: GPCF (FRAC Monograph No. 1)**, 1995.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed (FRAC Monograph No. 1). **Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, Belgium**, 2007.
- CAPOTE, M. H. **Caracterización de hongos asociados a la pudrición seca de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) y evaluación de alternativas de control**. 2013. Tese de Doutorado. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- DIXON, G. R. Vegetable *brassicas* and related *crucifers*. **Wallingford: CABI**, 2007. 327p.
- EHR, R. J.; KEMMITT, G. **Periodic table of the fungicides**. Indianapolis: Dow Agrosciences, 2000.
- FAO. **Statistical databases Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Roma, 2019. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjct55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1880295&utm\\_campaign=8504943975\\_107931897105&utm\\_source=lixiaofang&utm\\_medium=adwords&gclid=Cj0KCQiAvP6ABhCjARIsAH37rbQPYADF-IHXIhL1w4\\_k3c-OyRBL9doI3g3482Apj5tn5K1ZbFhSGJQaAguREALw\\_wcB](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjct55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1880295&utm_campaign=8504943975_107931897105&utm_source=lixiaofang&utm_medium=adwords&gclid=Cj0KCQiAvP6ABhCjARIsAH37rbQPYADF-IHXIhL1w4_k3c-OyRBL9doI3g3482Apj5tn5K1ZbFhSGJQaAguREALw_wcB) . Acesso em: 18 nov. 2020.
- FERREIRA, E. M. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 468-475, 2006.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, v.33, p.9-13, 1967.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Brassicáceas couves e plantas relacionadas**. FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura. 3 ed<sup>a</sup>. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. cap. 16, p. 280-299.
- FONTES, P. C. R.; NICK, C. **Olericultura: Teoria e prática**. 2<sup>a</sup> ed. Viçosa, Editora UFV/DFT, 2019. 247-632 p.
- FORCELINI, C. A.; SOUZA, R. T. Frequency of *Alternaria dauci* and *Cercospora carotae* as causal agents of carrot leaf blights in Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 614-618, 2001.
- FRAC. **FRAC Code List, 2016**: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). 2016. Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2016.pdf?sfvrsn=2>>. Acesso: 20 nov. 2020.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

GULLINO, M. L.; TINIVELLA, F.; GARIBALDI, A.; KEMMITT, G.M.; BACCI, L.; SHEPPARD, B. Mancozeb: past, present, and future. **Plant Disease**, v. 94, n. 9, p. 1076-1087, 2010.

HORTIFRUTI. **Agrianual 2019: Anuário estatístico da agricultura brasileira**, São Paulo, p. 292-295, 2019.

HUANG, R.; LEVY, Y. Characterization of iprodione resistant isolates of *Alternaria brassicicola*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 8, p. 828-833, 1995.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário** 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>>. Acesso em 13/04/2022.

IPA/CEAGESPE/EMATER-PE. **Sistema Integrado de produção de Repolho (*Brassica oleracea var. capitata*) para o Estado de Pernambuco**. Vitória de Santo Antão: IPA, 1997. 41 p (Sistema Integrado de Produção, 5).

ISHII, H. Studies on fungicide resistance in phytopathogenic fungi. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 70, n. 3, p. 149-151, 2004.

KOIKE, S. T.; GLADDERS, P.; PAULUS, A. O. **Vegetable diseases: a color handbook**. San Diego: Academic Press, 2006. 320 p.

LEFSRUD, M.; KOPSELL, D.; WENZEL, A.; SHEEHAN, J. Changes in kale (*Brassica oleracea L. var. acephala*) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, p. 136-141, 2007.

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.

MAPA. **Agrofit** -sistema de agrotóxicos fitossanitários. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008. Disponível em:<[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 20 Nov. 2020.

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, couve-flor, rabanete, repolho e rúcula). In: KIMATI, H.; AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed<sup>a</sup>. Agronômica Ceres, 2005. Cap. 31, p. 285-291.

MAYNARD, D. N.; HOCHMUTH, G. J. **Knott's Handbook for Vegetable Growers**. 5 ed<sup>a</sup>. New Jersey, 2007. 47p. MEHTA, N.; SANGWAN, M. S.; SAHARAM, G. S. Fungal diseases of rapeseed mustard. In: SANGWAN MS; SAHARAM GS, MEHTA N. **Diseases of oilseed crops**. New Delhi: Indus Publishing Company, New Delhi, 2007. p. 15-86.

MONTEIRO, L. F. S.; CUSTÓDIO, M. J. A.; LIMA, A.P.C.; RAMOS, M. H.C. Indutores de resistência para controle de mancha alvo na cultura da soja. **Science and Technology Innovation in Agronomy**, v.3, p.115-133. 2019.

- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2009.
- MOREIRA, H. J. da C.; BRAGANÇA, H.B.N. **Manual de identificação de plantas infestantes: hotifrúti**. São Paulo: FMC, Agricultural Products, 2011.
- MOREIRA, M. A.; VIDIGAL, S. M. Evolução das características da planta associadas à nutrição nitrogenada de repolho. **Ceres**, v.58, n.2, p. 243-248, 2015.
- MOREIRA, P. A. A. **Diversidade de isolados de *Alternaria brassicicola* (schwn.) wilt. de cultivos convencionais e orgânicos de brássicas de Pernambuco**. 2008, 48 f. Dissertação em fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.
- NOSSLLALA, S. K. **Sensibilidade in vitro de isolados de *Alternaria grandis* e *Alternaria solani* a fungicidas**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- NOVO, M. C. S. S.; PRELA-PANTANO, A.; TRANI, P. E.; BLAT, S. F. Desenvolvimento e produção de genótipos de couve manteiga. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 321-325, 2010.
- OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, C. A.; COSTA, E. S. P.; GOULART, R. G. T.; ANDRADE, N. F.; DINIZ, C. S.; CARMO, M. G. F. Desempenho de híbridos de couve-flor nas condições da baixada fluminense - RJ. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 8, n. 1, p. 30-36, 2018.
- OLIVEIRA, S. C.; CASTROAGUDÍN, V. L.; MACIEL, J. L. N.; PEREIRA, D. A. S.; CERESINI, P. C. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v.41, n.4, p.298-304. 2015.
- PEREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica, Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009.
- PERIN, A.; CRUVINEL, D. A.; FERREIRA, H. S.; MELO, G. B.; LIMA, L. E.; ANDRADE, J. W. de S. Decomposição da Palhada e Produção de Repolho em Sistema Plantio Direto. **Global Science and Technology**, v. 8, n. 2, p. 153-159, 2015.
- PERUCH, L. A. M.; MICHEREFF, S. J. Saprophytic survival of *Alternaria brassicicola* and management of broccoli leaf debris. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 13-18, 2007.
- PERUCH, L. A. M.; MICHEREFF, S. J.; ARAÚJO, I. B. Levantamento da intensidade da alternariose e da podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 464-469, 2006.
- RAJARAMMOHAN, S.; PARITOSH, K.; PENTAL, D; KAUR, J. A genômica comparativa de espécies de *Alternaria* fornece informações sobre o estilo de vida patogênico de *Alternaria brassicae* – um patógeno da família Brassicaceae. **BMC genomics**, 2019 , v. 20, n. 1, pág. 1-13.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S. *Alternaria* species infecting brassicaceae in the Brazilian

neotropics: geographical distribution, host range and specificity. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 92, p. 661-668, 2010.

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

RIGUEIRA, G. D. J.; BANDEIRA, A. V. M.; CHAGAS, C. G. O.; MILAGRES, R. C. R. M. Atividade antioxidante e teor de fenólicos em couve-manteiga (*brassica oleracea l. var. acephala*) submetida a diferentes sistemas de cultivo e métodos de preparo. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 3-12, jul./dez. 2016.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. 2006. 291 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2006.

RODRIGUES, V. J. L. B. et al. Epidemiologia comparativa da alternariose em cultivares de brássicas sob cultivo convencional e orgânico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 2, p. 226-233, 2004.

ROTEM, J. The genus *Alternaria*: Biology, epidemiology, and pathogenicity. **American Phytopathological Society**, Sant Paul, 1994. 326 p.

SAHARAN, G. N., MEHTA, N., SANGWAN, M. S. (Eds.). **Diseases of oilseed crops**. New Delhi: Indus Publishing, 2005. 643 p.

SCHMITZ, H. K.; MEDEIROS, C. A.; CRAIG, I. R.; STAMMLER, G. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, v. 70, n. 3, p. 378-388, 2014.

SILVA, J. M.; CHALCO, F. P. 2017. Coleções didáticas de sementes de hortaliças. Disponível em <<http://repositorioinstitucional.uea.edu.br/handle/riuea/653>>. Acesso em: 17 abr. 2022.

SKYLAKAKIS, G. Mudanças na composição de populações de patógenos causadas por resistência a fungicidas. **Populações de fitopatógenos: sua dinâmica e genética / editado para a Sociedade Britânica de Patologia Vegetal por MS Wolfe e CE Caten**, 1987.

SOUZA, E. P.; BUCCIARELLI, B.; PICCOLI, M. M.; CARDOSO, A. I. I. Molibdênio no tratamento de sementes de brócolis. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, e15711427154, 2022.

STUART, R. M.; BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F. A.; MACHADO, M. A. *Alternaria* brown spot. **Citrus Research & Technology**, v. 30, n. 1-2, p. 29-44, 2017.

THE PLANT LIST. **Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, College of Medical, Veterinary and Life Sciences**. University of Glasgow. Disponível em: <<https://doi.org/10.15468/btkum2>>. Acesso em 13/04/2022.

TOFOLI, J. G. **Ação de fungicidas e indutores de resistência no controle da requeima e pinta preta na cultura da batata**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **O Biológico**, v. 77, n. 1, p. 21-34, 2015.

TRANI, P. E.; TIVELLI, S. W.; BLAT, S. F.; PRELA-PANTANO, A.; TEIXEIRA, E. P.; ARAÚJO, H. S.; FELTRAN, J. C.; PASSOS, F. A.; FIGUEIREDO, G. J. B.; NOVO, M. C. S. S. Couve de folha: do plantio à pós-colheita. IAC – **Boletim Técnico** n. 214, Campinas, 2015.

VERMA, P. R.; SAHARAN, G. S. **Monograph on *Alternaria* diseases of crucifers**. Saskatoon: Minister of Supply and Services Canada, 1994. 162 p.

WARWICK, S. I. Brassicaceae in Agriculture. In: SCHMIDT, R.; BANCROFT, I. (Ed.). **Genetics and Genomics of the Brassicaceae**. New York: Springer New York, 2011. p.33-65.

WILTSHIRE, S. The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium* **Transactions of the British Mycological Society**, 1933, v.18, p.135–IN133.

WISE, K. A.; BRADLEY, C. A.; PASCHE, J. S.; GUDMESTAD, N. C. Resistance to QoI fungicides in *Ascochyta rabiei* from Chickpea in the Northern great plains. **Plant Disease**, v. 93, n. 5, p. 528-536, 2009.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. F. Manejo da resistência de fungos a fungicidas. **Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora**, v. 168, 2007.

ZYLA, N.; FIDLER, J.; BABULA-SKOWRONSKA, D. Importancia Economica e Academica de *Brássica oleracea*. **O genoma Brassica oleracea**, 2021, p.1-6.

## CAPÍTULO II

---

Sensibilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* a ditiocarbamato, estrobilurina e triazol

1                   **Sensibilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* a**  
2                   **ditiocarbamato, estrobilurina e triazol**

3

4    Andreza V. S. Silva<sup>1</sup>; Ana G. G. Amaral<sup>1</sup>; Willie A. S. Vieira<sup>1</sup>; Marcos P. S. Camara<sup>1\*</sup>5    <sup>1</sup> Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE,  
6    52171-900, Brasil

7    \*Autor para correspondência: Marcos Paz Saraiva Câmara

8    Email: marcos.camara@ufrpe.br

9

## 10 **Resumo**

11

12 A alternariose causada por *A. brassicicola* é uma das doenças mais comuns e destrutivas nos  
13 cultivos de couve e brócolis no Brasil. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a  
14 sensibilidade de isolados *in vitro* e *in vivo* de isolados de *A. brassicicola* a ditiocarbamatos,  
15 estrobilurinas e triazóis, bem como os componentes de adaptabilidade destes fungicidas. Foram  
16 usados 30 isolados de *A. brassicicola* provenientes de áreas produtoras do Brasil. A  
17 sensibilidade foi avaliada *in vitro*, a partir da concentração capaz de inibir 50% do crescimento  
18 micelial (CE<sub>50</sub>). Seis isolados foram classificados em sensíveis e seis em não sensíveis para  
19 todos os fungicidas. Para o ensaio de sensibilidade *in vivo*, foram utilizadas as doses comerciais  
20 recomendadas para a *Alternaria*. O diâmetro da lesão (mm<sup>-1</sup>) foi determinado no teste *in vivo*,  
21 para a análise dos componentes de adaptabilidade. Os isolados selecionados foram comparados  
22 quanto ao crescimento micelial, a produção de conídios, a germinação de conídios e a  
23 virulência. De modo geral, a maioria dos isolados foram sensíveis aos fungicidas. Para o  
24 mancozebe, os valores da CE<sub>50</sub> variaram de 141,6 a 1961,1 µg.mL<sup>-1</sup>, para azoxistrobina variou  
25 de 0,9 a 34,2 µg.mL<sup>-1</sup>, para difeconazole a variação foi de 3,6 a 17,2 µg.mL<sup>-1</sup>. O resultado foi  
26 significativo na taxa de crescimento micelial para mancozebe, na produção de conídios e  
27 virulência para azoxistrobina. Todos os fungicidas foram eficazes no controle da alternariose,  
28 entretanto, a maior eficiência foi obtida com o uso de difeconazole, que apresentou 80,85% de  
29 inibição do diâmetro da lesão para isolados sensíveis e 87,14% para isolados não sensíveis. Os  
30 resultados indicam a presença de indivíduos sensíveis e não sensíveis nas áreas produtoras, com  
31 boas características de adaptabilidade, mostrando a necessidade de adoção de medidas de  
32 controle mais eficientes e estratégicas para o monitoramento de populações não sensíveis.

33 **Palavras-chaves:** Alternariose, brassicas, *Brassica oleracea*, fungicidas.

## 34 **Introdução**

35 A família Brassicaceae compreende espécies vegetais de grande importância para a  
36 agricultura. Dentre elas se destacam as culturas da couve, couve-flor, repolho e brócolis  
37 (*Brassica oleracea* L.) (Novo et al., 2010; Hortifruti, 2019; FAO, 2019).

38 A produção no mundo das brássicas em 2017 foi de aproximadamente 97,4 milhões de  
39 toneladas, sendo China e Índia os maiores produtores mundiais (FAO, 2019). A produção  
40 brasileira nesse mesmo período, produziu 82,6 mil toneladas (Hortifruti, 2019). Dentre os  
41 maiores produtores de brássicas no Brasil, estão São Paulo com a produção de 467.622  
42 toneladas de repolho, 161.986 t de couve, 140.067 t de couve-flor, seguido por Rio Grande do  
43 Sul com 150.017 t de brócolis (IBGE, 2017). Com o aumento da produção destas hortaliças,  
44 ocorre o aparecimento de inúmeros fatores que influenciam diretamente na qualidade final do  
45 produto. A ocorrência de doenças é um dos principais fatores de preocupação a estas culturas  
46 (Novo et al., 2010).

47 Dentre as principais doenças fúngicas que ocorrem no cultivo de brássicas no Brasil,  
48 destaca-se a alternariose causada por espécies do gênero *Alternaria*, sendo as espécies *A.*  
49 *brassicicola* e *A. brassicae* as mais frequentes (Verma; Saharan, 1994). No Brasil, *A.*  
50 *brassicicola* tem sido a espécie predominante em plantios convencionais e orgânicos de  
51 brássicas (Peruch; Michereff, 2007). A *A. brassicicola* causa necroses nos cotilédones durante  
52 fase de produção de mudas, provocando a de vigor e tombamento (“damping-off”)  
53 generalizado de mudas. Em plantas adultas os sintomas são caracterizados por lesões circulares  
54 ou ovaladas, com tamanho variável, sendo essas facilmente identificadas pela presença de anéis  
55 concêntricos e halos amarelados ao redor das mesmas (Tofoli *et al.*, 2015). As reduções no  
56 rendimento da produção são resultantes, principalmente, da diminuição do potencial  
57 fotossintético e da aceleração da senescência (Saharan et al., 2005; Verma; Saharan, 1994).  
58 As práticas culturais empregadas de forma isolada não são eficientes na redução do inóculo a  
59 campo, portanto, o uso de controle químico é necessário para o manejo da alternariose.

60 A utilização de fungicidas no controle da alternariose é essencial nas condições de  
61 cultivo no Brasil, uma vez que previne a infecção e retarda o desenvolvimento dos sintomas, e  
62 conseqüentemente a quantidade de inóculo (Ghini; Kimati, 2000). A aplicação de fungicidas  
63 sistêmicos e translaminares, como inibidores de desmetilação (DMIs-difeconazole) e inibidores  
64 externos de quinona (QoIs- estrobilurinas), e fungicidas multisítios (por exemplo mancozebe)  
65 são recomendados/registrados para o controle alternariose em brássicas, bem como em outras  
66 culturas (MAPA, 2008).

67 Vários fatores podem levar a resultados desfavoráveis quando as doenças de plantas são

68 manejadas com fungicidas de forma inadequada. O uso frequente de fungicidas com sítios  
69 específicos de ação apresentam grande potencial para o desenvolvimento de resistência em  
70 populações de fungos, uma vez que pode favorecer a adaptabilidade de isolados menos  
71 sensíveis devido (Skylakakis, 1987). Diante disso, parâmetros como a taxa de crescimento  
72 micelial, germinação, produção de conídios e virulência, em um hospedeiro suscetível, são  
73 usadas para mensurar a adaptabilidade de um organismo (Alexander; Antonovics;, 1993). A  
74 presença de fungicidas no ambiente de cultivo, pode atuar de forma seletiva, que impulsiona a  
75 evolução da resistência, se houver variação na população dos isolados quanto a sensibilidade  
76 (Ma; Felts; Michailides, 2003).

77         Dentre os mecanismos envolvidos na resistência, o principal refere-se as modificações  
78 que ocorrem no sítio de ação do produto, reduzindo a afinidade do fungicida. Ainda podem  
79 estar associados a rotas metabólicas alternativas ao sítio de ação, na redução da absorção ou no  
80 aumento do efluxo do fungicida, a conversão do produto ao ingrediente ativo, a produção da  
81 enzima alvo do fungicida e a detoxificação do produto (Ghini; Kimati, 2000). Os mecanismos  
82 de resistência podem variar nos diferentes grupos químicos de fungicidas existentes para cada  
83 tipo de organismo, ocasionando populações resistentes aos fungicidas (Brent; Hollomon, 2007).  
84 Alguns relatos já descrevem a presença de mutações pontuais no gene *cyt b*, nos códons 143  
85 (G143A), 129 (F129L) e 137 (G137R) conferem resistência a fungicidas a base de  
86 estrobilurinas (Oliveira et al., 2015). Para o grupo dos triazóis, seis mutações no gene da enzima  
87 *cyp51*(citocromo P450 1,4 $\alpha$ -desmetilase), atuando nos códons 120 (F120L), 131 (Y131F/H),  
88 142 (K142R), 145 (I145F) e 475 (I475T) (Schmitz et al., 2014). Ainda não há registros de  
89 resistência para mancozebe, por ser um fungicida multisítio e ter ação protetora (Monteiro et  
90 al., 2019).

91         Os fungicidas a base de mancozebe, azoxistrobina e difeconazole são utilizados para  
92 controlar a alternariose em outras culturas, porém existem poucas informações da atuação  
93 destes fungicidas para as brássicas. Com isto, o presente trabalho foi realizado com o propósito  
94 de obter novas informações acerca do controle destes princípios ativos em *A. brassicicola*, além  
95 da ocorrência de resistência. Os objetivos do estudo foram: avaliar a sensibilidade in vitro e in  
96 vivo de isolados de *Alternaria brassicicola* aos princípios ativos difeconazole, azoxistrobina e  
97 mancozebe; e comparar os componentes de adaptabilidade entre os isolados sensíveis e não  
98 sensíveis.

99

## 100 **Material e métodos**

### 101 **Origem dos Isolados**

102 Trinta isolados previamente identificados morfológicamente como *A. brassicicola*  
103 oriundos de lesões foliares de couve e brócolis, foram obtidos da coleção de fungos do  
104 Laboratório de Micologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tabela 1). Esses  
105 isolados foram reativados em meio de cultura BDA e logo após discos de micélio do fungo  
106 foram retirados e transferidos para placas de Petri. Os isolados foram subcultivados em cultura  
107 pura e preservados pelo método de *Castellani* (Castellani, 1939; Figueiredo, 1967), e em sílica  
108 gel (Perkins, 2005).

109

### 110 **Sensibilidade *in vitro* de isolados de *A. brassicicola* a mancozebe, azoxistrobina e** 111 **difeconazole**

112 Para determinar a sensibilidade dos isolados de *A. brassicicola*, foram utilizados os  
113 seguintes princípios ativos: mancozebe (Manzate 800 WP, 800 g Kg<sup>-1</sup> i.a., UPL, Ituverava, SP,  
114 Brasil), azoxistrobina (Amistar 500 WG, 500 g kg<sup>-1</sup> i.a., Syngenta, São Paulo, SP, Brasil), e  
115 difeconazole (Score EC, 250 g l<sup>-1</sup> i.a., Syngenta, São Paulo, SP, Brasil). Os fungicidas a base  
116 de mancozebe e difeconazole foram dissolvidos em água destilada esterilizada (ADE) para o  
117 preparo da solução estoque. O fungicida a base de azoxistrobina foi dissolvida em água e  
118 Dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5%, com a adição de ácido salicílico-hidroxâmico (SHAM) a 0,5%.  
119 Foram utilizadas as concentrações para mancozebe 0 (controle); 25; 50; 100; 200; 300; 1000;  
120 2000; 3000, para azoxistrobina 0 (controle); 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 10; 25 µg.mL<sup>-1</sup> e para  
121 difeconazole 0 (controle); 0,5; 1,00; 2,5; 5,00; 10; 25; 50 µg.mL<sup>-1</sup>. O volume de 600 µL do  
122 fungicida foi adicionado em 300 mL de meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) fundente (45°C).  
123 Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado  
124 com fungicida e foram incubados à 25 °C sob alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro).

125 Após 7 dias foi avaliado o crescimento fúngico na placa. O diâmetro das colônias foi  
126 mensurado em duas direções perpendiculares, obtendo-se o diâmetro médio da colônia (DMC).  
127 Para cada concentração foi calculada a inibição do crescimento micelial da colônia (%ICM)  
128 para cada isolado, pela fórmula: %ICM = (DMC<sub>Sf</sub> - DM<sub>Cf</sub> / DMC<sub>Sf</sub>) x 100, onde, DMC<sub>Sf</sub> =  
129 diâmetro médio das colônias em BDA sem fungicida, DM<sub>Cf</sub> = diâmetro médio da colônia do  
130 isolado obtido em cada concentração. O delineamento experimental consistiu em 3 placas por  
131 concentração, e 3 repetições do ensaio de sensibilidade *in vitro* para cada fungicida. Para cada  
132 repetição de cada combinação foi feita a regressão linear dos valores do %ICM com o log da  
133 concentração do fungicida, para estimar a dose que inibe 50% do crescimento micelial (CE<sub>50</sub>).

134 A classificação dos isolados quanto à sensibilidade aos fungicidas foram estabelecidas  
135 de acordo com os seguintes intervalos: mancozebe – sensíveis CE<sub>50</sub> ≤ 500 µg.mL<sup>-1</sup> e não

136 sensíveis  $CE_{50} > 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; azoxistrobina – sensíveis  $CE_{50} \leq 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e não sensíveis  
 137  $CE_{50} > 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; difeconazole – sensíveis  $CE_{50} \leq 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e não sensíveis  $CE_{50} > 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .  
 138 Os seis isolados com menores e os maiores valores de  $CE_{50}$  para cada princípio ativo foram  
 139 selecionados e denominados como “sensíveis” e “não sensíveis”, respectivamente, e  
 140 posteriormente utilizados nos testes de sensibilidade *in vivo* e de adaptabilidade.

141

142 **Sensibilidade *in vivo* de isolados de *A. brassicicola* a mancozebe, azoxistrobina e**  
 143 **difeconazole**

144 Os isolados sensíveis e não sensíveis foram avaliados *in vivo* quanto a sua  
 145 sensibilidade às doses comerciais de mancozebe ( $5 \times 10^3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), azoxistrobina ( $13 \times 10^2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )  
 146 e difeconazole ( $2 \times 10^2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para esse ensaio *in vivo* foram utilizadas plantas de couve  
 147 com 40 dias de idade, com 15 cm de comprimento e 6 folhas definitivas. Foram utilizados  
 148 discos contendo estruturas do patógeno obtidos a partir de placas de Petri contendo os isolados  
 149 do fungo *A. brassicicola*, mantidas a 25°C por 15 dias em meio batata-cenoura-ágar (Souza e  
 150 Boava, 2018), utilizado para induzir a esporulação. As plantas de couve foram tratadas com as  
 151 suspensões dos fungicidas na dose comercial recomendada suplementada com Tween 20  
 152 (0,1%), aplicadas com pulverizador manual.

153 As folhas foram lesionadas com dupla camada de gaze, e discos contendo estruturas  
 154 do patógeno de 5mm de diâmetro foram posicionados sobre as lesões. As plantas foram  
 155 colocadas em bandejas plásticas, e mantidos em câmara úmida por 48 h. Após esse período as  
 156 bandejas com as plantas ficaram em condições de casa de vegetação por 12 dias. O controle  
 157 negativo consistiu em quatro plantas para cada isolado, pulverizadas com 5 ml de água  
 158 destilada esterilizada suplementada com Tween 20. Para cada isolado foram utilizadas quatro  
 159 plantas, em cada planta foram inoculadas 3 folhas. Esse experimento foi repetido duas vezes  
 160 no tempo.

161 Para cada fungicida foi calculada o percentual de inibição do diâmetro da lesão  
 162 (%INIB) para cada nível de sensibilidade (sensíveis e não sensíveis), pela fórmula: %INIB =  
 163  $(DL_{Sf} - DL_{Cf} / DL_{Sf}) \times 100$ , onde,  $DL_{Sf}$  = diâmetro médio da lesão sem fungicida;  $DL_{Cf}$  =  
 164 diâmetro médio da lesão com fungicida.

165

166 **Avaliação dos Componentes de Adaptabilidade**

167 Os seguintes componentes de adaptabilidade foram estimados e comparados para os  
 168 isolados de *A. brassicicola* sensíveis e não sensíveis a mancozebe, difeconazole, e azoxistrobina

169 conforme o teste de sensibilidade *in vitro*: taxa de crescimento micelial, produção de esporos,  
170 germinação de conídios e virulência. Para todos os ensaios, os isolados foram cultivados em  
171 meio de cultura BDA, mantidos a 25°C, sob alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro),  
172 por 7 dias (Tabela 2). Para a sensibilidade *in vivo* o delineamento experimental foi inteiramente  
173 casualizado (DIC) com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma planta.

#### 174 *Taxa de crescimento micelial*

175 Para o ensaio de taxa de crescimento micelial discos contendo estruturas do patógeno  
176 de 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas de colônias de *A. brassicicola* com sete dias  
177 de crescimento em meio BDA e transferidos para o centro de placas de Petri com meio BDA.  
178 O crescimento micelial de cada isolado foi avaliado diariamente, durante sete dias, pela  
179 mensuração do diâmetro da colônia e calculada a média por placa. Os valores de crescimento  
180 micelial (mm/dia) foram obtidos a partir da razão entre o diâmetro médio da colônia e o número  
181 de dias de incubação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três  
182 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa.

#### 183 *Produção de Conídios*

184 Discos contendo estruturas do patógeno de 5 mm de diâmetro foram retirados das  
185 bordas de colônias com sete dias de crescimento em meio BDA e transferidos para o centro  
186 de placas de Petri com meio BCA, para induzir a esporulação. A produção de conídios foi  
187 avaliada após 15 dias de incubação das placas, pela adição de 20 ml de água destilada  
188 esterilizada em cada placa. As colônias foram raspadas com pincéis de cerdas macias e  
189 filtradas em dupla camada de gaze. A concentração de conídios foi mensurada com a ajuda de  
190 um hemacitômetro, que expressa o número de conídios por mililitros da suspensão. Quatro  
191 gotas foram contadas para cada placa (réplica). A concentração das suspensões foi ajustada  
192 após a contagem para  $10^5$  conídios. mL<sup>-1</sup>, a serem utilizadas no ensaio de germinação de  
193 conídios.

#### 194 *Germinação dos Conídios*

195 Dez microlitros de suspensão de conídios foram transferidos para quatro pontos  
196 equidistantes em placas de Petri contendo 4% de ágar-ágar água. Cada gota foi coberta por uma  
197 lamínula e as placas foram incubadas por um período de 12h a 25°C no escuro. Cem conídios  
198 foram avaliados em microscópio óptico (Olympus CX22, Tóquio, Japão) para determinar a  
199 porcentagem de germinação. Um conídio foi considerado germinado se o tubo germinativo  
200 tivesse pelo menos a metade do comprimento do conídio.

#### 201 *Virulência*

202 Os isolados sensíveis e não sensíveis em plantas não tratadas com os fungicidas, foi  
203 avaliada aos 14 dias após a inoculação, pelo diâmetro da lesão (em mm) conforme o  
204 experimento *in vivo*, sendo posteriormente calculada a média dos diâmetros da lesão por  
205 isolado.

## 206 **Análise de dados**

207 As análises de variância (ANOVA) foram realizadas individualmente para cada  
208 componente de adaptabilidade. A normalidade dos resíduos foi determinada usando o teste de  
209 Levene, e os dados foram transformados em log (média transformada+1), para atender as  
210 pressuposições de normalidade. Os componentes de adaptabilidade entre os diferentes  
211 princípios ativos foram determinados pela ANOVA e as médias serão comparadas pelo teste t  
212 de Student ( $P = 0,05$ ) usando o software Statistix v.10 (Analytical Software, Tallahassee, FL).

213

## 214 **Resultados**

### 215 **Sensibilidade *in vitro* a mancozebe, azoxistrobina e difeconazole.**

216 A resposta de sensibilidade ao mancozebe, azoxistrobina e difeconazole variou entre  
217 os isolados de *A. brassicicola*. Os valores de  $CE_{50}$  para mancozebe variaram de 0 a  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$   
218 <sup>1</sup>, em 20 isolados, e 10 isolados foram superiores a  $500,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , classificados em sensíveis  
219 e não sensíveis, respectivamente (Figura 1A).

220 Para azoxistrobina, 13 isolados apresentaram valores de 0 a  $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e 17  
221 isolados apresentaram valores superiores a  $10,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , classificados em sensíveis e não  
222 sensíveis, respectivamente (Figura 1B).

223 Para difeconazole, 10 isolados apresentaram valores para  $CE_{50}$  variando de 0 a 5  
224  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e 20 isolados apresentaram valores superiores a  $10,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , classificados em  
225 sensíveis e não sensíveis, respectivamente (Figura 1C).

226 Os isolados foram classificados como sensíveis e não sensíveis com base nos valores da  
227  $CE_{50}$ , variando a classificação entre os fungicidas para os ensaios subsequentes. Para o  
228 mancozebe, os valores da  $CE_{50}$  variaram de 141,6 a  $1961,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , para azoxistrobina variou  
229 de 0,9 a  $34,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , para difeconazole a variação foi de 3,6 a  $17,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

230

### 231 **Sensibilidade *in vivo* a mancozebe, azoxistrobina e difeconazole.**

232 Houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) no diâmetro da lesão em isolados sensíveis, para  
233 mancozebe ( $P = 0,03$ ), azoxistrobina ( $P = 0,00$ ) e difeconazole ( $P = 0,00$ ), e isolados não sensíveis  
234 para mancozebe, azoxistrobina e difeconazole, todos apresentando  $P < 0,05$ .

235 A eficácia dos fungicidas no controle de *A. brassicicola* foi dependente da  
236 sensibilidade dos isolados (Tabela 3). Todas as plantas não tratadas com fungicidas e inoculadas  
237 com os isolados sensíveis apresentaram sintomas típicos da Alternariose, com diâmetro médio  
238 das lesões variando de 9,56 mm a 14,11 mm. Enquanto as plantas tratadas com fungicida,  
239 apresentaram médias variando de 1,83 mm a 9,96 mm (Tabela 3).

240 Todas as plantas não tratadas com fungicidas, que foram inoculadas com isolados não  
241 sensíveis, apresentaram sintomas típicos de *A. brassicicola*, com lesões médias de 13,31 mm  
242 (mancozebe), 11,45 mm (azoxistrobina) e 12,99 mm(difeconazole). Para as plantas tratadas  
243 com fungicidas houve uma redução do diâmetro da lesão quando comparado as plantas não  
244 tratadas com isolados não sensíveis (Tabela 3).

245 O percentual de inibição variou entre os isolados sensíveis e não sensíveis de *A.*  
246 *brassicicola*. Observa-se diferença entre os fungicidas mancozebe, azoxistrobina e  
247 difeconazole. O difeconazole apresentou 80,85% de inibição do diâmetro da lesão para isolados  
248 sensíveis e 87,14% para isolados não sensíveis, destacando-se em eficiência no controle da  
249 alternariose (Tabela 3).

250

### 251 **Análise dos componentes de adaptabilidade**

252 Houve diferença estatística na taxa de crescimento micelial para o princípio ativo  
253 mancozebe. Não houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) para a produção de conídios,  
254 germinação de conídios e virulência. A taxa de crescimento micelial média para isolados  
255 sensíveis foi de 7,55 mm.dia<sup>-1</sup>, diferindo estatisticamente dos isolados não sensíveis com média  
256 de 6,40 mm.dia<sup>-1</sup> ( $P=0,00$ ).

257 Houve diferença significativa para a azoxistrobina na produção de conídios e na  
258 virulência. Não houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) para a taxa de crescimento micelial e  
259 germinação. A produção de conídios para os isolados sensíveis foram de  $4,31 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>  
260 <sup>1</sup> diferindo dos isolados não sensíveis com média de  $3,08 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup> ( $P=0,02$ ). Para os  
261 isolados sensíveis a virulência foi de 1,44 mm<sup>-1</sup> diferindo estatisticamente dos isolados não  
262 sensíveis com média de 2,48 mm<sup>-1</sup> ( $P=0,00$ ).

263 Não houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) para o difeconazole na taxa de crescimento  
264 micelial, produção de conídios, germinação de conídios e virulência.

265 A porcentagem da germinação de conídios foi de 100%, para todos os fungicidas, tanto  
266 para os isolados sensíveis como não sensíveis, pois todos os cem conídios germinaram (Figura  
267 2).

268

## 269 **Discussão**

270 No geral, os isolados apresentaram maior sensibilidade a mancozebe, seguido por  
271 azoxistrobina e difeconazole. Entretanto, os valores elevados de CE<sub>50</sub> indicam que ocorreu a  
272 redução ou a perda de sensibilidade dos isolados de *A. brassicicola*, para mancozebe,  
273 azoxistrobina e difeconazole. Rahman *et al.* (2020) observou dados semelhantes para *A.*  
274 *brassicicola* em mostarda, onde os fungicidas mancozebe, azoxistrobina, propiconazol,  
275 difeconazole e hexaconazole, inibiram significativamente o crescimento micelial nos estudos *in*  
276 *vitro*, onde os isolados apresentaram alta sensibilidade ao uso de fungicidas.

277 A resistência aos fungicidas é incomum em populações que não foram submetidas ao  
278 tratamento com fungicidas, devido aos alelos associados a resistência serem pouco frequentes  
279 (Brent e Hollomon, 2007). Porém, estes alelos aumentam, na mesma medida que a frequência  
280 da aplicação de fungicidas. O aumento da eficácia do fungicida, a frequência das aplicações, e  
281 a sensibilidade entre indivíduos sensíveis e não sensíveis, são fatores que podem levar a uma  
282 alta taxa de pressão de seleção (Vieira *et al.*, 2017). Em nosso trabalho, foi observado uma  
283 diferença significativa na sensibilidade dos fungicidas entre os isolados sensíveis e não  
284 sensíveis *in vitro* o que pode indicar um aumento na frequência de alelos relacionados a  
285 resistência a fungicidas utilizados.

286 A alta sensibilidade para o mancozebe verificada neste estudo, pode ser decorrente a  
287 sua intensiva utilização nas regiões produtoras, alavancando no aparecimento de indícios de  
288 resistência. A resistência aos inibidores multisítios ocorre raramente por meio da bomba de  
289 efluxo e processo de detoxificação, no entanto, necessita-se de mais estudos para confirmar a  
290 presença ou ausência de resistência (Zambolim *et al.*, 2007). O uso de ditiocarbamatos, como  
291 o mancozebe, tem sido proposto no controle de diversas espécies de fungos, devido ao seu  
292 modo de ação protetor multisítio e baixo risco de resistência (Reis, 2010). Os altos valores de  
293 CE<sub>50</sub> podem estar relacionados ao histórico de uso deste fungicida nas áreas de cultivo  
294 (Baldicera *et al.*, 2020).

295 As azoxistrobinas, inibidores da Quinona oxidase-Qols, são utilizadas amplamente no  
296 controle da *A. brassicicola* em brássicas. Por ser um fungicida mesostêmico translaminar e  
297 atuar em um único mecanismo de ação bioquímico, pode apresentar maiores riscos de  
298 resistência (Tofoli *et al.*, 2015). Essa resistência pode estar relacionada ao uso deste fungicida  
299 em campo nas regiões produtoras, pois as aplicações consecutivas podem ocasionar alterações  
300 no citocromo b, no códon G143A (Oliveira *et al.*, 2015). Esse resultado é preocupante, pois  
301 indica a existência de populações resistentes em campo, tendo em vista que esses isolados  
302 possuem características favoráveis a adaptabilidade e disseminação, como a elevada produção

303 de conídios quando comparado com isolados sensíveis (Zambolim et. al., 2007).

304 Os isolados tratados com difeconazole, em sua grande maioria apresentaram isolados  
305 sensíveis quanto a CE<sub>50</sub>. Esses fungicidas possuem eficiência comprovada para o controle de  
306 doenças causada por *Alternaria* spp., por isso são usados de forma intensiva. Associado a isto,  
307 no ensaio *in vitro*, os isolados tratados com este princípio ativo apresentaram vinte isolados não  
308 sensíveis, o que indica início de populações resistentes (Sellam et al., 2007; Yang et al., 2019).  
309 O difeconazole conseguiu controlar o crescimento micelial, principalmente por causa da  
310 redução ou interrupção na disponibilidade de ergosterol na membrana celular na posição C-14,  
311 onde é catalisada pelo citocromo P-450 (enzima esterol-C-14 demetilase), no códon *cyp51*,  
312 ocasionando o rompimento da membrana e extravasamento de solutos iônicos na célula fúngica  
313 provocado pelo difeconazole (Zambolim et al., 2007).

314 Os resultados *in vivo* revelam a baixa eficiência do mancozebe e alta eficiência para  
315 difeconazole seguido por a azoxistrobina, no controle de *A. brassicicola* em plantas de couve.  
316 Pesquisas recentes com sensibilidade de *A. brassicicola* a fungicidas, constataram alta  
317 eficiência dos fungicidas carbendazim, mancozebe, mancozebe carbendazim,  
318 zineb+hexaconazole, oxiclureto de cobre, iprodione, etilenobisditiocarbamatos, metalaxil  
319 hexaconazole, piraclostrobina, glifosato, tetraconazole+carbendazim, na incidência e  
320 severidade da doença, assim como os resultados obtidos neste trabalho (Rahman et al., 2020).  
321 O difeconazole apresentou baixa sensibilidade *in vitro*, porém, quando aplicado em campo nas  
322 plantas, teve maior eficiência no controle, tanto do crescimento micelial, quanto no diâmetro  
323 da lesão a campo. Isso nos mostra a importância de realizar pesquisas relacionadas a  
324 sensibilidade em isolados de *A. brassicicola*, e constatar a presença ou ausência de resistência  
325 nos cultivos.

326 Observamos que existem poucos relatos de estudos com esses fungicidas para a  
327 inibição do crescimento da alternariose em brássicas. Portanto, informações sobre componentes  
328 de adaptabilidade de fungos não sensíveis e sensíveis a fungicidas, nos permite determinar  
329 estratégias no manejo da alternariose e impedir o desenvolvimento da resistência. A taxa de  
330 crescimento micelial e virulência refletem o potencial patogênico dos isolados. Por outro lado,  
331 a produção de conídios e a germinação indicam a capacidade deste patógeno de se reproduzirem  
332 e se disseminarem nas áreas de cultivo. Nossos resultados indicam que a evolução da resistência  
333 aos fungicidas tem impacto sobre a aptidão física nos isolados não sensíveis e sensíveis de *A.*  
334 *brassicicola*, sendo igualmente capazes de sobreviver e se disseminarem nos cultivos de  
335 brássicas, como mostrado na tabela 4, a produção de conídios foi reduzida em isolados tratados  
336 com azoxistrobina.

337 Estes isolados de *A. brassicicola* podem persistir em cultivos de brássicas, mesmo sem  
 338 a pressão de seleção de múltiplas aplicações de mancozebe, azoxistrobina e difeconazole. A  
 339 ocorrência de isolados de *A. brassicicola* com baixa sensibilidade a azoxistrobina e  
 340 difeconazole em regiões produtoras de brássicas é uma realidade. Porém ainda não existem  
 341 estudos sobre possíveis estratégias de manejo da resistência a serem adotadas nas áreas de  
 342 cultivos. Como os isolados possuem os mesmos potenciais adaptativos, uma das estratégias  
 343 seria o uso de fungicidas com modos de ação diferentes a azoxistrobina e difeconazole. A  
 344 aplicação combinada de fungicidas com diferentes modos de ação, segundo a necessidade do  
 345 cultivo e com base nas recomendações do fabricante.

346

### 347 **Agradecimentos**

348 Os autores agradecem ao “Conselho Nacional de Pesquisa-CNPq”, pela concessão da bolsa e  
 349 financiamento da pesquisa. E à Universidade Federal Rural de Pernambuco por todo o apoio  
 350 técnico e acadêmico.

351

### 352 **Referências Bibliográficas**

353 Alexander, H. M.; Antonovics, J.; Kelly, A. W. Variação genotípica em resistência a doenças  
 354 de plantas - resistência fisiológica em relação à transmissão de doenças de campo. **Journal of**  
 355 **Ecology** , p. 325-333, 1993.

356 Baldicera, A. K.; Bogo, A.; Nerbass, F. R.; Becker, W. F.; Casa, R.T; Silva, F. N.

357 Sensibilidade de isolados de *Septoria lycopersi* e eficácia de fungicidas no controle de  
 358 septoriose no tomateiro. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. 19 (2), 2020.

359 Brent, K. J., e Hollomon, D.W. **Resistencia aos fungicidas em patógenos das culturas:**  
 360 **Como pode ser gerenciada?**. Comitê de Ação de Resistência a Fungicidas, Bruxelas. 2007.

361 Castellani, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical**  
 362 **Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

363 FAO. **Statistical databases Food and Agriculture Organization of the United Nations**.

364 Roma, 2019. Disponível em:

365 [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjt55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1880295&utm\\_campaign=8504943975\\_107931897105&utm\\_source=lixiaofang&utm\\_medium=adwords&gclid=Cj0KCQiAvP6ABhCjARIsAH37rbQPYADF-IHXIhL1w4\\_k3c-OyRBL9doI3g3482Apj5tn5K1ZbFhSGJQaAguREALw\\_wcB](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjt55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1880295&utm_campaign=8504943975_107931897105&utm_source=lixiaofang&utm_medium=adwords&gclid=Cj0KCQiAvP6ABhCjARIsAH37rbQPYADF-IHXIhL1w4_k3c-OyRBL9doI3g3482Apj5tn5K1ZbFhSGJQaAguREALw_wcB) . Acesso em: 18 nov. 2020.

369 Ferreira, E. M. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium*  
 370 *candelabrum* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 468-475, 2006.

- 371 Ferreira, J. B.; Abreu, M. S.; Pereira, I. S.; Fernandes, K. D.; Pereira, R. B. Sensibilidade de  
 372 *Colletotrichum gloeosporioides* (Mancha manteigosa do cafeeiro) a diferentes concentrações  
 373 de fungicidas. **Ciencia e Agrotecnologia**. Lavras, v.33. p. 2052-2058, 2009.
- 374 Figueiredo, M.B. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de  
 375 fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, v.33, p.9-13, 1967.
- 376 Ghini, R.; Kimati, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio  
 377 Ambiente, 2000.
- 378 Hortifruti. **Agriannual 2019: Anuário estatístico da agricultura brasileira**, São Paulo, p.  
 379 292-295, 2019.
- 380 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2017**. Disponível  
 381 em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>>. Acesso em 13/04/2022.
- 382 Ma, Z.; Felts, D.; Michailides, T. J. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from  
 383 pistachio in California. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 2, p. 66– 74, 2003.
- 384 Mapa. **Agrofit -sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Brasília: Ministério da  
 385 **Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2008. Disponível em  
 386 <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 20 Nov.  
 387 2020.
- 388 Monteiro, L. F. S.; Custódio, M. J. A.; Lima, A.P.C.; Ramos, M. H.C. Indutores de resistência  
 389 para controle de mancha alvo na cultura da soja. **Science and Technology Innovation in**  
 390 **Agronomy**, v.3, p.115-133. 2019.
- 391 Novo, M. C. S. S; Prela-Pantano, A.; Trani, P. E.; Blat, S. F. Desenvolvimento e produção de  
 392 genótipos de couve manteiga. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 321-325, 2010.
- 393 Oliveira, S. C.; Castroagudín, V. L.; Maciel, J. L. N.; Pereira, D. A. S.; Ceresini, P. C.  
 394 Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da  
 395 brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v.41, n.4,  
 396 p.298-304. 2015.
- 397 Perkins, D. How to preserve stocks. Post. McC, DDP revision, 2005.
- 398 Peruch, L. A. M.; Michereff, S. J. Saprophytic survival of *Alternaria brassicicola* and  
 399 management of broccoli leaf debris. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 13-18, 2007.
- 400 Rahman M. A.; Zohura, F. T.; Hamim, I.; Meah, M. B.; Hossain, M. A.. 2020. Sensitivity  
 401 of *Alternaria* blight pathogen (*Alternaria brassicicola*) to fungicides and its effects on yield  
 402 contributing parameters of mustard. **Fundamental and Applied Agriculture**. doi:  
 403 10.5455/faa.120733. 5(3): 435–442. doi: 10.5455/faa.1207332020.
- 404 Rajarammohan, S.; Paritosh, K.; Pental, D; Kaur, J. A genômica comparativa de espécies de

- 405 *Alternaria* fornece informações sobre o estilo de vida patogênico de *Alternaria brassicae* – um  
406 patógeno da família Brassicaceae. **BMC genomics**, 2019 , v. 20, n. 1, pág. 1-13.
- 407 Reis, A.; Boiteux, L. S. *Alternaria* species infecting brassicaceae in the Brazilian neotropics:  
408 geographical distribution, host range and specificity. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 92,  
409 p. 661-668, 2010.
- 410 Reis, E. M.; Reis, A. C.; Carmona, M. A. **Manual de fungicidas: guia para o controle**  
411 **químico de doenças de plantas**. 6 ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2010.
- 412 Saharan, G. N., Mehta, N., Sangwan, M. S. (Eds.). **Diseases of oilseed crops**. New Delhi:  
413 Indus Publishing, 2005. 643 p.
- 414 Schmitz, H. K.; Medeiros, C. A.; Craig, I. R.; Stammer, G. Sensitivity of *Phakopsora*  
415 *pachyrhizi* towards quinone-oxidase-inhibitors and demethylation-inhibitors, and  
416 corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, v. 70, n. 3, p. 378-388,  
417 2014.
- 418 Sellam, A.; Iacomini-Valescu, B.; Hudhomme P.; Si-dinheiro P. Atividade antifúngica in vitro  
419 de brassinina, camalexina e dois isotiocianatos contra os patógenos crucíferos *Alternaria*  
420 *brassicicola* e *Alternaria brassicae*. **Plantar Patologia**. 56:296-301. 2007.
- 421 Skylakakis, G. **Mudanças na composição de populações de patógenos causadas por**  
422 **resistência a fungicidas**. Populações de fitopatógenos: sua dinâmica e genética / editado para  
423 a Sociedade Britânica de Patologia Vegetal por MS Wolfe e CE Caten , 1987.
- 424 Souza, A. C.; Boava, L.P. Uso de diferentes tipos de meio de cultura para a esporulação e  
425 crescimento micelial de *Alternaria alternata*. **Revista Científica UNAR**. v 17, n.2, 2018.
- 426 Tofoli, J. G. **Ação de fungicidas e indutores de resistência no controle da requeima e**  
427 **pinta preta na cultura da batata**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- 428 Tofoli, J. G.; Domingues, R. J.; Ferrari, J. T. *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia,  
429 manejo e fungicidas. **O Biológico**, v. 77, n. 1, p. 21-34, 2015.
- 430 Verma, P. R.; Saharan, G. S. **Monograph on Alternaria diseases of crucifers**. Saskatoon:  
431 Minister of Supply and Services Canada, 1994. 162 p.
- 432 Vieira, W. A. S.; Lima, W. G.; Nascimento, E. S.; Michereff, S. J.; Reis, A. Thiophanate-  
433 Methyl Resistance and Fitness Components of *Colletotrichum musae* isolates from Banana in  
434 Brazil. **Revista Plant Disease**. 2017.
- 435 Yang, L. N.; He, M. H.; Ouyang, H. B.; Zhu, W.; Pan, Z. C.; Sui, Q. J.; Shang, L. P.;  
436 Zhan, J. Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with  
437 different modes of action. **BMC Microbiology**. 19:1–10. doi: 10.1186/s12866-019- 1574-8.  
438 2019.

439 Zambolim, L.; Venâncio, W. S.; Oliveira, S. H. F. **Manejo da resistência de fungos a**  
440 **fungicidas**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, v. 168, 2007.

**Tabela 1.** Isolados de *Alternaria brassicicola* provenientes de área de plantio de brássicas do Brasil, selecionados para os testes de sensibilidade a mancozebe, azoxistrobina e difeconazole.

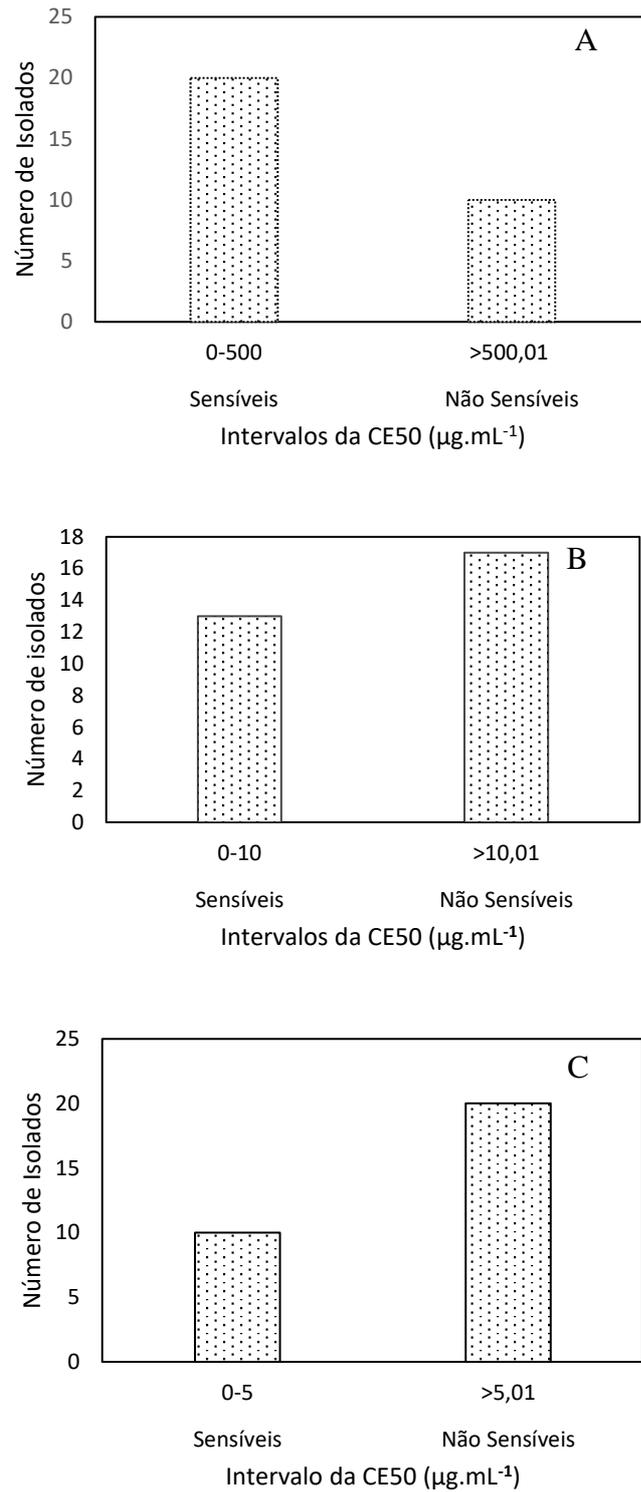
<b>Código dos Isolados*</b>	<b>Cidade</b>	<b>Estado</b>	<b>Cultura</b>
LM639	Brasília	DF	Couve manteiga
LM 640	Chã Grande	PE	Couve manteiga
LM641	Chã-Grande	PE	Brócolis
LM647	Chã-Grande	PE	Brócolis
LM648	Chã-Grande	PE	Brócolis
LM 649	Chã Grande	PE	Couve manteiga
LM 650	Chã Grande	PE	Couve manteiga
LM661	Chã-Grande	PE	Brócolis
LM664	Chã-Grande	PE	Brócolis
LM665	Chã-Grande	PE	Brócolis
LM667	Chã-Grande	PE	Brócolis
LM 730	Ceilândia	DF	Couve manteiga
LM731	Ceilândia	DF	Couve manteiga
LM732	Ceilândia	DF	Repolho
LM733	Ceilândia	DF	Repolho
LM734	Ceilândia	DF	Couve-flor
LM738	Ceilândia	DF	Brócolis
LM741	Ceilândia	DF	Brócolis
LM742	Ceilândia	DF	Brócolis
LM744	Ceilândia	DF	Brócolis
LM745	Ceilândia	DF	Brócolis
LM748	Brasilândia	DF	Couve manteiga
LM751	Brasilândia	DF	Couve manteiga
LM752	Brasilândia	DF	Couve manteiga
LM755	Brasilândia	DF	Brócolis
LM757	Colombo	PR	Couve manteiga
LM763	Itapetininga	SP	Couve manteiga
LM764	Teresópolis	RJ	Brócolis
LM768	Monte Alegre do Sul	SP	Brócolis
LM797	INCRA	DF	Brócolis

\*Código da coleção de Fungos Fitopatogênicos do “Laboratório de Micologia” (LM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil).

**Tabela 2.** Lista de isolados de *Alternaria brassicicola* provenientes de área de plantio de brássicas do Brasil, selecionados com base nos menores e maiores valores da CE<sub>50</sub> para mancozebe, azoxistrobina e difeconazole.

Código dos Isolados*	CE <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )					
	Mancozebe		Azoxistrobina		Difeconazole	
	S	NS	S	NS	S	NS
LM647	383,3	-	9,4	-	-	5,8
LM664	165,1	-	-	10,2	-	6,4
LM665	-	-	-	-	-	-
LM667	-	525,3	-	18,2	-	5,1
LM734	153,5	-	-	28,6	3,6	-
LM741	206,5	-	6,7	-	-	5,7
LM742	154,8	-	7,7	-	3,8	-
LM744	-	734,7	6,5	-	-	5,2
LM745	-	615,5	-	13,2	5,0	-
LM752	-	574,4	-	16,3	-	-
LM755	-	785,8	-	34,2	-	-
LM757	214,9	-	-	-	4,8	-
LM763	-	-	9,3	-	5,0	-
LM764	-	-	-	-	-	17,2
LM768	-	902,6	-	-	4,4	-

\*Código da coleção de Fungos Fitopatogênicos do “Laboratório de Micologia” (LM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil). S: Sensíveis, NS: Não sensíveis.



**Figura 1.** Distribuição de frequência de 12 isolados de *Alternaria brassicicola* com base nos valores da concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) de fungicida capaz de inibir 50% do crescimento micelial ( $CE_{50}$ ). A- Mancozebe. B- Azoxistrobina. C- Difeconazole.

**Tabela 3.** Severidade da doença (diâmetro da lesão em mm) em plantas de couve- folha tratadas com a dose comercial de Mancozebe, Azoxistrobina e Difeconazole e inoculadas com isolados sensíveis e não sensíveis de *Alternaria brassicicola*.

Fungicida/nível de sensibilidade	Diâmetro da lesão (mm <sup>-1</sup> ) *			
	Sem fungicida	Com fungicida	Inibição (%)	P-valor
<b>Mancozebe</b>				
Sensível	13,15 ± 6,71 a	9,96 ± 5,89 b	24,25	0,0398
Não sensível	13,31 ± 4,79 a	7,43 ± 4,11 b	44,17	0,0005
<b>Azoxistrobina</b>				
Sensível	14,11 ± 6,50 a	2,43 ± 2,74 b	82,77	0,0000
Não sensível	11,45 ± 3,61 a	2,94 ± 2,75 b	74,32	0,0000
<b>Difeconazole</b>				
Sensível	9,56 ± 3,88 a	1,83 ± 1,34 b	80,85	0,0000
Não sensível	12,99 ± 4,35 a	1,67 ± 2,26 b	87,14	0,0000

\* Médias seguidas da mesma letra na linha para cada fungicida não diferem significativamente pelo teste t-Student (P=0,05). Os valores após ± correspondem aos desvios padrão.

\*Médias transformadas em log

**Tabela 4.** Análise dos Componentes de Adaptabilidade em plantas de Couve Folha entre os isolados de *Alternaria brassicicola* sensíveis e não sensíveis a Mancozebe, Azoxistrobina e Difeconazole.

Fungicida/Nível de Sensibilidade	TCM (mm.dia <sup>-1</sup> )	Produção de Conídios (x10 <sup>5</sup> conídios.mL <sup>-1</sup> )	Germinação (%)	Virulência (mm <sup>-1</sup> )
<b>Mancozebe</b>				
Sensível	7,55 ± 0,93 a	3,56 ± 1,60 a	100	10,34 ± 5,64 a
Não sensível	6,40 ± 0,74 b	3,96 ± 1,69 a	100	7,70 ± 4,13 a
<i>P</i> -valor	0,0008	0,5053	-	0,0824
<b>Azoxistrobina</b>				
Sensível	7,36 ± 0,90 a	4,31 ± 1,59 a	100	1,44 ± 0,59 a
Não sensível	6,96 ± 1,12 a	3,08 ± 1,44 b	100	2,48 ± 1,27 b
<i>P</i> -valor	0,2301	0,0235	-	0,0031
<b>Difeconazole</b>				
Sensível	7,20 ± 1,26 a	3,26 ± 1,28 a	100	1,75 ± 1,00 a
Não sensível	7,14 ± 0,83 a	4,01 ± 1,79 a	100	1,61 ± 0,71 a
<i>P</i> -valor	0,9702	0,2238	-	0,7262

\* Médias seguidas da mesma letra na coluna para cada fungicida não diferem significativamente de acordo com o teste t-Student (P=0,05).

Os valores após ± correspondem aos desvios padrão.

TCM: taxa de crescimento Micelial

\*Médias transformadas em log

## **CAPÍTULO III**

### **Conclusões Gerais**

## CONCLUSÕES

1. Os isolados de *Alternaria brassicicola* apresentam diferenças nos níveis de sensibilidade aos princípios ativos mancozebe, azoxistrobina e difeconazole.
2. O princípio ativo difeconazole apresenta maior eficiência (> 85%) no controle da alternariose em couve-flor.
3. Foi detectada a presença de indivíduos sensíveis e não sensíveis nas áreas produtoras, com boas características de adaptabilidade.
4. Os componentes de adaptabilidade apresentaram diferenças significativas entre os isolados sensíveis e não sensíveis.
5. Nenhum dos princípios ativos testados apresentou 100% de eficiência no controle in vivo da alternariose em couve-flor, independentemente do nível de sensibilidade dos isolados.