



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**Mancha de *Alternaria* em erva-doce: etiologia e
controle químico**

Marcelo Garcia de Oliveira

Recife – PE

2022

MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA

**MANCHA DE *Alternaria* EM ERVA-DOCE: ETIOLOGIA E
CONTROLE QUÍMICO**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE) – Orientador

Recife – PE

Fevereiro, 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)

O48m

Oliveira, Marcelo Garcia de

Mancha de Alternaria em erva-doce : etiologia e controle químico / Marcelo Garcia de Oliveira. - 2022.
90 f. : il.

Orientador: Delson Laranjeira.
Inclui referências.

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

1. Alternaria spp.. 2. controle químico. 3. filogenia. 4. Foeniculum vulgare. 5. identificação molecular. I. Laranjeira,
Delson, orient. II. Título

CDD 632

**MANCHA DE *Alternaria* EM ERVA-DOCE: ETIOLOGIA E
CONTROLE QUÍMICO**

MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 24/02/2022

ORIENTADOR

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios (UFRPE)

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

Dra. Tarciana da Silva Santos (CETENE)

Dr. Willie Anderson Vieira (UFRPE)

Recife – PE
Fevereiro, 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao professor Dr. Delson Laranjeira pela orientação, confiança e apoio nos momentos de impasse científico.

Aos professores Dr. Marcos Câmara (UFRPE) e Dra. Rejane Neves (UFPE) pelos aconselhamentos e apoio financeiro para realização das análises moleculares.

Ao Instituto Federal da Paraíba pelo apoio institucional e permissão de afastamento parcial da atividade docente durante boa parte do período de qualificação profissional.

À Dra. Iwanne Coelho, agradeço por sua enorme contribuição nessa obra, reconhecendo que sem seu auxílio e seu conhecimento este estudo não seria concluído em tempo hábil. Agradeço pelo esforço excepcional aplicado a este trabalho, desde a sua projeção inicial até as últimas palavras escritas.

À minha genitora, Otacília Alves, pela compreensão das ausências no meio familiar decorrentes das constantes viagens à capital pernambucana durante os anos de realização deste trabalho. Ela, que é minha referência de força e resiliência.

À professora Dra. Lilian Guimarães pela amizade e apoio nos momentos de dificuldade. À ela meu carinho e gratidão.

Meus sinceros agradecimentos aos amigos que encontrei no Laboratório de Fungos de Solo, em especial à Sérgio Ramos, pelo esforço e dedicação durante os experimentos. À Igor Alexander, por sua disponibilidade à ajudar. Com carinho agradeço aos colegas de LAFSOL: Dra. Tarciana, Tiago, Thaís, Jaqueline, Odaíza, Leticia e Elder.

Agradeço aos amigos Dr. Willie Anderson e Dra. Josiene Veloso do Laboratório de Micologia da UFRPE pelos valiosos ensinamentos e auxílio nas análises de bioestatística.

Ao meu grande amigo, quase irmão, Jeferson Araújo pelo incentivo a realização do doutoramento e término do mesmo.

Aos amigos Carmem Abade, Alejandro Risco, Alba Suaste e Leandro Santos pelo apoio emocional durante todo o percurso acadêmico.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
Capítulo I	
Introdução Geral	7
A cultura da erva-doce	8
A mancha de alternaria	12
O gênero <i>Alternaria</i>	14
Controle Químico	16
REFERÊNCIAS.....	19
Capítulo II	
Alternaria species associated with leaf spot of fennel: phylogeny and pathogenicity	28
Introduction.....	31
Materials and Methods.....	32
Results.....	35
Discussion.....	37
References.....	39
Capítulo III	
First report of <i>Alternaria jacinthicola</i> causing leaf spot of fennel in Brazil	54
Capítulo IV	
Resposta in vitro de espécies de <i>Alternaria</i> a diferentes fungicidas	60
Introdução	62
Material e Métodos	64
Resultados	67
Discussão	71
Referências.....	73
Capítulo V	
Conclusões Gerais	89

RESUMO GERAL

A erva-doce, como é chamada as espécies de *Foeniculum vulgare* Mill. na região Nordeste do Brasil, é frequentemente atacada por fungos causadores de manchas foliares. Dentre eles, a *Alternaria* se destaca por promover a redução da área fotossintética das plantas. No Brasil, em se tratando de erva-doce, não há registro de quais espécies são associadas à mancha de *Alternaria*. Se pouco se sabe sobre as espécies causadoras, sabe-se menos ainda sobre os métodos de controle da doença. Deve-se levar em consideração que métodos de controle químico devem ser aplicados de forma controlada, visto que grande parte do cultivo de erva-doce tem como finalidade, no Brasil, o uso como condimento alimentar. Com esse estudo pretendeu-se identificar a incidência, bem como aspectos relacionados à epidemiologia da mancha foliar de plantas erva-doce provenientes de áreas produtoras dos estados da Paraíba e Pernambuco. Pretendeu-se estabelecer parâmetros para uso de moléculas químicas eficazes no controle da doença. Para isso foram efetuadas coletas de plantas sintomáticas de erva-doce para isolamento de *Alternariaspp.* As culturas fúngicas isoladas foram preservadas e depositadas na coleção de fungos fitopatogênicos da UFRPE. Para identificação de espécies, a nível molecular, e comparação de relações filogenéticas foram feitas: extrações de DNA dos isolados; reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das regiões gênicas (OPA 10-2, Alt a1, GAPDH, Endo PG); e sequenciamento das regiões amplificadas. Uma árvore filogenética foi obtida a partir de análise de máxima verossimilhança, permitindo identificar quatro espécies de *Alternaria* associadas a doenças da erva-doce, dentre elas *A. alternata* e *A. jacinthicola*. Posteriormente foi possível identificar, a partir de teste in vitro, quais moléculas químicas podem obter sucesso em reduzir o crescimento micelial do fungo e consequente mitigação dos efeitos da doença. Um dos isolados de *A. alternata*, com patogenicidade comprovada, foi testado para a reação aos fungicidas difenoconazol, flutriafol, procimidona e tiofanato-metílico, permitindo identificar que o difenoconazol tem ótimas perspectivas de sucesso no controle de *Alternaria* em plantios de erva-doce no Brasil.

Palavras-Chave: *Alternaria* spp.; controle químico; filogenia; *Foeniculum vulgare*; identificação molecular.

ABSTRACT

Fennel, *Foeniculum vulgare* Mill, is frequently attacked by fungi that cause leaf spots in the Northeast region of Brazil. Among these organisms, *Alternaria* genus stand out causing the reduction of the photosynthetic area of these plants. In Brazil there is no record of which species are associated with the *Alternaria* leaf spot on fennel. Little is known about the *Alternaria* species that cause the disease, even less is known about the methods of controlling. It should be taken into account that chemical control methods must be applied in a controlled manner, since most of the fennel cultivation in Brazil is used as a food condiment. This study aimed to identify the incidence, as well as aspects related to the epidemiology of leaf spot of fennel plants from crops in the states of Paraíba and Pernambuco. It was intended to establish parameters for the use of effective chemical molecules in the control of the disease. For this purpose, symptomatic fennel plants were collected for the isolation of *Alternaria* spp. The isolated fungal cultures were preserved and deposited in the collection of phytopathogenic fungi at UFRPE. For species identification, at the molecular level, and comparison of phylogenetic relationships, the following were performed: DNA extractions from the isolates; polymerase chain reactions (PCR) for amplification of gene regions (OPA 10-2, Alt a1, GAPDH, Endo PG); and sequencing the amplified regions. A phylogenetic tree was obtained from maximum likelihood analysis, allowing to identify four *Alternaria* species associated with fennel, causing disease, among these *A. alternata* and *A. jacinthicola* . Subsequently, from an in vitro test, it was possible to identify which chemical molecules can be successful in reducing the mycelial growth of the fungus and consequent mitigation of their effects. One of the *A. Alternata* isolates, with proven pathogenicity, was tested for the reaction to the fungicides: difenoconazole, flutriafol, procymidone and thiophanate-methyl, allowing to identify which difenoconazole has good prospects of success in the control of *Alternaria* in fennel plantations in Brazil.

Keywords: *Alternaria* spp.; chemical control; phylogeny; *Foeniculum vulgare*; molecular identification.

Capítulo I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da erva-doce

Embora seja uma espécie vegetal muito comum, para melhor compreensão destes registros acadêmicos é imprescindível esclarecer que a denominação erva-doce é um regionalismo para a espécie botânica *Foeniculum vulgare* Mill. A mesma faz parte do Reino *Plantae*, Filo *Spermatophyta*, Subfilo *Angiospermae*, Classe *Magnoliopsida*, Ordem *Apiales*, Família *Apiaceae*. (AL-SNAFI, 2018). Essa herbácea é reconhecida como funcho, funcho-doce ou fiolho, dependendo da localização geográfica onde cultivada dentro do território brasileiro. A distribuição irregular de plantios de erva-doce em regiões pontuais do território nacional se deve ao fato de que o clima frio e seco é o melhor para o cultivo de erva-doce (KHALEQUZZAMAN, 2020), condição rara em um território de clima tropical. O clima seco e frio durante a configuração das sementes aumenta o rendimento, bem como a qualidade do produto.

Com frequência nos deparamos com trabalhos acadêmicos e comunicados científicos que descrevem equivocadamente a espécie de erva-doce cultivada nos estados de Pernambuco e Paraíba como sendo da espécie *Pimpinella anisum* L. a exemplo de Santos et al. (2013) e , provavelmente devido às características morfológicas compartilhadas por ambas as apiáceas: frutos morfológicamente similares (aquênios) e presença de anetol no óleo essencial, motivo da similaridade no aroma. A diferenciação entre *F. vulgare* e *P. anisum* é evidente no aspecto morfológico, especialmente na cor das flores, amarelas na primeira e brancas na segunda, e forma das folhas, filiforme na primeira e larga na segunda (CARVALHO, 2009; AZEVEDO et al., 2012; SANTOS, 2012). *F. vulgare* caracteriza-se como uma erva sazonal, tem origem na porção sul do Mediterrâneo, mas foi rapidamente domesticada podendo ser encontrada nos hemisférios norte, leste e oeste, especificamente na Ásia, América do Norte e Europa (KRISHNAMURTHY, 2011).

Caracterizada como herbácea, a erva-doce que apresenta um forte aroma. Trata-se de uma erva perene apresentando caules sulcados, folhas intermitentes, pecíolo com bainha e flores geralmente bissexuais, podendo ser regulares ou irregulares (BERNÀTH et al., 1996; PURABBAS et al., 2011). A planta caracteriza-se, ainda, pelo porte ereto e estrutura ramificada com folhagem macia, emplumada, semelhante a fios capilares e pode alcançar até

2 m de altura (BADGUJAR, PATEL & BANDIVDEKAR, 2014). Possui frutos pequenos com cerca de 8 mm de comprimento e 3 mm de largura com odor e sabor característico da erva-doce. São considerados frutos-sementes de forma oblonga, compostos por dois aquênios de morfologia cilíndrica e dimensões que variam de acordo com o crescimento da planta (LORENZI; MATOS, 2008; AZEVEDO et al., 2012).

A erva-doce apresenta um alto teor aromático e um sabor marcante possibilitando seu uso culinário e medicinal. As sementes são bastante utilizadas como aromatizantes em diversos pratos como assados e preparos de carne e peixe, além de sorvetes, bebidas alcoólicas e mistura de ervas. O uso da erva-doce na culinária é notado predominantemente na cozinha do mediterrâneo, onde bulbos e folhas são consumidos crus e cozidos, em acompanhamentos, saladas, massas e outros pratos vegetais (DIAZ-MAROTO et al., 2005; RATHER et al., 2016). Há muito tempo essa planta é utilizada pelos egípcios, data-se mais de 4.000 anos, onde era utilizada como alimento e medicinal e na China antiga chegou a ser considerada medicamento para picada de cobras (AL-SNAFI, 2018).

Os compostos presentes na erva-doce variam de acordo com as fases morfofisiológicas e os fenólicos presentes estão relacionados a redução do estresse oxidativo, que é causado por doenças cardiovasculares, inflamações e câncer. Além de compostos fenólicos os flavonoides também são encontrados em porções significativas em extratos de sementes, além de ascorbatos, polifenóis, carotenoides, terpenoides e tocoferóis, que já foram avaliados como potenciais drogas quimioterápicas com ação em acúmulo de radicais livres (MEHRA, 2021). Diversos estudos revelaram que *F. vulgare* demonstra efetivas ações contra distúrbios infecciosos causados por bactérias, fungos, vírus e protozoários (KAUR; ARORA, 2009; DUA, GARG & MAHAJAN, 2013), contribui bastante para melhoria da memória e na redução do estresse (KOPPULA; KUMAR, 2013).

O uso cotidiano da erva-doce não é prejudicial, segundo testes realizados em animais, e uma dieta com porções balanceadas por meio de chás, consumo *in natura*, preparo cozido, bebidas entre outros pratos, pode trazer benefícios à saúde devido a sua complexa composição nutricional (BADGUJAR; PATEL; BANDIVDEKAR, 2014). A erva-doce detêm um forte perfil antioxidante e antimicrobiano, além de abarcar uma gama de compostos bioativos (CELEJA et al, 2015). O ácido linoleico é um tipo de ácido graxo que é encontrado em diferentes partes da erva-doce e esse composto contribui para a manutenção da hipertensão

atuando no controle da pressão arterial sistólica (BARROS; CARVALHO; FERREIRA, 2010).

A composição nutricional de *F. vulgare* agrupa diversos elementos como proteína, carboidratos, fibras, minerais, tais quais cálcio, ferro, fósforo, zinco, as vitaminas C, B-1, B-2, B-3, K, A, e alguns aminoácidos essenciais e não essenciais (Tabela 1).

Tabela 1. Nutrientes encontrados na erva-doce seca (BADGUJAR; PATEL; BANDIVDEKAR, 2014).

Composição	Quantidade (porção de 100 g)
Umidade	92,21 g
Energia	31 kcal
Proteína	1,24 g
Lipídio total (gordura)	0,2 g
Carboidrato	7,3 g
Fibra dietética total	3,1 g
Açúcares	3,93 g
Minerais	
Cálcio (Ca)	49 mg
Ferro (Fe)	0,73 mg
Magnésio (Mg)	17 mg
Fósforo (P)	50 mg
Potássio (K)	414 mg
Sódio (Na)	52 mg
Zinco (Zn)	0,2 mg
Vitaminas	
Vitamina C	12 mg
Tiamina B-1	0,01 mg
Riboflavina B-2	0,032 mg
Niacina B-3	0,64 mg
Vitamina B-6	0,047 mg
Folato	27 g μ
Vitamina A	48 g μ
Vitamina E	0,58 mg
Vitamina K	62,8 g μ
Lipídios	
Ácidos graxos saturados totais	0,09 g
Ácidos graxos monoinsaturados totais	0,068 g
Ácidos graxos poliinsaturados totais	0,169 g
Aminoácidos essenciais	
Leucina	0,63 g
Isoleucina	0,73 g
Fenilalanina	0,45 g
Triptofano	0,53 g
Aminoácidos não essenciais	
Glicina	0,55 g
Prolina	0,53 g

Os compostos voláteis presente no óleo essencial de *F. vulgare* podem conter mais de 87 tipos de componentes (ARKGUL; BAYRAK, 1998; DAMJANOVIC et al., 2005; FANG et al., 2006; SINGH et al., 2006; TOGNOLINI et al., 2007; ZOUBIRI et al., 2014). Esses compostos podem ser encontrados em diferentes partes da planta. Em folhas, caules e sementes, a partir da técnica de cromatografia gasosa é possível encontrar cerca de 37 tipos de compostos voláteis e os principais compostos foram trans-anetol (68,6 a 75%), fenchona (8,4 a 14,7%) e metilchavicol (5,09 a 9,10%), de acordo com Guillém e Manzanos (1996). Dependendo da técnica utilizada para o reconhecimento destes compostos os valores percentuais podem variar. Damjanovic et al. (2005) caracterizaram 19 compostos por meio de óleo hidrodestilado, Fang et al. (2006) listaram 76 componentes com o auxílio de três técnicas complementares entre si, tais são: microextração com solvente headspace seguida de cromatografia gasosa e espectrometria de massa, microextração em fase sólida e métodos de destilação a vapor.

Os frutos da erva-doce apresentam, aproximadamente, 20 % de ácidos graxos, sendo o ácido petroselinico um composto bem comum na composição bioquímica dessa planta podendo variar entre 70 a 80 % em representatividade (CHARVET; COMEAU; GAYDOU, 1991). Os ácidos linoleico, palmítico e oleico, respectivamente com 54,9; 5,4 e 5,4% são outros compostos considerados importantes na composição da erva-doce (SINGH et al., 2006). O extrato aquoso desta planta também apresenta compostos importantes e muito deles demonstram atividades antioxidantes, à exemplos os ácidos cafeoilquínico, odicafeoilquínico, rosmarínico, eriodictiol-orutinósido, quercetina-galactósido entre outros (PAREJO et al., 2004; HE; HUANG, 2011).

Além de características oxidantes as propriedades da erva-doce apresentam ações estimulantes que combate espasmos musculares (KHAN et al., 2009), atividades analgésicas, antiinflamatórias e antialérgicas, (CHOI; HWANG, 2004) e comportamento antimicrobiano a partir do óleo essencial (RUBERTO et al., 2000). Joshi (2006) relatou resultados promissores sobre o efeito amnésico da escopolamina, além de atividade antienvhecimento e manutenção da perda de memórias e o autor destaca que pode ser útil para o tratamento de distúrbios cognitivos, por exemplo a demência e o Alzheimer.

A mancha de alternaria

A maioria das espécies são patógenos foliares, causando lesões necróticas como manchas marrons ou pretas com o fungo localizado na área central. Não raro é possível observar a ação do fungo induzindo o crestamento das folhas. Espécies hospedadas em sementes podem atacar as plântulas, resultando em tombamento, lesões no caule ou podridão do colo. Lesões afundadas e escuras estão presentes em infecções de raízes, tubérculos, caules e frutos, sintomas típicos de doenças pós-colheita. (LAWRENCE et al. 2008; MARIN-FELIX et al. 2019).

O ciclo da doença é simples (Figura 1) uma vez que nenhum teleomorfo esteja relacionado. Os conidióforos emergem através das lesões e/ou estômatos das folhas infectadas que permanecem na planta ou no substrato. Os conídios são liberados por eventos de chuva ou mudanças bruscas de umidade relativa (TIMMER et al., 1998). São facilmente dispersos por correntes de vento e gotas de chuva, sendo depositados na superfície de frutos e folhas suscetíveis. Os conídios germinam na presença de umidade e a infecção é tão intensa quanto a duração do molhamento foliar (CANIHOS et al., 1999).

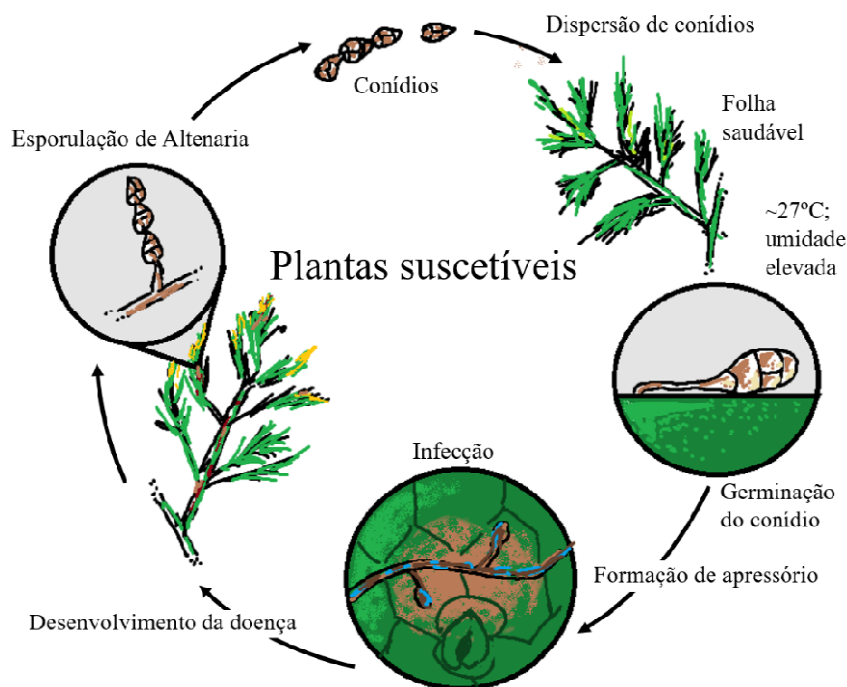


Figura 1. Ciclo da doença da mancha marrom de *Alternaria* em erva-doce. Fonte: Autor.

O gênero *Alternaria* é conhecido por sua capacidade de sintetizar metabólitos secundários, alguns denominados micotoxinas, como o alternariol (AOH), alternariolmonometil éter (AME), ácido tenuazônico (TeA), altenueno (ALT) e altertoxinas I, II, III (ATX-I, -II, -III) (ALEXANDER et al., 2011). Outros compostos bioativos importantes produzidos por este fungo incluem a tentoxina (TEN) e a dihidrotentoxina (DHTEN), ambas com atividades fitotóxicas; altenuisol (ALS), que tem efeitos tóxicos em células de mamíferos *in vitro* e altenusina (ALN), com atividades antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (LOU et al., 2013).

Fitotoxinas são produzidas durante o processo de invasão como fatores de virulência e afetam um vasto número de espécies vegetais. As toxinas de *Alternaria* se difundem nos tecidos do hospedeiro, resultando em um halo clorótico ou amarelo ao redor das lesões, atribuindo aos sintomas ainda maior gravidade (SINGH et al. 2015).

Durante o processo infeccioso, fungos conhecidamente produtores de micotoxinas como subproduto de seu metabolismo, podem incidir na contaminação de outros organismos consumidores daquelas plantas hospedeiras do patógeno. Embora as evidências sobre a toxicidade das micotoxinas de *Alternaria* em animais e humanos sejam relatadas, regulamentos específicos em relação às toxinas de *Alternaria* ainda não foram estabelecidas em nível mundial (SOMMA et al., 2019). Algumas dessas fitotoxinas foram avaliadas pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar como potencialmente causadoras de riscos à saúde humana (MEENA et al. 2017), no entanto, no Brasil não há registro relevante sobre o efeito dessas toxinas e, como consequência, não existe grande rigidez no controle sanitário de produtos agrícolas contaminados.

O fungo patogênico *Alternaria* sp. ataca tanto as folhas quanto os caules da erva-doce e, portanto, a pulverização foliar de fungicidas pode ser benéfica no controle da doença (KHALEQUZZAMAN, 2020). Embora existam relatos de manejo para evitar a dispersão da doença no campo como evasão do plantio de variedades suscetíveis em campos infectados de uma safra anterior com resíduos retidos na superfície (MAMGAIN et al, 2013).

O gênero *Alternaria*

De acordo com a descrição feita por Marin-Felix et al. (2019), a morfologia do gênero *Alternaria* é caracterizada por:

Ascomatas pequenos, solitários a agrupados, erupcentes a quase superficiais na maturidade, marrom escuro, globosos a ovóides, papiladosapicalmente, ostiolados, lisos ou cerosos na maturidade, com parede ascomatal fina; centro formado por um hematécio com pseudoparáfises celulares e ascos na camada basal. Ascos bitunicados, fissitunicados, uni ou bisseriados, de 4 a 8 esporos, cilíndricos a cilindro-clavados, retos ou um tanto curvos, com pedicelo furcado curto. Ascósporos elipsóides a fusóides, muriformes, levemente constrictos nos septos, 3-7 septos transversais, 1-2 séries de septos longitudinais através dos dois segmentos centrais originais, células terminais sem septos, ou com um septo longitudinal ou oblíquo, ou com um Y par de septos arredondados, castanho-amarelados, de paredes lisas, sem vísceras. Conidióforos macronematosos ou semi-macronematosos, mononematosos, simples ou ramificados, castanho-claros ou castanhos. Células conidiogênicas integradas, terminais tornando-se intercalares, mono ou politréticas e simpodiais, cicatrizadas. Conídios solitários ou em cadeias simples ou ramificadas, secos, ovóides, obovóides, cilíndricos, estreitamente elipsóides ou obclavados, rostrados ou não rostrados, castanho-oliváceos pálidos ou médios a castanhos, de paredes lisas ou verrucosas, com transversos e com ou sem oblíquos ou septos longitudinais; septos podem ser espessos, escuros, uma estrutura interna semelhante a uma célula pode ser formada. Espécies com crescimento meristemático são conhecidas (MARIN-FELIX et al., 2019).

Quanto às características das colônias formadas em meios de cultura podem-se observar colônias efusas, cinzentas, marrom-oliváceas, marrom-escuras escuras ou pretas; micélio imerso ou parcialmente superficial, composto por hifas incolores, oliváceas, marrons ou marrons (SIMMONS, 2017; MARIN-FELIZ et al., 2019). A maioria das espécies de *Alternaria* não possui fase teleomórfica conhecida e eram geralmente classificadas na divisão dos fungos mitospóricos (em desuso) (THOMMA, 2003).

Historicamente o gênero *Alternaria* foi descrito por Nees von Esenbeck, no início do século XIX, tendo *A. tenuis* como a espécie tipo. No então, diversas inconsistências na classificação e alterações de nomenclatura das espécies de *Alternaria* ao longo dos anos levaram a um quadro de incertezas sobre a real posição taxonômica dos espécimes descritos

dentro desse grupo e desde então a taxonomia de *Alternaria* tem sido contestada (WOUDENBERG et al., 2015; LAWRENCE et al., 2016).

Inicialmente a identificação de espécies de *Alternaria* era obtida por meio de métodos baseados em padrões de esporulação e morfologia conidial, como observado nas descrições de Emory Guy Simmons (SIMMONS, 2007), que contribuiu amplamente na descrição de vários grupos de espécies que foram tipificados por espécies representativas anos depois (LAWRENCE et al., 2016). No entanto, atualmente, com base em abordagens filogenéticas moleculares usando dados de sequências de DNA, foi demonstrado que os principais grupos morfológicos identificados por Simmons representam grupos de espécies monofiléticas (LAWRENCE et al. 2008; MARIN-FELIX et al. 2019).

Após a divulgação do trabalho de Pryor e Gilbertson (2000), que descreve organização em espécies-grupo, diversos estudos posteriores (HONG et al. 2005; LAWRENCE et al. 2013) descrevem nove espécies-grupos de *Alternaria*: *A. alternata*, *A. alternantherae*, *A. brassicicola*, *A. gypsophylae*, *A. infectoria*, *A. panax*, *A. porri*, *A. radicina* e *A. sonchi*. Ao mesmo tempo, Lawrence (2013) eleva oito dessas espécies-grupo para a condição de seção, cada uma com uma espécie tipo, e em seguida esse número é elevado novamente para 27 seções (WOUDENBERG et al. 2015; LAWRENCE et al., 2016;), e mais recentemente para 28 seções e oito linhagens isoladas (GHAFRI et al. 2019; MARIN-FELIX et al. 2019).

Dentre estas seções fazemos destaque para a seção *Alternaria*, que contém a maioria das espécies de *Alternaria* com conídios pequenos, incluindo a espécie tipo do gênero, *Alternaria alternata*. Esta seção agrupa, atualmente, 11 espécies, a saber, *A. alternata*, *A. alternantherae*, *A. burnsii*, *A. tomato*, *A. jacinthicola*, *A. iridiaustralis*, *A. eichhorniae*, *A. betae-kenyensis*, *A. gaisen*, *A. alstroemeriae*, *A. longipes* e *A. gossypina*, e um complexo formado pela espécie *A. arborescens* (WOUDENBERG et al. 2015). No entanto, não há consenso sobre essa divisão.

A constatação de que o gênero *Alternaria* não está nem resolvido filogeneticamente gera então a necessidade de realização de estudos comparativos de regiões diversas do DNA do fungo, permitindo com isso, precisarmos quais são de fato os agrupamentos dentro do gênero que estão presentes em patossistemas de relevância agronômica.

Controle Químico

Embora não haja relatos de controle químico específico para infecções de alternaria na cultura de erva-doce, é possível encontrar indicações de tratamento com pulverizações foliares de fungicidas à base de cobre (Tabela 2) para controlar e reduzir a gravidade da doença em campo de citrus (STUART et al. 2009). Considerando que a incidência da doença está relacionada às condições ambientais (umidade, calor e umidade), acaba sendo necessário realizar diversas aplicações de fungicidas para um controle adequado (TIMMER et. al, 2003).

Tabela 2. Fungicidas efetivos contra *Alternaria alternata* (STUART et al. 2009).

Grupo	Nome comum
Cúpricos	Oxicloreto de cobre
	Sulfato de cobre
	Hidróxido de cobre
	Óxido cuproso
Ditiocarbamatos	Mancozeb
	Propineb
Dicarboximidas	Ipridiona
	Proximidona
Estrobirulinas	Piraclostrobina
	Trifloxistrobina
Canozois	Difenoconazol
	Tebuconazole

Os ingredientes ativos Difenoconazol (triazol), flutriafol (triazol), pirimidina (anilinoimidinas), procimidona (dicarboximida) e tiofanato-metílico (benzimidazol) têm sido largamente estudados sobre sua utilização no controle de muitos fungos fitopatogênicos, incluindo espécies do gênero *Alternaria* (CHEN et al., 2020; MUNKVOLD et al., 2001, WANG & ZHANG, 2018, ZHOU et al., 2016).

Os fungicidas difenoconazol e flutriafol possuem ação sistêmica rápida e proeminente e por isso são utilizados mundialmente nos sistemas agrícolas (GE et al., 2019; Romero et al., 2020). Ambos atuam pela inibição da desmetilação durante a síntese do ergosterol 14 α -demethylase (CYP51), bloqueando a biossíntese da parede celular fúngica (MU et al., 2015, MAURYA et al., 2019). Produtos à base de difenoconazol e flutriafol têm sido utilizados, mundialmente, no controle químico de muitas doenças em cultivos agrícolas de cereais,

vegetais e frutas (HE et al., 2019, KONGCHAROEN et al., 2020, ZHENG et al., 2013). Os defensivos químicos pertencentes ao grupo triazol apresentam alta estabilidade fotoquímica e baixa biodegradabilidade e, por isso, possuem moléculas com a capacidade de permanecer persistentemente no solo e na água (MU et al., 2015).

No Brasil, são mais de 30 produtos à base de difenoconazol e aproximadamente 25 a base de flutriafol regulamentados para o uso em diversos cultivos. O difenoconazol (Score) é regulamentado para o controle de *A. porri* em alho; *A. cichorii* e *A. sonchi* em almeirão e chicória; *A. brassicae* em couve-flor, rúcula, mostarda e seriguela; e *A. solani* em tomate. O flutriafol (Tenaz 250 SC) é regulamentado no controle de: *A. solani* em batata e tomate; *A. alternata* em batata yacon, romã e tomate; *A. tenuis* em beterraba; e outras espécies incidentes em mandioquinha, girassol, rabanete e romã (MAPA, 2021)

O químico procimidona é um fungicida sistêmico de ação protetiva e curativa. No Brasil, ele é regulamentado para o controle de muitas espécies de fungos fitopatogênicos, incluindo *A. solani* em batata e tomate, *A. dauci* em cenoura e *A. porri* em cebola (MAPA, 2021). Ele atua diretamente sobre a enzima histidina quinase (HK), envolvida na cascata de sinalização do processo de transdução da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK). Nessa cascata de sinais, a proteína MAPK age como receptor de estímulos extracelulares e como reguladora da homeostase osmótica intracelular (LUO et al., 2012, REN et al., 2016, WANG et al., 2021). As dicarboximidazidas são protetores de baixa fitotoxicidade e curtos períodos de retenção e, por isso, amplamente usados perto da colheita (BERESFORD et al., 1996).

O pirimetanil inibe a biossíntese de metionina, de outros aminoácidos e da secreção de enzimas hidrolíticas da parede celular, afetando diretamente os mecanismos envolvidos no processo de infecção fúngica (SMILANICK et al., 2006). No Brasil, este fungicida é regulamentado para o controle de *A. alternata* em batata, berinjela, jiló, pimentão e tomate; *A. porri* em cebola e *A. dauci* em cenoura (MAPA, 2021). Fungicidas do grupo anilinopirimidina são considerados fungicidas de alto nível de controle com médio risco de resistência fúngica (BUDDE-RODRIGUEZ et al., 2022)

O tiofanato-metílico é um benzimidazol (carbamato de metil) utilizado pelo método de pulverização ou imersão, no controle de doenças fúngicas, incluindo doenças pós-colheita (ZHOU et al., 2016). As moléculas pertencentes a esse grupo atuam ligando-se a β -tubulina

fúngica e interrompendo o processo de agrupamento e montagem dos microtúbulos, o que por sua vez, provoca um bloqueio de divisão nuclear/celular durante os processos de mitose ou meiose fúngica (CHEN et al., 2020, ZHAN et al. 2014). Produtos pertencentes ao grupo benzimidazol apresentam atividade inibitória eficaz, e por isso são importantes no controle de fungos patogênicos (HOSAMANI; SHINGALAPUR, 2011; ZHOU et al., 2016).

No ano de 2018, durante os estudos que fundamentas esse trabalho, o fungo *Alternaria* foi observado em associação com plantas de erva-doce após informações prestadas por agricultores da cidade de Esperança, Paraíba, e confirmada em uma visita de campo realizada pelo Prof. Dr. Delson Laranjeira responsável pelo laboratório de Fungos de Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Assim, considerou-se fundamental o estudo deste patossistema (*Alternaria* x erva-dove) a fim de identificar e reconhecer as espécies do fungo associadas à cultura capazes de desencadear sintomas de mancha foliar, preenchendo assim a lacuna existente devido a ausência de relatos e estudos sobre esse patossistema. Os resultados desse trabalho poderão orientar estudos epidemiológicos, e a partir destes, desenvolver medidas de controle efetivas contra cada espécie ou grupo de espécies predominantes em cada cultura.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J. et al. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. **EFSA Journal**. v. 9, n. 10, p. 2407–2504, 2011. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>
- AL-SNAFI, A. E. The chemical constituents and pharmacological effects of *Foeniculum vulgare* - A review. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 8, n. 5, p. 81-96, 2018.
- AKGÜL, A.; BAYRAK, A. Comparative volatile oil composition of various parts from Turkish bitter fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). **Food Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 319-323, 1988.
- AZEVEDO, C.F. et al. Aspectos anatômicos de plântulas *Foeniculum vulgare* Mill. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.14, p. 197-204, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000500013>
- BADGUJAR, S. B.; PATEL, V. V.; BANDIVDEKAR, A. H. *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. **Bio Med Research International**, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/842674>
- BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA; I. C. The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 5, p. 814-818, 2010.
- BERESFORD, R.; PAK, H. A.; BRAITHWAITE, M.; SURMAN, C. Dicarboximide resistance management strategy. In: BOUDOT, G. W.; SUCKLING D. M. (ed.). **Pesticide resistance: prevention and management**. New Zealand Plant Protection Society: Rotorua, New Zealand, pp. 139-141, 1996.
- BERNÁTH, J.; NEMETH, E.; KATTAA, A.; HETHELYI, E. Morphological and chemical evaluation of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) populations of different origin. **Journal of essential oil research**, v. 8, n. 3, p. 247-253, 1996. <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700610>
- BUDDE-RODRIGUEZ, S.; PASCHE, J. S.; MALLIK, I.; GUDMESTAD, N. C. Sensitivity of *Alternaria* spp. from potato to pyrimethanil, cyprodinil, and fludioxonil. **Crop Protection**, v. 152, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105855>

- CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L. ;CIRIC, A.; SOKOVIĆ, M.; OLIVEIRA, M. B. P.; FERREIRA, I. C. *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. **Journal of functional foods**, v. 12, p. 428-438, 2015.
- CANIHOS, Y.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola tangelo* leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, v.83, p.429–433, 1999.
- CARVALHO, L.M. Erva-doce: *Foeniculum vulgare* Mill. ou *Pimpinella anisum* L.?. **Revista Cultivar**, 2009. (Revista eletrônica) Disponível em: <https://www.grupocultivar.com.br/noticias/artigo-erva-doce-foeniculum-vulgare-mill-ou-pimpinella-anisum-l->. Acesso em: 21 jul. 2021.
- CHARVET, A. S.; COMEAU, L. C.; GAYDOU, E. M. New preparation of pure petroselinic acid from fennel oil (*Foeniculum vulgare*). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, n.8, p. 604-607, 1991.
- CHEN, F.; TSUJI, S. S.; Li, Y.; BANDEIRA, M. A.; CÂMARA, M. P. S; MICHEREFF, S. J.; SCHNABEL, G. Reduced sensitivity of azoxystrobin and thiophanate-methyl resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 162, p. 60-68, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.08.008>
- CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. **Fitoterapia**, v. 75, n.6, p. 557-565, 2004.
- DAMJANOVIC, B.; LEPOJEVIC, Z.; ZIVKOVIC, V.; TOLIC, A. Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation. **Food Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 143-149, 2005.
- DÍAZ-MAROTO, M.C.; HIDALGO, I.J.D.; SÁNCHEZ-PALOMO, E.; PÉREZ-COELLO, M.S. Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation – extraction and supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 5385-5389, 2005. <https://doi.org/10.1021/jf050340+>

DUA, A.; GARG, G.; MAHAJAN, R. Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). **European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 4, p. 203-208, 2013.

FANG, L.; QI, M.; LI, T.; SHAO, Q.; FU, R. Headspace solvent microextraction – gás chromatography – mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.41, n.3, p. 791-797, 2006.

GHAFFRI, A.A.; MAHARACHCHIKUNBURA, S.S.; HYDE, K.D.; NADIYA, A.A.S.; ABDULLAH, M.A.S. A new section and a new species of *Alternaria* encountered from Oman. **Phytotaxa**, v. 405, p. 279–289, 2019. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.405.6.1>

GAMA, J.S.N. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) armazenadas. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.14, p. 175-182, 2012.

GE, J.; CUI, K.; YAN, H.; LI, Y.; CHAI, Y.; LIU, X.; et al. Up take and translocation of imidacloprid, thiamethoxam and difenoconazole in rice plants. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 479-485, 2017. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.043>

GUILLEN, M. D.; MANZANOS, M. J. A study of several parts of the plant *Foeniculum vulgare* as a source of compounds with industrial interest. **Food research international**, v. 29, n.1, 85-88, 1996.

HE, W.; HUANG, B. Uma revisão da química e bioatividades de uma especiaria medicinal: *Foeniculum vulgare*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.16, p. 3595-3600, 2011.

HE, M.; WANG, Y.; WU, E.; SHEN, L.; YANG, L.; WANG, T.; SHANG, L.; ZHU, W.; ZHAN, J. Constraining evolution of *Alternaria alternata* resistance to a demethylation inhibitor (DMI) fungicide difenoconazole. **Frontiers in Microbiology**, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01609>

HONG, S.G.; CRAMER, R.A.; LAWRENCE, C.B.; PRYOR, B.M. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 119–129, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.10.009>

HOSAMANI, K. M.; SHINGALAPUR, R. V. Synthesis of 2-mercaptobenzimidazole derivatives as potential anti-microbial and cytotoxic agents. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences**, v. 344, n. 5, p. 311-319, 2011.

<https://doi.org/10.1002/ardp.200900291>

KAUR, G. J.; ARORA, D. S. Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. **BMC complementary and alternative medicine**, v.9, n. 1, p. 1-10, 2009.

KHALEQUZZAMAN, K.M. Effect of fungicides in controlling *Alternaria* leaf and umbel blight to fennel. **Bangladesh Journal of Plant Pathology**, Bangladesh, v. 36, p. 55-60, 2020.

KHAN, I.A.; ABOURASHED, E.A. **Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food Drugs and Cosmetics**, 3 ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., p. 183-186, 2009.

KHANDELWAL, K. R. Preliminary phytochemicals screening. In: KHANDELWAL, K. R. **Practical Pharmacognosy – Techniques and Experiments**. Nirali Prakashan: Pune, India, pp. 149-156, 2001.

KONGCHAROEN, N.; KAEWSALONG, N.; DETHOUP, T. Efficacy of fungicides in controlling rice blast and dirty panicle diseases in Thailand. **Scientific Reports**, v.10, 2020.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73222-w>

KOPPULA, S.; KUMAR, H. *Foeniculum vulgare* Mill (*Umbelliferae*) attenuates stress and improves memory in wisterrats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 4, p. 553-558, 2013.

KRISHNAMURTHY, K. H. Medicinal plants: Madhurika, saunf or fennel (*Foeniculum vulgare*, Gaertn). **Journal of New Approaches to Medicine and Health**, v. 19, n. 1, p. 1-4, 2011.

KWON, Y.S. et al. Antimicrobial constituents of *Foeniculum vulgare*. **Archives of Pharmacal Research**, South Korea, v.25, n.2, p.154-7, 2002.

LAWRENCE, C.B.; MITCHELL, T.K.; CRAVEN; K.D., et al. At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. **The Plant Pathology Journal**, v. 24, p. 101–111, 2008.

<https://doi.org/10.5423/PPJ.2008.24.2.101>.

LAWRENCE, D.P.; GANNIBAL, P.B.; PEEVER, T.L.; PRYOR, B.M. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. **Mycologia**, v. 105, p. 530–546, 2013.

<https://doi.org/10.3852/12-249>

LAWRENCE, D. P.; ROTONDO, F; GANNIBAL, P. B. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress, German*, v. 15, n. 3, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s11557-015-1144-x>

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LOU, J., FU, L., PENG, Y., ZHOU, L. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. **Molecules**, v. 18, n.5, p. 5891–5935, 2013.

<https://doi.org/10.3390/molecules18055891>

LUO, Y.; YANG, J.; ZHU, M. L.; LIU, C. J.; LI, H. Y.; LU, Z., et al. The group III two-component histidine kinase AlHK1 is involved in fungicides resistance, osmosensitivity, spore production and impacts negatively pathogenicity in *Alternaria longipes*. **Current Microbiology**, v.64, p. 449–456, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0093-8>

MAMGAIN, A.; ROYCHOWDHURY, R.; TAH, J. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. **Research Journal of Biology**, v. 1. p. 1–9, 2013.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários 2021. MAPA website. Brasil: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 10 outubro 2021.

MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. **Studies in mycology**, v. 94, p. 1–124, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2019.05.001>.

MAURYA, R.; DUBEY, K.; SINGH, D.; JAIN, A. K.; PANDEY, A. K. Effect of difenoconazole fungicide on physiological responses and ultrastructural modifications in model organism *Tetrahymena pyriformis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109375>

MEENA, M., GUPTA, S.K., SWAPNIL, P. et al. Alternaria toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1451, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01451>

MEHRA, N.; TAMTA, G.; NAND, V. A review on nutritional value, phytochemical and pharmacological attributes of *Foeniculum vulgare* Mill. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 10, n. 2, p. 1255-1263, 2021.

MU, X.; WANG, K.; CHAI, T.; ZHU, L.; YANG, Y.; ZHANG, J.; PANG, S.; WANG, C.; LI, X. Sex specific response in cholesterol level in zebrafish (*Danio rerio*) after long-term exposure of difenoconazole. **Environmental Pollution**, v. 197, p. 278-286, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.11.019>

MUNKVOLD, G. P., MARTINSON, C. A., SHRIVER, J. M.; DIXON, P. M. Probabilities for profitable fungicide use against gray leaf spot in hybrid maize. **Phytopathology**, v. 91, n. 5, p. 477-484, 2001. <http://10.1094/PHYTO.2001.91.5.477>

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BURILLO, J.; CODINA, C. Bioguide disolation and identification of the non volatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.52, n.7, p. 1890-1897, 2004.

POURABBAS, S.; KESMATI, M.; RASEKH, A. Study of the anxiolytic effects of fennel and possible roles of both gabaergic system and estrogen receptors in these effects in adult female rat. **Physiology and Pharmacology**, v. 15, n.1, p. 134-143, 2011.

PRYOR, B.M.; GILBERTSON, R.L. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. **Mycological Research**, v. 104, p. 1312–1321, 2000.

<https://doi.org/10.1017/S0953756200003002>

RATHER, M. A.; DAR, B. A.; SOFI, S. N.; BHAT, B. A.; QURISHI, M. A. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n.2, p. 1574-1583, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.011>

REN, W.; SHAO, W.; HAN, X.; ZHOU, M.; CHEN, C. Molecular and biochemical characterization of laboratory and Field mutants of *Botrytis cinerea* resistant to fludioxonil. **Plant Disease**, v. 100, n. 7, p. 1414-1423, 2016. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1290-RE>

ROMERO, P. I. A.; MACHADO, J. P. H.; MIZUBUTI, E. S.; SANDOVAL, N. S. E.; FERREIRA, A. F. T. A. A Pinta Preta (*Alternaria grandis*) - a inimiga da bataticultura brasileira. The Early Blight (*Alternaria grandis*) – the brazilian potato crop enemy. **Revista Agrária Acadêmica**, v. 3, n.4, p. 57-65, 2020. <http://doi.org/10.32406/v3n42020/57-65/agrariacad>

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T.; DEANS, S. G.; DORMAN, H. D. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta medica**, v. 66, n.08, p. 687-693, 2000.

SANTOS, J.M. **Pesquisa de matérias estranhas em espécie vegetal, *Pimpinella anisum* L., para o preparo de “chá”**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, R.L. et al. Contaminação fúngica de plantas medicinais utilizadas em chás. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.2, p. 289-293, 2013.

SIMMONS, E.G. *Alternaria*. An identification manual. In: **CBS biodiversity series 6**. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, 2007.

SINGH, G.; MAURYA, S.; DE LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. **Food control**, v.17, n.9, p. 745-752., 2006.

SINGH, V. et al. *Alternaria* diseases of vegetable crops and its management control to reduce the low production. **International Journal of Agriculture Sciences**, v. 7, p. 834–840, 2015.

SMILANICK, J. L.; MANSOUR, M. F.; GABLER, F. M.; GOODWINW, W. R. The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus Green mold after harvest. **Postharvest Biology and Technology**, v.41, p. 75-85, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.05.008>

- SOMMA, S, et al. *Alternaria* species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.293, p. 34–43, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.001>
- STUART, R.M.; BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F.A.; MACHADO, M.A. *Alternaria* brown spot. **Laranja**, Cordeirópolis, v.30, n.1-2, p.29-44, 2009.
- TIMMER, L.W.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T.R.; IBÁÑEZ, A.M. & ZITKO, S.E. Environmental factors affecting production, release, and Field production of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. **Phytopathology**, v.88, p.1218–1223, 1998.
- TIMMER, L.W.; PEEVER, T.L.; SOLEIL, Z. & AKIMITSU, K. *Alternaria* diseases of citrus – Novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v.42, p.99-112, 2003.
- TOGNOLINI, M.; BALLABENI, V.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; IMPICCIATORE, M.; BAROCELLI, E. Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. **Pharmacological research**, v. 56. n. 3, p. 254-260, 2007.
- THOMMA, B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular plant pathology**, v.4. n.4, p. 225–236, 2003.
- WANG, H. C.; ZHANG, C. Q. Multi-resistance to thiophanate-methyl, diethofencarb, and procymidone among *Alternaria alternata* populations from tobacco plants, and the management of tobacco brown spot with azoxystrobin. **Phytoparasitica**, v. 46, p. 677-687, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12600-018-0690-6>
- WANG, B.; LOU, T.; WEI, L.; CHEN, W.; HUANG, L. et al. Biochemical and molecular characterization of *Alternaria alternata* isolates highly resistant to procymidone from broccoli and cabbage. **Phytopathology Research**, v. 3. n. 15, 2021. <https://doi.org/10.1186/s42483-021-00092-z>
- WOUDENBERG, J.H.C.; SEIDL, M.F.; GROENEWALD, J.Z. et al., *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? **Studies in Mycology**. v. 82, p. 1–21, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>

ZHAN, J.; WU E, L.X.; CHEN, F. Molecular basis of resistance of phytopathogenic fungi to several site-specific fungicides. **Agricultural Sciences in China**, 2014.

<https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2014.17.007>

ZHENG, H. H.; WANG, T. Y.; ZHAO, J.; WU, X. H. Research progress on potato early blight and its integrated control. **China Plant Protection**, v. 33, p. 18–22, 2013.

ZHOU, Y.; XU, J.; ZHU, Y.; DUAN, Y.; ZHOU, M. Mechanism of Action of the Benzimidazole Fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with Polymerization of Monomeric Tubulin But Not Polymerized Microtubule. **Disease Control and Pest Management**, v. 106, n. 8, p. 807-813, 2016. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0186-R>

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A.; SEBA, N.; CHAMOUNI, N. Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n.4, p. 480-485, 2014.

Capítulo II

Alternaria species associated with leaf spot of fennel: phylogeny and pathogenicity

1 **Alternaria species associated with leaf spot of fennel: phylogeny and pathogenicity**

2 Marcelo Garcia de Oliveira^{1*}; Iwanne Lima Coelho¹; Sérgio Batista Ramos²; Josiene Silva
3 Veloso¹; Marcos Paz Saraiva Câmara¹; Willie Anderson Vieira¹; Delson Laranjeira^{1*}

4 ¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois
5 Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brazil.

6 ² Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Anenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade
7 Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil.

8 * Corresponding authors: E-mail address: marcelopb1bio@gmail.com (Marcelo Garcia de
9 Oliveira); delson.laranjeira@ufrpe.br (Delson Laranjeira).

10 **Abstract**

11 Fennel, *Foeniculum vulgare* Mill, is frequently attacked by fungi that cause leaf spots in the
12 Northeastern of Brazil. The *Alternaria* genus stand out among the main organisms causing the
13 reduction of the photosynthetic area of these plants. In Brazil there is no record of which
14 species are associated with the *Alternaria* leaf spot of fennel. Although the taxonomy of
15 *Alternaria* spp. has been discussed widely the scientific consensus hasn't been established
16 about this theme to date. In this study, phylogenetic analysis revealed that *Alternaria* spp.
17 causing leaf spot on fennel were associated with four well-supported evolutionary lineages,
18 with emphasis on *A. alternata* and *A. jacinthicola* species. Isolates recovered from brown spot
19 lesions in *Foeniculum vulgare* were closely related to isolates identified in other cultures and
20 available for Access on GenBank. Phylogenies estimated independently from DNA sequence
21 data for genes from an anonymous region of the genome (OPA 10-2), endopolygalacturonase
22 (endoPG), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), e alternaria major allergen

23 gene (Alt a 1) had topologies similar, and phylogenetic analysis was performed on the
24 combined dataset. Isolates from all obtained haplotypes caused leaf spot in leaf inoculation
25 trials, demonstrating that small spore *Alternaria* isolates, *Alternaria* section, are potential
26 disease-causing agents in fennel.

27 Keywords: *Alternaria* leaf spot; *Foeniculum vulgare* Mill; Phylogenetic analysis; Species
28 identification.

29 **Resumo**

30 No Nordeste do Brasil, a erva-doce, *Foeniculum vulgare* Mill, comumente sofre ataques de
31 fungos causadores de manchas foliares. O gênero *Alternaria* tem destaque como causador de
32 doenças pela redução da área fotossintética da planta. No Brasil não há registro de quais
33 espécies estão associadas com a mancha de *Alternaria* em erva-doce. Embora a taxonomia de
34 *Alternaria* spp. tenha sido bem discutida na atualidade, não há consenso científico sobre esse
35 tema até o momento. Neste estudo, análises filogenéticas revelaram que a mancha foliar
36 causada por *Alternaria* spp. em erva-doce foram associadas com quatro linhagens evolutivas
37 bem suportadas, com destaque para a as espécies *A. alternata* and *A. jacinthicola*. Isolados
38 recuperados de lesões presentes em plantas de *Foeniculum vulgare* foram comparados com
39 isolados identificados em outras culturas agrícolas e disponibilizados para acesso no GenBank.
40 Filogenias estimadas de forma independente a partir de dados de sequências de DNA de uma
41 região anônima do genoma (OPA 10-2), endo-poligalacturonase (endoPG), gliceraldeído-3-
42 fosfato desidrogenase (GAPDH), and *alternaria* major allergen gene (Alt a 1) tiveram
43 topologias semelhantes, e análises filogenéticas foram realizadas em um dataset combinado
44 (concatenado) de todos os genes. Isolados de todas as haplotipos identificados causaram
45 sintomas no teste de inoculação em folhas realizado, demonstrando que isolados de *Alternaria*

46 de esporos pequenos, dentro da seção *Alternaria*, são de fato os agentes causadores de doença
47 em erva-doce.

48 Palavras-chave: Análises filogenéticas; *Foeniculum vulgare* Mill; Identificação de espécies;
49 Mancha de *Alternaria*.

50 **Introduction**

51 Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) is a popular aromatic herb crop belonging to the
52 Apiaceae family, it is economically important in the Northeast region of Brazil. Dried fennel
53 seeds can be used as a food ingredient. Leaves and oil extract are used as input to obtain
54 medicinal and aromatic products (Rather et al., 2016). The adaptation of this botanical species
55 to the tropical weather favors the production in south-center and northwest states (Brazil,
56 2015).

57 Fennel is frequently attacked by fungi that cause leaf spots. Among the main
58 organisms causing the reduction of the photosynthetic area of these plants, the fungi of the
59 *Alternaria* genus stand out (Bessadat, 2021; Mamgain et al. 2013). Representatives species of
60 the *Alternaria* genus are capable of causing disease in more than 100 plant species that can
61 infect the entire aerial part, mainly leaves and fruits (Armitage, 2015). However, in Brazil
62 there is no record of which species are associated with the *Alternaria* leaf spot on fennel.

63 The fungus *Alternaria*, class *Dothideomycetes*, are a cosmopolitan fungi with diverse
64 lifestyles, which can associate with a wide range of hosts and substrates (Haridas et al, 2020).
65 That group occupies several ecological niches, including endophytic, saprophytic and
66 pathogenic species. The majority of *Alternaria* species are animal and plant pathogens (Hong
67 and Pryor, 2004) causing extensive yield losses in agriculture, especially in pre- and post-
68 harvest conditions (Peever et al., 2007; Siciliano et al., 2018).

69 Symptoms start with the formation of small, brownish spots on lower leaves that
70 enlarge and develop concentric rings. Leaves turn yellow and plants may defoliate (Mamgain
71 et al. 2013). The pathogens spread progressively to other plants or parts of the same plant
72 such as the stems and fruits, where they may initiate new infections (Bessadat, 2021). Leaf
73 spot in fennel also initially develops on lower leaves with dark-brown lesions, but there is no
74 ring formation.

75 Thus, the objectives of the present study were: to identify by molecular methods the
76 species associated with leaf spot of alternaria on fennel and to determine the aggressiveness of
77 the identified species;

78 **Materials and Methods**

79 **Pathogen isolation**

80 Leaves and inflorescences of fennel with symptoms of *Alternaria* leaf spot were
81 collected in fields located in the counties of Remígio and Esperança, on Paraíba State,
82 Garanhuns and Paranatama, on Pernambuco State. Isolations and obtaining the monosporic
83 cultures of the isolates were carried out as described below. Spores were observed in
84 stereoscopic microscope, removed from each sample with the aid of surgical needles and
85 deposited in Petri dishes containing PDA culture medium (200g potato; 20g dextrose; 20g of
86 agar in 1L of distilled water). The plates were incubated at 25°C for the development of the
87 fungus for 7 days. Isolates with morphological characteristics similar to the *Alternaria* genera
88 (Simmons, 2007) were subcultured and preserved by the Castellani method (Castellani, 1967)
89 and in tubes containing mineral oil, and stored in the private fungal collection of the Soil
90 Fungus Laboratory at the Universidade Federal Rural de Pernambuco.

91 **DNA extraction, PCR amplification and sequencing**

92 Total genomic DNA of the isolates was extracted from fresh mycelia grown on PDA
93 for 7 days at 27°C in a 12h photoperiod. Fungal mycelium was scraped off the colony surface
94 of cultures with a sterile scalpel and DNA was isolated using the CTAB
95 (cetyltrimethylammonium bromide) extraction protocol described by Doyle and Doyle (1990)
96 with modifications. DNA quality and quantity were estimated visually on a 0.8% agarose gel.

97 The anonymous gene region (OPA10-2) was sequenced for all isolates to assess the
98 initial diversity. DnaSP 4.0 (Rozas et al. 2003) program was used to identify haplotypes.
99 Isolates representatives from each haplotype were randomly chosen [JSV1] and subjected to a
100 multilocus analysis, which involved: endopolygalacturonase (endoPG), glyceraldehyde-3-
101 phosphate dehydrogenase (GAPDH) and alternaria major allergen gene (Alt a 1). The regions
102 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pairs OPA10-
103 2L/OPA10-2R (Andrew et al.2009), PG3/ PG2b (Andrew et al. 2009), GPD1/ GPD2 (Berbee
104 et al., 1999) and ALT-for/ ALT-ver (Hong et al. 2005), respectively.

105 Polymerase chain reactions (PCR) were performed in a final volume of 12.5 µl
106 containing 2.25 µl of water, 1 µL of DNA template, 1 µL of each primer (10 µM), 1 µL of
107 DMSO, and 6.25 µL of PCR Master Mix (2X) (Promega GoTaq® Master Mix, Wisconsin,
108 USA). [JSV2] The OPA10-2 involved an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed
109 by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 62 °C for 45 s, 72 °C for 30 s, and a final denaturation step at
110 72 °C for 10 min. The optimal annealing temperatures for each of the other genes were as
111 follow: endoPG–50 °C; GAPDH–48 °C and Alt a 1–48 °C. The PCR amplification products
112 were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel in 1.0X Tris-acetate acid EDTA
113 (TAE) buffer and were photographed under UV light. The amplicons were purified by
114 precipitation in ammonium acetate and ethanol. All regions were sequenced by using ABI
115 PRISM® BigDye® terminator v3 cycle sequencing kits (Applied Biosystems) at the

116 Sequencing Platform LABCEN/CCB in the ‘Universidade Federal de Pernambuco’, Recife,
117 Brazil.

118 **Sequence alignment, phylogenetic analysis, and species recognition**

119 Forward and reverse sequences were assembled using the Staden package (Staden et
120 al. 1998). All obtained consensus sequences were compared to GenBank sequences using
121 BLAST to query the NCBI sequence database to confirm the taxonomic assignments of the
122 isolates. Sequences representing ex-types and related published sequences were retrieved
123 from GenBank (Table 1)^[USV3]. Single gene sequences were aligned using MAFFT v.7 online
124 program (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), using the G-INS-i strategy in MAFFT
125 version 7 (Kato and Toh 2013, Kato et al. 2019) and manually adjusted where necessary in
126 MEGA7 (Kumar et al., 2016). The genes were concatenated using SequenceMatrix v.1.8 (Vaidya
127 et al. 2011).

128 Phylogenetic reconstructions were performed using the Maximum Likelihood (ML) and
129 Bayesian Inference (BI) methods for both individual and concatenated genes. ML and BI analyses
130 were performed using RAXML-HCP2 v.7.0.4 (Stamatakis 2014) and MrBayes v 3.2.1
131 (Ronquist et al. 2012), respectively, implemented in the CIPRES cluster
132 (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). ML tree searches were carried out with 1000
133 pseudoreplicates (-m GTRGAMMA -p 12345 -k -f a -N 1000 -x 12345) under the GTR-
134 GAMMA model.

135 Evolution models were estimated in MrModeltest 2.3 (Nylander 2004) using the
136 Akaike information criterion (AIC) for each locus. The combined data set was partitioned to
137 reflect the most appropriate nucleotide substitution model for each of the single gene data sets
138 for the Bayesian analysis of the combined data set. Four Markov Chain Monte Carlo
139 (MCMC) chains were conducted for 5x10⁷ generations, with samplings every 1000

140 generations. The convergence of all the parameters was checked using Tracer v 1.5 (Rambaut
141 and Drummond 2010) and the first 25% generations were discarded as burn-in. FigTree
142 version 1.4.3 (Rambaut, 2012) was used to visualize the phylogenetic tree.

143 *Alternaria* species associated with leaf spot of fennel were recognized through the
144 Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR) criterion, as
145 described by Taylor et al. (2000), Dettman et al. (2003) and Doyle et al. (2013).

146 **Aggressiveness test**

147 The aggressiveness of *Alternaria* spp. was evaluated in leaves of fennel seedlings aged
148 from 45 to 60 days. Each leaf was lightly injured along the rachis of the leaf (1 site per leaf)
149 with sterile needle before inoculation. The inoculum was produced in plates (Petri)
150 containing PCA culture media (potato-carrot-agar), under a photoperiod of eight hours of light
151 and 16 hours in the dark, at 25°C, for 15 days. Spore suspensions were prepared by adding 20
152 mL of sterile distilled water to the surface of the cultures. Fungal cultures were scraped with a
153 soft brush and filtered through sterile gauze. The spore concentration was determined by
154 counting under a microscope with the aid of a Neubauer camera and adjusted to 10⁵
155 conidia.mL⁻¹. Ten microliters of the spore suspension were added over the injured areas. The
156 negative control consisted of leaves inoculated with sterilized distilled water. After the
157 suspension had dried, the inoculated plants were covered with plastic to maintain moisture for
158 48h. The experiment was carried out in a completely randomized design, with ten repetitions,
159 represented by a sheet. Aggression was assessed by measuring the diameter of the lesion
160 caused by the fungus. Differences in the aggressiveness of *Alternaria* species were determined
161 by an analysis of variance and the means were compared by Tukey test ($p = 0.05$).

162 **Results**

163 A total of 183 isolates with *Alternaria* phenotypic characteristics were obtained in
164 commercial fennel plantations. Of these, one hundred and fifteen were isolated by
165 symptomatic plants in Paraíba State and sixty eight by plants of Pernambuco State. After
166 DNA extraction, only 118 isolates were used to compare the number of haplotypes.

167 Partial sequence analysis of the OPA 10-2 region separated the isolates into 13
168 haplotypes, all belonging to the *Alternaria* section based on similarity to representative
169 sequences in the NCBI database. The Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference
170 (BI) methods showed concordant topologies both in the concatenated and in the individual
171 genes, with variation in the support of the branches. Multilocus analysis revealed that the
172 isolates belong to five lineages, with four previously described species and an unknown
173 independent lineage (Fig. 2).

174 Six isolates were identified as *A. alternata/arborescens* with high support in most
175 individual gene trees (except GAPDH). Three isolates formed a clade with *A. jacinthicola*
176 strongly supported by the Alt a 1, EndoPG, GAPDH and OPA 10-2 genes, and was not
177 contradicted in any other individual gene tree with approximate level of support. Five isolates
178 were identified as conspecific with *A. gossypina* and *A. longipes*, here considered *A. longipes*-
179 like, with significant support in multilocus analyzes and in the individual gene trees Alt a1,
180 OPA 10-2, GAPDH and EndoPG. Four isolates were grouped with *A. tomato* and *A. burnsii*,
181 here synonymized as *A. tomato*, strongly supported by the Alt a 1, GAPDH and OPA 10-2
182 genes.

183 The remaining lineage (147A - called *Alternaria* sp. 1), is constituted by a single
184 isolate, thus it is not possible to apply the criterion for recognition of fungal species.

185 Considering the geographic location of the isolates obtained and the results described in the
186 previous paragraphs, it appears that in the state of Paraíba the species *A. alternata*, *A.*

187 *jacinthicola*, *A. longipes*-like and *A. tomato*-like were found. In the state of Pernambuco,
188 only the species *A. alternata* and *A. longipes*-like were identified associated with fennel (Tab.
189 1).

190 All *Alternaria* isolates were pathogenic to fennel 20 days after inoculation, resulting in
191 visible and measurable lesions (Fig. 3). The symptoms observed on the rachis of the leaves
192 were light brown necrotic lesions that extended from the point of inoculation (Fig. 4)

193 **Discussion**

194 Sequencing of conserved regions such as ITS, mtSSU, mtLSU, β -tubulin, actin,
195 calmodulin, which are very useful in identifying other fungal genera, does not provide
196 resolution between *Alternaria* species (Pryor; Gilbertson, 2000; Peever et al., 2004). For this
197 reason, alternative region sequencing has been used to resolve the phylogenetic relationships
198 of this group of Dothiomycetes. Regions as a segment of an endopolygalacturonase gene
199 (endoPG); the *Alternaria* major allergen 1 gene (Alt a1); and to anonymous non-coding
200 regions, such as OPA10-2 (Peever et al., 2007; Andrew et al., 2009; Armitage et al., 2015)
201 has demonstrated greater efficiency and support to separate *Alternaria* groups.

202 Through a phylogenetic approach involving four loci (OPA10-2, endoPG, GAPDH
203 and Alt a1), this study revealed that leaf spot of *alternaria* in fennel cultivated in northeastern
204 Brazil is caused by four species of the genus *Alternaria*: *A. alternata/arborescens*, *A. tomato*-
205 *like*, *A. longipes-like*, *A. jacinthicola*. All identified species belong to the *Alternaria* section,
206 characterized by producing small conidia, as described by Lawrence et al. (2013) and
207 Woudenberg et al. (2015). The results of this study confirm that the combination of these
208 phylogenetic markers are promising for determining species relationships and delineation.
209 These markers were analyzed in specific studies for the *Alternaria* section (Woudenberg et al.
210 2015), resulting in very well supported clusters.

211 The sequences of strains identified as *A. alternata* or *A. arborescens* species,
212 sequenced in this work, and sequences of same species, downloaded from Genbank (Table 1)
213 matched perfectly. The same was demonstrated in the results of Soma et al. (2019), when
214 these species clustered in close groups. According to the aforementioned author, there is a
215 need to consider the eventuality that species showing coincident gene sequences and
216 phylogenetically indistinguishable would be considered same genetic entities.

217 In addition to *A. alternata*, the *Alternaria* sect. *Alternaria* also includes additional plant
218 pathogenic species such as *A. longipes* which is the principal cause of brown spot of tobacco,
219 *A. gaisen* which is the causal agent of Japanese pear and *A. arborescens* which causes stem
220 canker on tomato (Siciliano et al., 2018). In this study, some of these morphospecies grouped
221 in the same clade as other species, strongly supported by the bootstrap values, indicating that
222 some of them may be synonymized in the future. In general, the morphological observations
223 and, in particular, the sporulation pattern allowed to differentiate between isolates of *A.*
224 *alternata*, *A. arborescens* and *A. tenuissima* (Simmons, 2007), but this study demonstrates
225 that phylogenetically this morphospecies form a not resolved group.

226 Although it does not completely resolve the inconsistencies between morphological
227 and molecular identification, the multilocus analysis refutes the hypothesis of Cabral et al.
228 (2017) who claim that small-spored *Alternaria* belong to the same species and it cannot be
229 assured that the small-spored *Alternaria* have accumulated enough evolutionary change to be
230 considered different species. We see in the results of this study that combined gene analysis is
231 able to separate *Alternaria* sect *alternaria* isolates into phylogenetically well supported groups.

232 This study, as well as that of Andrew et al. (2009), did not agree with the taxonomic
233 classification in Simmons (2007), where some organisms were considered different taxa.

234 According to these results, this differentiation in subspecies based on morphology and host
235 relationship is not evident.

236 All species found in the present study were capable of causing disease in fennel when
237 artificially inoculated. However, in most inoculated plants, lesions induced by *Alternaria* spp.
238 on the rachis of the leaves did not progress as efficiently, indicating the possible existence of
239 defenses (chemical and/or physical) that limited the pathogen's aggressiveness (Zeng et al.,
240 2015).

241 In conclusion, this study contributed to reaching a successful classification of
242 *Alternaria* isolates from fennel because we examined pathological and molecular properties of
243 the isolates and analyzed them with appropriate technologies. In fact, multilocus analysis was
244 resolute for the classification of the isolates. This approach combined with the previous
245 data has been revealed as a useful tool to discriminate against some of the species within *A.*
246 *sect. Alternaria*. The majority of the isolates studied belong to the *A. alternata* species-group,
247 however, we were able to differentiate also some other species within this species group such
248 as *A. longipes* and *A. jacinthicola*.

References

- Andrew M., Peever T.L., Pryor B.M., 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve species among the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*, 101: 95–109.
- Armitage, A.D., Barbara, D.J., Harrison, R.J., et al., 2015. Discrete lineages within *Alternaria alternata* species group: identification using new highly variable loci and support

from morphological characters. *Fungal Biology*, 119: 994–1006.

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.06.012>

Brazil. Ministry of health and ANVISA., 2015. Monografia da espécie *Foeniculum vulgare* Mill. Retrieved from <<https://www.gov.br/saude/pt-br/acao-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/2017/arquivos/MonografiaFuncho.pdf>>, accessed 06 June 2019.

Berbee M.L., Pirseyedi M., Hubbard S., 1999. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*. 91(6): 964-977.

Bessadat N., Hamon B., Bataillé-Simoneau N., Mabrouk K., Simoneau P. 2021. "Characterization of New Small-Spored *Alternaria* Species Isolated from *Solanaceae* in Algeria" *Life* 11, no. 12: 1291. <https://doi.org/10.3390/life11121291>

Cabral L.C., Rodriguero M., Stenglein S. et al., 2017. Characterization of small-spored *Alternaria* from Argentinean crops through a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 257: 206–215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.026>

Castellani A., 1967. Maintenance and Cultivation of Common Pathogenic 466 Fungi in Man in Sterile Distilled Water. Further Researches, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 70, 181-184.

Dettman J.R., Jacobson D.J., Taylor J.W., 2003. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* 57: 2703-2720.

- Doyle V.P., Oudemans P.V., Rehner S.A., Litt A., 2013. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscapes in North America. *PLoS ONE* 8:e62394.
- Haridas S., Albert R., Binder M., et al., 2020. 101 Dothideomycetes genomes: a test case for predicting lifestyles and emergence of pathogens. *Studies in Mycology*. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.01.003>
- Hong, S.G., Pryor, B.M., 2004. Development of selective media for the isolation and enumeration of *Alternaria* species from soil and plant debris. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 461-468. <https://doi.org/10.1139/w04-036>
- Hong, S.G., Cramer, RA, Lawrence, C. B., and Pryor, B. M., 2005. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genet. Biol.* 42: 119-129.
- Katoh, K., Toh, H., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30:772-780.
- Katoh, Rozewicki, Yamada. 2019. (Briefings in Bioinformatics 20:1160-1166) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biol. and Evol.* 33:1870-1874.

- Lawrence D.P., Gannibal P.B., Peever T.L., Pryor B.M., 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-groups concepts. *Mycologia*, 105: 530-546.
<https://doi.org/10.3852/12-249>
- Mamgain, A., Roychowdhury, R., Tah, J. 2013. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology*, 1: 1–9.
- Nylander J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Peever, T.L., Su, G., Carpenter-Boggs, L., Timmer, L.W., 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96: 119–134.
<https://doi.org/10.2307/3761993>
- Peever T.L., Carpenter-Boggs L., Timmer L.W. et al., 2007. Citrus Black Rot is caused by phylogenetically distinct lineages of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 95: 512-518. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0512>
- Pryor, B.M., Gilbertson, R.L., 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*, 104 (11): 1312–1321.
<https://doi.org/10.1017/S0953756200003002>
- Rambaut A., Drummond A., 2010. Tracer v. 1.4 Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
. Accessed 15 march, 2019.
- Rambaut, A., 2012. FigTree v1.4.0: Tree Figure Drawing Tool. Available:
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>

- Rather M. A., Dar B. A., Sofi S. N., Bhat B. A., Qurishi M. A., 2016. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(2): 1574-1583. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.011>
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539-542.
- Sela I., Ashkenazy H., Katoh K., Pupko T., 2015. GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Research* 43: W7–W14.
- Siciliano I., Ortega S.F., Gilardi G., et al., 2018. Molecular phylogeny and characterization of secondary metabolite profile of plant pathogenic *Alternaria* species isolated from basil. *Food Microbiology*, 73: 264-274. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.001>
- Simmons E.G., 2007. *Alternaria*. An identification manual. In: CBS biodiversity series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- Somma S., Amatulli M.T., Masiello M., Moretti A., Logrieco A.F., 2019. *Alternaria* species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach. *International Journal of Food Microbiology* 293: 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.001>
- Staden R., Beal K.F., Bonfield J.K., 1998. The Staden package, 1998. In: Misener S, Krawetz SA (eds) *Bioinformatics methods and protocols*. Humana, New York, 115–130.

- Stamatakis A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of 597 large phylogenies. *Bioinformatics*. 1, 30(9): 1312-3.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S., Fisher M.C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31:21-32.
- Vaidya G., Lohman, D. J., and Meier R., 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*. 27:171-180.
- Woudenberg J.H.C., Seidl M.F., Groenewald J.Z., et al., 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, *formae speciales* or pathotypes? *Studies in Mycology*. 82: 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>
- Zeng H., Chen X., Liang J., 2015. In vitro antifungal activity and mechanism of essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiol.* 64 (1) : 93-103. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.077768-0>



Fig. 1. Symptoms of *Alternaria* leaf spot on fennel (in situ).

Table 1. *Alternaria* isolates used in this study with collection details and GenBank accession numbers.

Species	Strain Number ^{1,2}	Host	Locality	GenBank Accession Numbers ³			
				OPA 10-2	gadph	Alt a 1	endoPG
<i>A. astroemeriae</i>	CBS 118809; EGS 52068; MAFF 1219T ^T	<i>Alstroemeria</i> sp.	Australia	KP124602	KP124154	np	KP123994
	CBS 118808; EGS 50116	<i>Alstroemeria</i> sp.	USA	KP124601	KP124153	KP123845	KP123993
<i>A. alternata</i>	CBS 115616; EGS 34016 ^T	<i>Arachis hypogaea</i>	India	KP124663	AY278808	AY563301	JQ811978
	CBS 44786	<i>Malva</i> sp.	Marocco	KP124625	JQ646314	JQ646397	KP124018
	CBS 19586; EGS 36172; DAOM 185214	<i>Euphorbia esula</i>	Canada	KP124624	KP124173	JQ646398	KP124017
	CBS 102599; EGS 44166	<i>Minneola tangelo</i>	Turkey	KP124639	KP124185	KP123879	KP124032
	CBS 102603; EGS 45011	<i>Minneola tangelo</i>	Israel	KP124642	KP124188	KP123882	KP124034
	CBS 102604; EGS 45007	<i>Minneola tangelo</i>	Israel	KP124643	AY562410	AY563305	KP124035
	CBS 119399; EGS 39189	<i>Minneola tangelo</i>	USA	KP124672	JQ646328	KP123910	KP124063
	CBS 102595; EGS 45100	<i>Citrus jambhiri</i>	USA	KP124636	AY562411	AY563306	KP124029
	CBS 10624; EGS 38029; ATCC 13963	<i>Malus sylvestris</i>	USA	JQ800620	KP124155	KP123847	AY295020
	CBS 91197; IMI 056271	<i>Artemisia brevifolia</i>	India	KP124634	KP124181	KP123875	KP124027
	CBS 130261	Human sputum	India	KP124701	KP124240	KP123936	KP124092
	CBS 130262	Human sputum	India	KP124702	KP124241	KP123937	KP124093
	BMP 2336	Unknown	Unknown	KP124641	JQ646319	JQ646403	AY295023
	PR 320; CBS 102600; EGS 39181;	<i>Citrus reticulata</i>	USA	KP124640	KP124186	KP123880	KP124033
	026A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	029A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	076A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	125A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	140A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
164A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Pernambuco	np	np	np	np	
166A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Pernambuco	np	np	np	np	

(continued on next page)

Table 1. (Continued).

Species	Strain Number ^{1,2}	Host	Locality	GenBank Accession Numbers ³			
				OPA 10-2	gadph	Alt a 1	endoPG
<i>A. arborescens</i>	CBS 102605; EGS 39128^T	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	KP124712	AY278810	AY563303	AY295028
	CBS 10113; EGS 07022; QM1765	Peat soil	Switzerland	KP124705	KP124244	KP123940	KP124096
	CBS 10841; EGS 44087; ATCC 11892	Wood	Unknown	KP124707	KP124246	KP123942	KP124098
	CBS 12660; IMI 081622	Wood	UK	KP124710	KP124249	JQ646390	KP124101
	CBS 118389; EGS 90131	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japan	KP124721	KP124259	KP123954	KP124111
	CBS 124283	<i>Oryza</i> sp.	Russia	KP124730	KP124267	KP123963	KP124120
<i>A. betae-kenyensis</i>	CBS 118810; EGS 49159; IMI 385709^T	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>	Kenya	KP124733	KP124270	KP123966	KP124123
<i>A. eichhorniae</i>	CBS 48992; ATCC 22255; IMI 121518^T	<i>Eichhornia crassipes</i>	India	KP124740	KP124276	KP123973	KP124130
	CBS 119778; EGS 45026; IMI 37968	<i>Eichhornia crassipes</i>	Indonesia	KP124741	KP124277	np	KP124131
<i>A. gaisen</i>	CPC 25268	Unknown	Portugal	KP124744	KP124279	KP123976	KP124133
	CBS 63293; EGS 90512	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japan	KP124742	KC584116	KP123974	AY295033
	CBS 118488; EGS 90391	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japan	KP124743	KP124278	KP123975	KP124132
<i>A. iridiaustralis</i>	CBS 118486; EGS 43014^T	<i>Iris</i> sp.	Australia	KP124751	KP124284	KP123981	KP124140
	CBS 118487; EGS 44147	<i>Iris</i> sp.	Australia	KP124752	KP124285	KP123982	KP124141
<i>A. iridicola</i>	MAFF 246890^T	<i>Iris japonica</i>	Japan	np	LC270143	LC276239	LC276254
	MUCC 2148;	<i>Iris japonica</i>	Japan	np	LC270142	LC276238	LC276253
<i>A. jacinthicola</i>	CBS 133751; MUCL 53159^T	<i>Eichhornia crassipes</i>	Mali	KP124754	KP124287	KP123984	KP124143
	CPC 25267	<i>Cucumis melo</i>	Unknown	KP124755	KP124288	KP123985	KP124144
	YZU 171616	<i>Tagetes erecta</i>	China	np	MG781012	MG781013	MG781014
	042A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	096A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	146A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np

(continued on next page)

Table 1. (Continued).

Species	Strain Number ^{1,2}	Host	Locality	GenBank Accession Numbers ³			
				OPA 10-2	gadph	Alt a 1	endoPG
<i>A. gossypina</i> (syn. <i>A. longipes</i>)	CBS 10432 ^T	<i>Gossypium</i> sp.	Zimbabwe	KP124746	JQ646312	JQ646395	KP124135
	CBS 10023	<i>Malus domestica</i>	Unknown	KP124745	KP124280	KP123977	KP124134
	CBS 10736	Soil	Indonesia	KP124747	JQ646310	JQ646393	KP124136
	CBS 102601; EGS 45017	<i>Minneola tangelo</i>	Colombia	KP124749	KP124282	KP123979	KP124138
	EVMIL 2s	<i>Minneola tangelo</i>	USA	KP124748	JQ646309	JQ646392	KP124137
<i>A. longipes</i>	CBS 53994; QM 8438	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA	KP124757	KP124290	KP123987	KP124146
	CBS 54094; EGS 30033; QM 9589	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA	KP124758	AY278811	AY563304	KP124147
	CBS 91796	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA	KP124759	KP124291	KP123988	KP124148
	CBS 121332; EGS 30048	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA	KP124760	KP124292	KP123989	KP124149
	CBS 121333; EGS 30051	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA	KP124761	KP124293	KP123990	KP124150
	103A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	131A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	154A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Pernambuco	np	np	np	np
	163A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Pernambuco	np	np	np	np
	213A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Pernambuco	np	np	np	np
<i>A. burnsii</i> (syn. <i>A. tomato</i>)	CBS 10738; EGS 06185 ^T	<i>Cuminum cyminum</i>	India	KP124734	JQ646305	KP123967	KP124124
	CBS 10827	<i>Gomphrena globosa</i>	Unknown	KP124605	KC584162	KP123850	KP123997
	CBS 11050; MUCL 10012	<i>Gossypium</i> sp.	Mozambique	KP124735	KP124271	KP123968	KP124125
	CBS 87995; IMI 300779	<i>Sorghum</i> sp.	UK	KP124736	KP124272	KP123969	KP124126
	CBS 118816; EGS 43145; IMI 368045	<i>Rhizophora mucronata</i>	India	KP124737	KP124273	KP123970	KP124127
	CBS 118817; EGS 39014; IMI 318433	<i>Tinospora cordifolia</i>	India	KP124738	KP124274	KP123971	KP124128

(continued on next page)

Table 1. (Continued).

Species	Strain Number ^{1,2}	Host	Locality	GenBank Accession Numbers ³			
				OPA 10-2	gadph	Alt a 1	endoPG
<i>A. burnsii</i> (syn. <i>A. tomato</i>)	025A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	033A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	120A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
	142A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np
<i>A. tomato</i>	CBS 10330	<i>Solanum lycopersicum</i>	Unknown	KP124762	KP124294	KP123991	KP124151
	CBS 11435	<i>Solanum lycopersicum</i>	Unknown	KP124763	KP124295	KP123992	KP124152
<i>Alternaria sp1</i>	147A	<i>Foeniculum vulgare</i>	Brazil, Paraíba	np	np	np	np

¹ ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; BMP: B. M. Pryor, School of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ, 85721, EUA; CBS: Culture collection of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC: Personal collection of P.W. Crous, Utrecht, The Netherlands; DAOM: Canadian Collection of Fungal Cultures, Ottawa, Canada; E.G.S.: Personal collection of Dr. E.G. Simmons; IMI: Culture collection of CABI Europe UK Centre, Egham UK; MAFF: MAFF Genebank Project, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba, Japan; MUCC (Japan): Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Japan; MUCL: (Agro)Industrial Fungi and Yeast Collection of the Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM), Louvain-la-Neuve, Belgium; QM: Quarter Master Culture Collection, Amherst, MA, USA; YZU: Culture Collection of Yangtze University, China.

² T / Bold strain number: ex-type isolate.

³ np: no product.

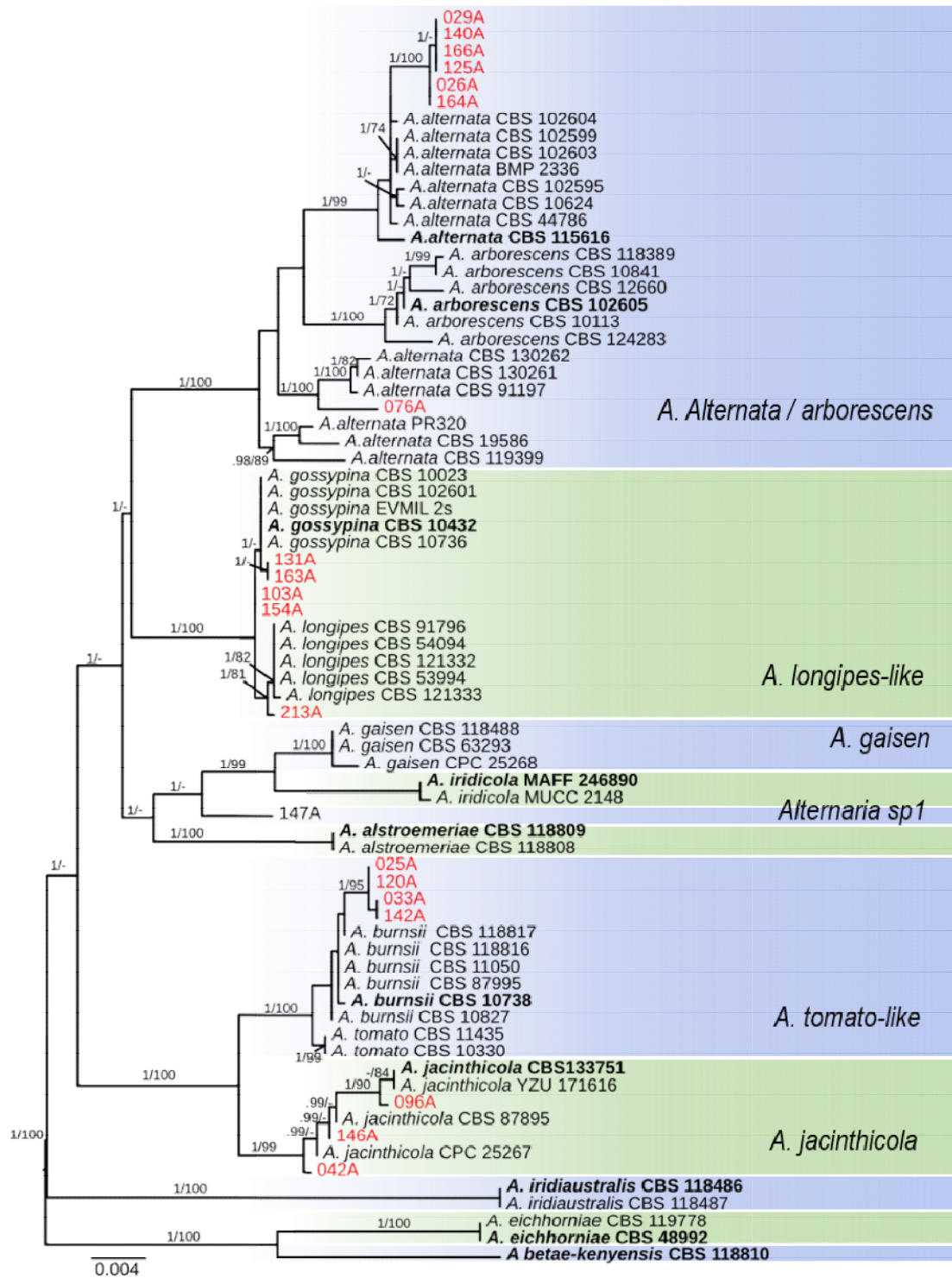


Fig. 2. Maximum Likelihood Tree of *Alternaria* Section inferred from the concatenated alignment of *Alt a 1*, *GAPDH*, *EndoPG e* and *OPA10-2*. Bootstrap support values (ML ≥ 70) and Bayesian posterior probability values (PP ≥ 0.95) are shown above the branches. "-" indicates non-significant support or absence of branch. Ex-type isolates are written in bold and include the taxonomic name as originally described.

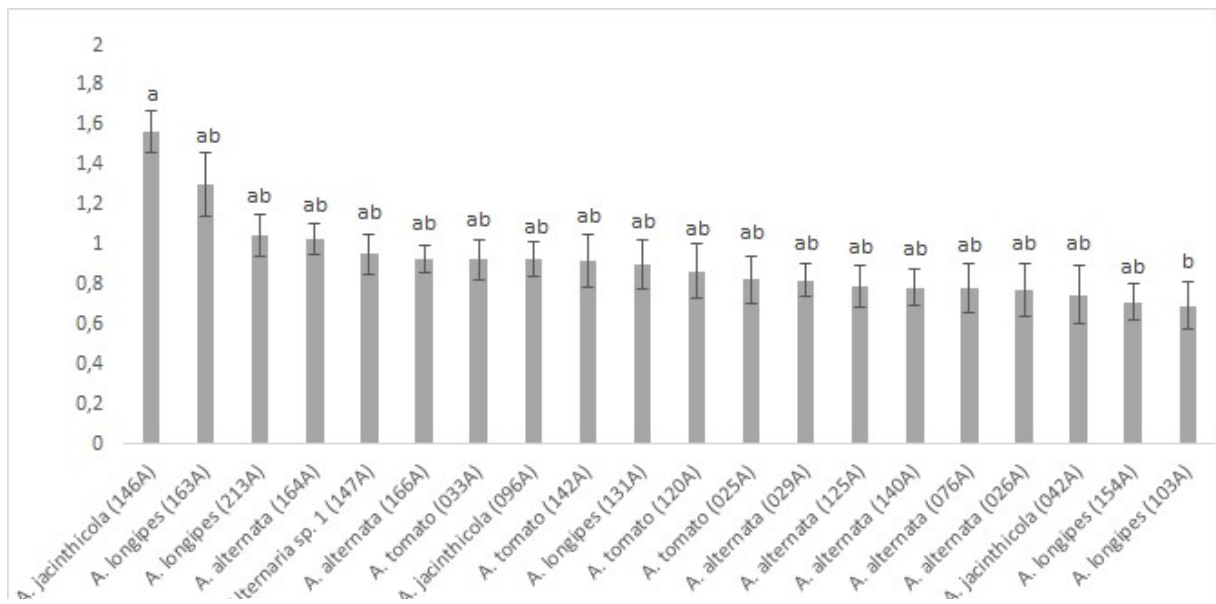


Fig. 3. Mean lesion lengths (mm) caused by *Alternaria* species on fennel, 20 days after inoculation. Standard error of the mean is represented by bars. Columns with the same letter do not differ significantly according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).



Fig. 4. A. Inoculated rachis of fennel; B; Necrotic lesion fifteen days after inoculation.

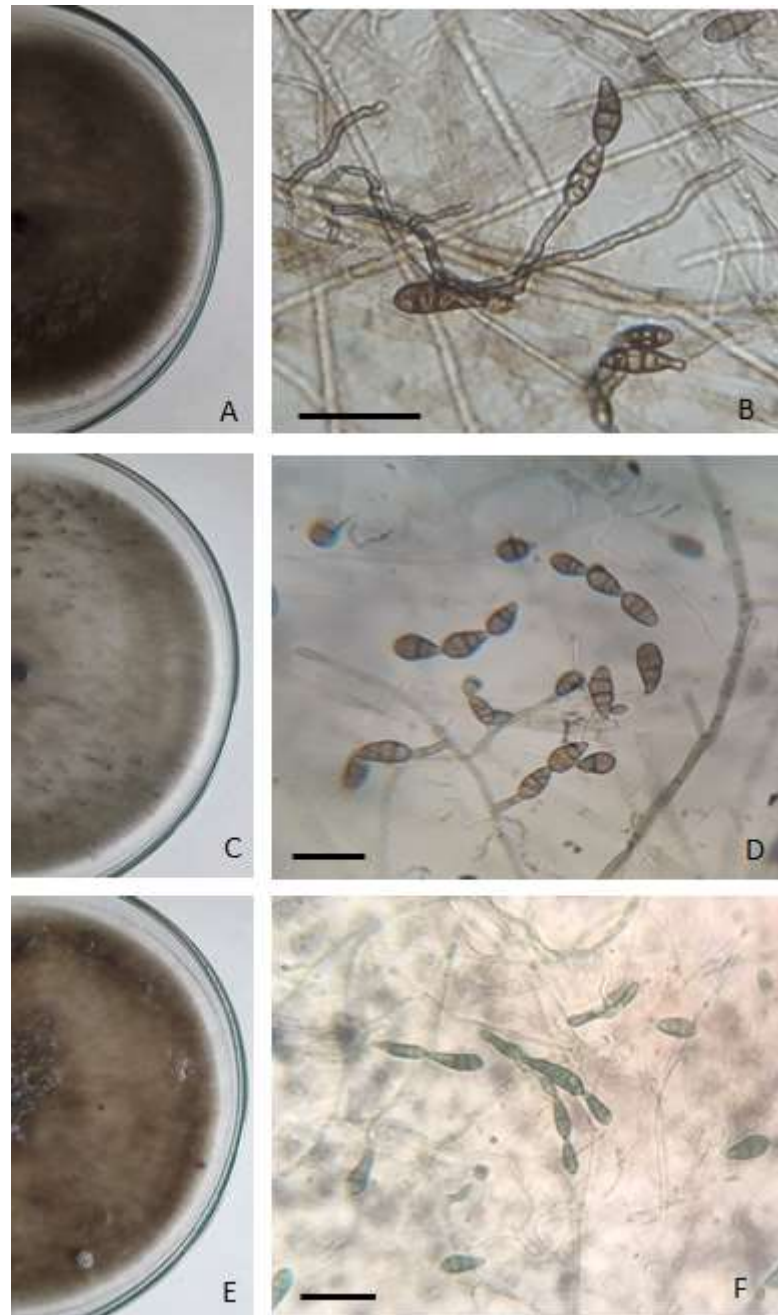


Fig. 5. Culture characteristics and spores morphology of *Alternaria* isolates; A - B: isolate 026A (*A. alternata* / *arborescens*); C - D: isolate 029A (*A. alternata* / *arborescens*); E - F: isolate 103A (*A. longipes*-like).

Capítulo III

**First report of *Alternaria jacinthicola* causing leaf spot of fennel
in Brazil**

1 **First report of *Alternaria jacinthicola* causing leaf spot of fennel in Brazil**

2

3 **M.G. Oliveira**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900,
4 Pernambuco, Brazil; **I.L. Coelho**, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de
5 Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; **J.S. Veloso**, Department of Agronomy,
6 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; **S.B.**
7 **Ramos**, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,
8 52171-900, Pernambuco, Brazil; **M. P. S. Câmara**, Department of Agronomy, Universidade
9 Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; **D.**
10 **Laranjeira***, Department of Agronomy, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,
11 52171-900, Pernambuco, Brazil.

12 * Corresponding author

13

14 In May 2018, fennel plants (*Foeniculum vulgare* Mill) were diagnosed with symptoms of
15 *Alternaria* leaf spot in a production area located in Esperança, Paraíba State, Northeast Brazil
16 (6°59'41.7"S 35°51'50.3"W). In three of the nine states of this region of Brazil, the production
17 of fennel represents important agricultural product with food, cosmetic and medicinal use, but
18 is significantly affected by leaf spot, caused by *Alternaria* spp. Rachis and leaves exhibited
19 symptoms like development dark-brown lesions, yellowing leaves and, in advanced
20 infections, defoliate plants. Isolations are obtained by monosporic cultures. Spores were
21 observed in an electronic magnifying glass, removed from each sample with the aid of
22 surgical needles, deposited in plates containing PDA culture medium and incubated for 15
23 days at 26 °C. Eight isolates morphologically similar to *Alternaria* were obtained after the
24 purification of the colonies and were preserved by the Castellani method. Pathogenicity tests

25 were performed on young plants of fennel with more than five leaves (two plants/isolate) add
26 ten microliters of the spore suspension (1×10^5 spores ml^{-1}) over injured areas of the rachis.
27 The negative control was represented by leaves inoculated by sterile water. Differently from
28 the negative control that did not present symptoms, the inoculated plants expressed points
29 with brown colored necrotic tissue, the same symptoms observed in the field, after 20 days of
30 incubation. Performing the Koch postulates, the pathogen was re-isolated from the
31 symptomatic tissues. In PDA, the colonies of *Alternaria* presented initially transparent hyphae
32 that evolved to an olive brown and black color, characteristic of the species (Simmons, 2017;
33 Marin-Feliz et al., 2019). The eight isolates were partially sequenced at the OPA 10-2 locus
34 and, after a comparative analysis among the isolates and finding haplotype similarity, two
35 representative isolates of each haplotype (042A e 096A) was selected for additional
36 sequencing of GAPDH, EndoPG and Alt a1, for comparison with other *Alternaria* species
37 described (Woundenberg et al., 2015). Compared with other taxa in the NCBI database, the
38 isolate 096A was 91% similar to CBS 133751, a representative ex-type isolate of *A.*
39 *jacinthicola*. Phylogenetic analyses of Maximum Likelihood - ML, including previously
40 published sequences of species belonging to *Alternaria* sect. *alternaria* (Woundenberg et al.,
41 2015), grouped both isolates in the clade of *A. jacinthicola* with 100% bootstrap support.
42 *Alternaria* sp. were previously described as causal agents of leaf spot of fennel in Brazil
43 (Mendes et al., 1998), however, this is the first report of *A. jacinthicola* in association with
44 *Foeniculum vulgare* in this country.

References

Marin-Felix, Y. et al., 2019. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. *Studies in mycology*, 94: 1–124. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2019.05.001>.

Mendes, M.A.S., Silva, V.L., Dianese, J.C., et al. 1998. Fungos em Plantas no Brasil. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasilia, 555 pages.

Simmons, E.G., 2007. *Alternaria*. An identification manual. In: CBS biodiversity series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, 2007.

Woudenberg J.H.C., Seidl M.F., Groenewald J.Z., et al., 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology*. 82: 1–21.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>



Fig. 1. Symptoms of *Alternaria* leaf spot of fennel and re-isolate colonies after inoculation: A. Plant in the field (natural infection); B. Disease aspect in leaf; C. Disease aspect in stalk; D. Disease aspect in rachis; E- F. Colony aspect of isolates 042A and 096A, respectively, after re-isolation; G. Lesion in inoculated rachis (Pathogenicity test).

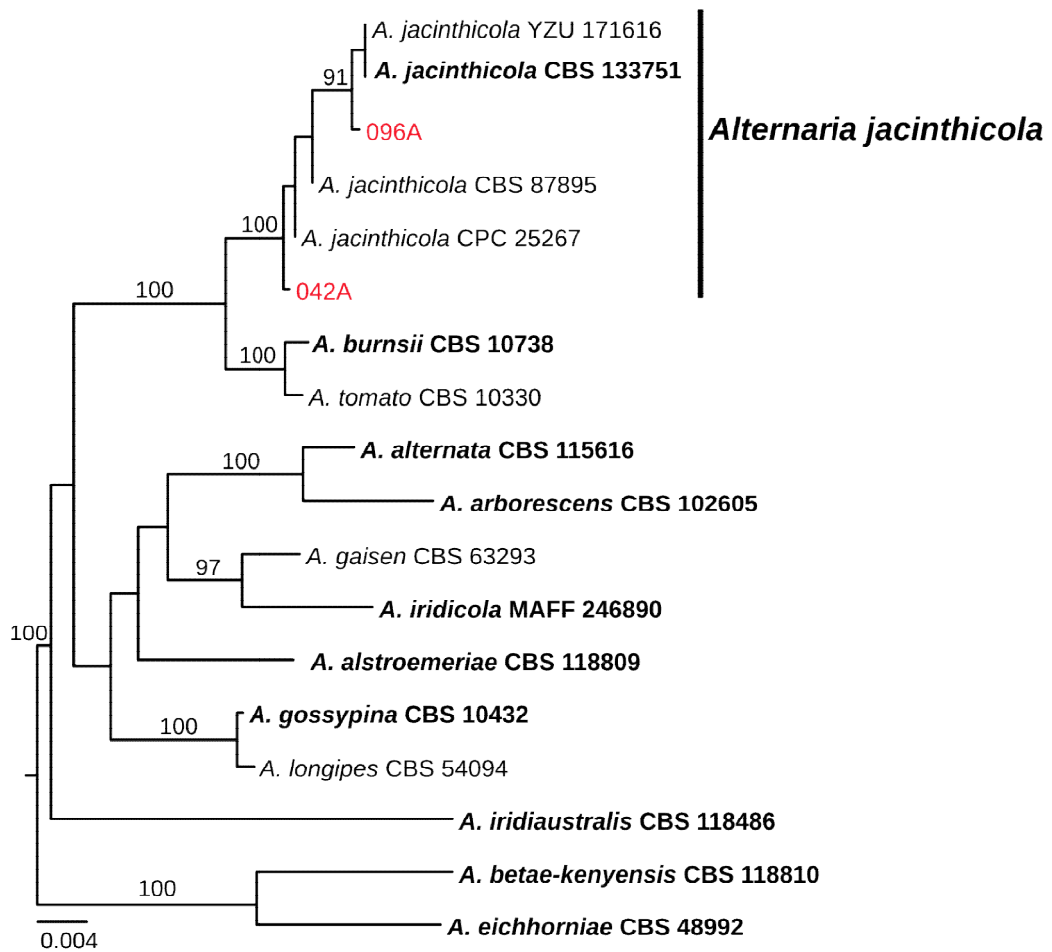


Fig. 2. Maximum likelihood tree showing relationships among *Alternaria* spp. from the section *Alternaria*. The Tree is rooted in the midpoint. Bootstrap supports are shown above the branches. Ex-types are in bold. Isolate from fennel is highlighted in red.

Capítulo IV

Resposta in vitro de espécies de *Alternaria* a diferentes fungicidas

1 **Resposta *in vitro* de espécies de *Alternaria* a diferentes fungicidas**

2 Marcelo Garcia de Oliveira^{1*}, Iwanne Lima Coelho¹, Sérgio Batista Ramos², Igor Alexander
3 de Melo Pimentel¹, Josiene Silva Veloso¹, Marcos Paz Saraiva Câmara¹ e Delson Laranjeira^{1*}

4 ¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
5 Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil.

6 ² Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade
7 Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

8 *Autores correspondentes: Endereço de E-mail: marcelopb1bio@gmail.com (Marcelo Garcia
9 de Oliveira) e delson.laranjeira@ufrpe.br (Delson Laranjeira).

10 **Resumo**

11 Mesmo com o avanço atual nas pesquisas agronômicas no Brasil, pouco se conhece sobre os
12 métodos de controle da mancha de *Alternaria*, seja químico, biológico ou relativo ao manejo
13 de culturas. Deve-se levar em consideração que métodos minerais de controle devem ser
14 aplicados de forma controlada, visto que grande parte das plantas cultivadas de considerada
15 importância agronômica atacados pelo fungo *Alternaria* são usados como insumo ou
16 condimento alimentar. Isso demanda uso de defensivos em doses que não comprometam a
17 aceitação mercadológica do produto agrícola final. Com esse estudo foi possível identificar, a
18 partir de teste *in vitro*, quais moléculas químicas podem obter sucesso em reduzir o
19 crescimento micelial do fungo e consequente mitigação dos efeitos da doença. Um dos
20 isolados de *Alternaria*, previamente identificado e com patogenicidade comprovada, foi
21 testado para a reação aos fungicidas difenoconazol, flutriafol, procimidona e tiofanato-

22 metílico, permitindo identificar que dentre estes o difenoconozol tem perspectiva de sucesso e
23 pode ser recomendada no controle de *Alternaria* em campos cultivados no Brasil.

24 Palavras-chave: *Alternaria* sp.; controle químico; inibição de crescimento fúngico.

25 **Abstract**

26 In Brazil, little is known about the methods of controlling *Alternaria* leaf spot, whether
27 chemical, biological or related to crop management. It should be taken into account that
28 mineral control methods must be applied in a controlled manner, since a large part of the
29 important crops attacked by the *Alternaria* fungus are used as food input or condiment. This
30 requires the use of pesticides in doses that do not compromise the market acceptance of the
31 final agricultural product. With this study, it was possible to identify, from an in vitro test,
32 which chemical molecules can be successful in reducing the mycelial growth of the fungus
33 and consequent mitigation of the effects of the disease. One of the *Alternaria* isolates,
34 previously identified and with proven pathogenicity, was tested for the reaction to the
35 fungicides difenoconazole, flutriafol, procymidone and thiophanate-methyl, allowing to
36 identify that difenoconazole has a good prospect of success and it can be recommended to the
37 control of *Alternaria* in cultivated fields in Brazil.

38 Keywords: *Alternaria* sp.; Chemical control; Inhibition of fungal growth.

39 **Introdução**

40 O gênero *Alternaria* compreende espécies fúngicas, globalmente distribuídas, que
41 podem desempenhar ação patogênica, endofíticas e saprofíticas (Ma et al., 2021, Woudenberg
42 et al., 2013). As espécies fitopatogênicas acometem folhas, caule e frutos de uma ampla

43 diversidade de hospedeiros vegetais de interesse agrícola, bem como plantas ornamentais (Ge
44 et al., 2019, Kumar et al., 2017, Waghunde et al., 2018, Woudenberg et al., 2013) e muitas
45 espécies selvagens (Thomma et al., 2013). Esse fungo possui dispersão, principalmente, por
46 respingos de chuva, vento ou material vegetal previamente infectado (Reis et al. 2006).

47 Os fungicidas são genericamente utilizados no controle de doenças causadas por
48 fungos em plantas cultivadas, frutas, grãos etc. No controle de doenças foliares, causadas por
49 espécies de *Alternaria*, comumente são utilizados ingredientes ativos de diferentes grupos
50 químicos e modos de ação (Kumar et al., 2017). No Brasil, por exemplo, produtos
51 pertencentes aos grupos triazol, benzimidazol, estrobilurina, imidazol, dicarboximida,
52 carboxanilida, dimetilditocarbamatos, entre outros, são regulamentados para o controle de *A.*
53 *alternatae* *Alternaria* spp. (MAPA, 2021).

54 Espécies de *Alternaria* podem apresentar diferentes níveis de sensibilidade a
55 fungicidas (Ma et al., 2021), por isso, é crucial a compreensão dos efeitos causados por
56 defensivos químicos específicos sobre uma população fitopatogênica, bem como a resposta do
57 fitopatógeno a esses produtos. Informações dessa natureza geram a base para uma tomada de
58 decisão assertiva, durante as práticas de manejo de doenças causadas por fungos
59 fitopatogênicos, incluindo àquelas causadas por espécies de *Alternaria*.

60 Adicionalmente, a investigação sobre a eficácia de diferentes ingredientes ativos, no
61 controle de isolados representativos de espécies fúngicas, propicia informações relevantes
62 sobre a potencialidade de utilização e regulamentação de produtos químicos que, inicialmente,
63 são utilizados para o controle de espécies e/ou cultivos distintas, em relação aos que são
64 abordados neste trabalho.

65 Considerando a importância agrônoma dos estudos e desenvolvimento de medidas
66 de controle para as doenças causadas por espécies de *Alternaria*, os objetivos desse estudo

67 são: i) determinar o potencial de controle e as doses mínimas inibitórias dos fungicidas
68 difenoconazol, flutriafol, pirimetanil, procimidona e tiofanato-metílico sobre espécies de
69 *Alternaria* cultivadas *in vitro*; ii) Avaliar o percentual inibitório dos fungicidas sobre o
70 desenvolvimento das espécies de *Alternaria in vitro*; iii) Estimar a CE50 e o efeito
71 fungitóxico *in vitro* dos fungicidas sobre as espécies de *Alternaria*.

72 **Material e Métodos**

73 **Obtenção e cultivo dos fungos.** Os isolados representativos de: *Alternaria alternata*
74 (CFS 026, CFS 076 e CFS 140), *Alternaria longipes-like* (CFS 163 e CFS 213), *Alternaria*
75 *tomato-like* (CFS 025, CFS 033 e CFS 142), *Alternaria jacinthicola* (CFS 042 e CFS 146) e
76 *Alternaria sp1* (CFS 147), previamente testados quanto a sua patogenicidade em plantas de
77 erva-doce (Oliveira, 2021), foram recuperados da Coleção de Fungos de Solo – CFS, do
78 laboratório de Fungos de Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco –
79 LAFSOL/UFRPE (Tabela 1). Os discos cilíndricos, contendo estruturas fúngicas foram
80 removidos dos tubos de preservação, depositados em placas de Petri contendo meio batata
81 dextrose ágar – BDA (Kasvi[®], São José dos Pinhais, Brasil) acrescido de Cloranfenicol (5 mg
82 L⁻¹) e as placas foram incubadas a 28 ±2 °C por dez dias, sob fotoperíodo de 12 h. Para
83 obtenção de esporulação abundante, as colônias que apresentaram características típicas de
84 *Alternaria* (Woudenberg et al. 2013) foram transferidas para meio de cultivo batata cenoura
85 ágar – BCA (extrato de batata 20 g e cenoura 20 g, acrescido de 20 g de ágar L⁻¹) e as placas
86 foram incubadas no escuro, a 28 ±2 °C por dez dias.

87 **Determinação da Concentração Mínima Inibitória *in vitro* dos fungicidas.** A
88 concentração mínima inibitória – CMI foi determinada para os fungicidas difenoconazol
89 (Score[®]; Syngenta: São Paulo, Brasil), pirimetanil (Mythos[®]; Bayer, São Paulo, Brasil),
90 flutriafol (Tenaz 250 SC; Sumitomo Chemical, São Paulo, Brasil), procimidona (Sumilex 500

91 WP, Sumitomo Chemical, São Paulo, Brasil) e tiofanato-metílico (Cercobin® 875 WG,
92 Iharabras S.A., Sorocaba, Brasil) em relação a *Alternaria alternata* (CFS 026).

93 A suspensão de esporos foi preparada em água destilada esterilizada – ADE, a partir
94 de colônias cultivadas por de dez dias em BCA, conforme descrito acima. Sobre o cultivo
95 fúngico, foi adicionada 10 ml de ADE e a massa de esporos foi removida superficialmente do
96 meio BCA com auxílio de uma lâmina microscópica lisa 26x76 mm (Precision®, São Paulo,
97 Brasil). A suspensão obtida foi transferida para um recipiente estéril, a concentração de
98 esporos foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer (Precision®, São Paulo,
99 Brasil) e a concentração de esporos final calibrada para 2×10^4 esporos ml^{-1} .

100 A determinação da CMI foi realizada pelo método da microdiluição em microplacas
101 de poliestireno, com 96 poços de fundo plano (Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil) contendo
102 meio de cultivo batata dextrose – BD (extrato de batata 200 g e dextrose 20 g L^{-1}). A
103 padronização na diluição das doses dos produtos foi estabelecida utilizando fatores de
104 diluição aplicados as concentrações recomendadas de ingrediente ativo – i.a para cada produto
105 (ppm). As diluições seriadas iniciaram a partir de 2x a dose recomendada D1 e,
106 progressivamente, reduzidas para a metade da concentração a cada nova diluição: (Tabela 1).

107 Os fungicidas foram adicionados e homogeneizados em meio BD (produto + meio),
108 nas concentrações desejadas e alíquotas de 120 μl foram transferidas aos micropoços.
109 Posteriormente, a cada poço contendo produto + meio, foram adicionados 60 μl da suspensão
110 de esporos de *Alternaria*. No tratamento controle positivo (C+) os poços continham apenas
111 meio 120 μl de BD + 60 μl da suspensão de esporos e no controle negativo (C-) os poços
112 foram preenchidos com 120 μl de BD + 60 μl de ADE.

113 As placas foram incubadas em agitação (75 rpm) a 28 ± 2 °C, após 24 h adicionou-se
114 20 μl de resazurin 0,01 % (Sigma–Aldrich) e as placas foram incubadas por 3 h a 28 ± 2 °C

115 em câmara escura. A mudança de coloração azul (oxidado) para rosa (reduzido) foi utilizada
116 como parâmetro para avaliar o desenvolvimento fúngico e a CMI foi definida como a menor
117 concentração do fungicida que evitou o desenvolvimento fúngico, ou seja, que evitou a
118 mudança de cor. Cada tratamento foi avaliado em quadruplicata, nas quais cada poço
119 representou uma repetição por tratamento, e os testes foram realizados duas vezes. Com base
120 na CMI, foram selecionadas cinco doses para o experimento de avaliação de inibição de
121 crescimento *in vitro*.

122 **Avaliação de inibição de crescimento *in vitro*.** Os fungicidas, utilizados no teste de
123 CMI e que apresentaram ação inibitória, foram utilizados para avaliar o efeito inibitório de
124 crescimento micelial de *A. alternata* (CFS 026, CFS 076 e CFS 140), *A. longipes*-like (CFS
125 163 e CFS 213), *A. tomato*-like (CFS 025, CFS 033 e CFS 142), *A. jacinthicola* (CFS 042 e
126 CFS 146) e *Alternaria*sp1 (CFS 147).

127 Cada químico foi adicionado ao meio BDA aquecido (47 ± 2 °C), nas concentrações
128 desejadas, e homogeneizada por agitação manual. Aproximadamente, 15 ml do produto (meio
129 + fungicida) foram transferidos para placas de Petri de 90x15 mm. Um disco cilíndrico de
130 meio BDA (0,5 cm Ø), contendo estruturas fúngicas dos isolados cultivados por sete dias, foi
131 depositado sobre o centro do meio tratado com fungicida. As placas foram incubadas por oito
132 dias, a 28 ± 2 °C e 12 horas de fotoperíodo. O experimento foi conduzido em delineamento
133 inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições por tratamento (isolado x dose). O
134 experimento foi repetido uma vez.

135 Os valores médios do diâmetro de crescimento micelial do patógeno – DCM foram
136 aferidos a cada 48 h, por dez dias. A partir desses valores, foi determinada a porcentagem de
137 inibição de crescimento micelial – PIC (%) pela equação: $PIC = \frac{Cc - Cf}{Cc} * 100$, sendo Cf =
138 crescimento final e Cc = Crescimento final tratamento controle.

139 **Determinação da CE₅₀.** Os valores do logaritmo das doses de fungicida e os valores
140 de PIC, referentes ao teste de inibição de crescimento *in vitro*, foram utilizados para
141 determinar as equações lineares $Y = a + bx^2$, representativas a cada isolado testado, sendo: Y
142 = porcentagem de inibição de crescimento micelial e $x = \text{Log}(\text{dose de inibição})$. A equação
143 linear obtida foi utilizada para a determinação da $\text{Log}(CE_{50})$, sendo: $\text{Log}(CE_{50}) = (50 - a)/b$
144 e a os valores de CE_{50} foram determinados pela transformação: $CE_{50} = (\text{Log } CE_{50})^{10}$.

145 Os valores de CE_{50} foram utilizados para classificar os produtos quanto seu efeito
146 fungitóxico as espécies de *Alternaria* em: $CE_{50} < 1 \text{ ppm} = \text{Alto}$; $1 < CE_{50} < 50 \text{ ppm} = \text{Moderada}$;
147 $CE_{50} > 50 = \text{não tóxico}$ (Edginton; Klew, 1971).

148 **Análises estatísticas.** Para atender aos pressupostos da análise de variância -
149 ANOVA, Os dados de CE_{50} e de DCM foram transformados para $\sqrt{CE_{50}}$ e \sqrt{DCM} ,
150 respectivamente. As diferenças de desenvolvimento das espécies de *Alternaria* e de ação
151 inibitória das doses dos fungicidas, foram inferidas pela ANOVA das médias de DCM, PIC e
152 de CE_{50} . Nas análises significativamente diferentes ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas
153 pelo teste Scott knott a 5 % de probabilidade, utilizando software Sisvar v5.6.

154 **Resultados**

155 **Determinação da Concentração Mínima Inibitória *in vitro* dos fungicidas.** Nos
156 ensaios utilizando a microdiluição dos fungicidas em microplacas, para avaliar a concentração
157 mínima inibitória, constatamos que o tiofanato-metílico não apresentou inibição de *A.*
158 *alternata* (CFS 026) em nenhuma das dosagens testadas e, por isso, foi excluído dos testes de
159 inibição de crescimento, determinação da CE_{50} e classificação fungitóxica (Fig. 1).

160 Por meio da observação da coloração dos poços nas microplacas, inferimos que os
161 demais fungicidas: difenoconazol, flutriafol, pirimetanil e procimidona, promoveram inibição
162 do desenvolvimento fúngico de *A. alternata* (CFS 026) em todas as doses utilizadas.
163 Visualmente, foi possível observar a presença de um gradiente de coloração azul (oxidado),
164 contrastando com a coloração rosa (reduzido) do controle negativo, a partir da menor
165 dosagem de cada um dos produtos (Fig. 1). A concentração mínima inibitória de
166 difenoconazol (CMI_{dif}), flutriafol (CMI_{flu}), pirimetanil (CMI_{piri}) e procimidona (CMI_{pro}) sobre
167 *A. alternata* foi de: CMI_{dif} = 11,7 ppm; CMI_{flu} = 3,2 ppm; CMI_{piri} = 7,8 ppm; e CMI_{pro} = 5,9
168 ppm.

169 **Inibição de crescimento *in vitro*, determinação da CE₅₀ e classificação fungitóxica.**

170 Baseados nos resultados do teste de determinação mínima inibitória, as diluições - Dfator = 1;
171 0,25; 0,063; 0,016 e 0,004 foram selecionadas como doses representativas para cada dose dos
172 fungicida (tabela 1).

173 O fungicida difenoconazol, a partir 187,5 ppm (equivalente a 0,063x da dose
174 recomendada), promoveu redução significativa do DCM para todas as espécies testadas, com
175 exceção dos isolados CFS 026 (*A. alternata*) e CFS 163 (*A. longipes*- like) que apresentaram
176 seus valores de DCM reduzidos significativamente a partir da dose 46,9 ppm (equivalente a
177 0,016x da dose recomendada). Observando os valores de CE₅₀ para o difenoconazol,
178 inferimos que os isolados pertencentes as espécies *A. alternata*, *A. longipes*- like e *A. tomato*-
179 like apresentaram diferentes comportamentos de resposta a esse fungicida, com determinação
180 de fungitoxicidade variável de alta a moderada, dependendo do isolado. Sobre *A. jacinthicola*
181 (CFS 042 e CFS 146) e *Alternaria* sp. (CFS 147), o difenoconazole apresentou ação
182 fungitóxica moderada e alta, respectivamente (Tabela 2).

183 Para todos os isolados, representativos de cada espécie de *Alternaria*, o fungicida
184 flutriafol desempenhou ação fungitóxica moderada. Semelhantemente ao difenoconazol, o
185 flutriafol reduziu significativamente os valores de DCM a partir da dose 207,5 ppm
186 (equivalente a 0,25x da dose recomendada). Para os isolados CFS 140 (*A. alternata*), CFS 042
187 (*A. jacinthicola*) e CFS 147 (*Alternaria* sp.), os valores de DCM foram reduzidos
188 significativamente a partir da dose de 52,3 ppm (equivalente a 0,063x da dose recomendada)
189 (Tabela 3).

190 O fungicida pirimetanil apresentou ação fungitóxica diferenciada para cada uma das
191 espécies. Em relação *A. alternata*, particularmente, houve variação de moderada a alta,
192 dependendo do isolado avaliado. Genericamente, a inibição significativa dos valores de DCM
193 ocorreu a partir de 500 ppm (equivalente a 0,25 x da dose recomendada), no entanto, aos
194 isolados CFS 076 (*A. alternata*), CFS 163 (*A. longipes*- like) e CFS 033 (*A. tomato*- like)
195 apresentaram valores de DCM igualmente reduzidos a partir de 125 ppm. O isolados CFS 213
196 (*A. longipes*- like) mostrou-se sensível ao pirimetanil, sendo inibido significativamente a
197 partir da dose mínima de 7,8 ppm. Apesar do efeito inibitório observado, em alguns isolados
198 de *A. alternatae* *A. tomato*- like é possível observar o efeito hormese resultante da resposta do
199 DCM desses isolados, em relação a dose recomendada, 2000 ppm (Tabela 4).

200 O fungicida procimidona foi caracterizado com fungitoxicidade moderada sobre todas
201 as espécies de *Alternaria*. Com exceção de *A. alternata*, as espécies apresentaram isolados
202 com redução significativa de DCM a partir de 93,7 ppm (equivalente a 0,063x da dose
203 recomendada). Os isolados CFS 2013 (*A. longipes*-like) e CFS 042 (*A. jacinthicola*)
204 apresentaram DCM reduzido a partir da dose 23,4 ppm, diferentemente dos isolados de CFS
205 026 e CFS 076 (*A. alternata*) que responderam apenas as doses de 1500 e 376 ppm,
206 respectivamente. (Tabela 5).

207 Para os isolados de *A. alternata*, a utilização de 0,25 x, em relação a dose
208 recomendada dos fungicidas, proporcionou PIC entre: 65% e 92% com 187,5 ppm de
209 difenoconazol; 88% e 92% com 207,5 ppm de flutriafol e/ou 500 ppm de pirimetanil; e 60% a
210 78% de PIC com 375 ppm de procimidona (Figura 2).

211 Com exceção do fungicida flutriafol, que inibiu significativamente a partir de 0,25x a
212 dose recomendada, os demais fungicidas apresentaram ação inibitória significativa a partir de
213 0,063x a dose recomendada, sobre os isolados de *Alternaria longipes-like*. Os valores de PIC
214 atingiram 88% com 187,5 ppm de difenoconazol; de 89% a 90%, com 207,5 ppm de
215 flutriafol; de 86% a 87% com 125 ppm de pirimetanil; e entre 59% a 63% utilizando 93,7
216 ppm de procimidona (Figura 3).

217 Sobre os isolados de *Alternaria tomato-like*, os fungicidas difenoconazol e
218 procimidona apresentaram efeito inibitório significativo a partir de 0,063x a dose
219 recomendada. flutriafol e pirimetanil atuaram inibindo a partir de 0,25x a dose recomendada.
220 Valores de PIC de 91% foram atingidos com 187,5 ppm de difenoconazol, 207,5 ppm de
221 flutriafol. e/ou 500 ppm de pirimetanil. Com 93,7 ppm de procimidona, foram alcançados
222 valores de PIC entre 62% e 78% (Figura 4).

223 Os fungicidas difenoconazol e procimidona, utilizados com 0,063x a dose
224 recomendada, inibiram de 81% a 87% e 68%, respectivamente, o desenvolvimento de *A.*
225 *jacinthicola*. Com 0,25x a dose recomendada, 207,5 ppm de flutriafol promoveu inibição de
226 82% a 88% e 500 ppm de pirimetanil inibiu de 89% a 91%. O isolado CFS 147, *Alternaria* sp.
227 alcançou PIC de 93% com difenoconazol e/ou flutriafol, 90% com pirimetanil e 70% com
228 procimidona, nas mesmas dosagens citadas anteriormente (Figura 5).

229 Em comparação a difenoconazol, flutriafol e pirimetanil, o fungicida procimidona não
230 desempenhou ação inibitória satisfatória em relação as espécies de *Alternaria*. Mesmo

231 utilizando a maior dosagem (1500 ppm), com exceção de *Alternaria tomato-like*, no qual foi
232 alcançado um PIC de 80%, os índices de inibição limitaram-se a, no máximo, 70% Em
233 condições semelhantes, utilizando as doses recomendadas, os demais químicos promoveram
234 PIC acima de 80% para a maioria dos isolados relacionados as espécies avaliadas.

235 **Discussão**

236 A ineficácia *in vitro* do fungicidas tiofanato-metílico sobre *A. alternata*, isolada da
237 erva-doce pode estar relacionada a resistência patogênica do fitopatógeno a essa molécula
238 química. Resultados compatíveis a essa assertiva foram relatados por Whang & Zhang (2018),
239 no qual todos os isolados de *A. alternata*, provenientes do tabaco, apresentaram alta
240 resistência ao fungicidas tiofanato-metílico. A utilização contínua e generalizada de
241 fungicidas, com modo de ação similar, promove uma forte pressão de seleção em populações
242 de patógenos, impulsionando o surgimento de mutantes fúngicos resistentes a esses químicos
243 (He et al., 2019). No caso de produtos do grupo benzimidazol, a resistência fúngica tem sido
244 associada a mutações de ponto único que são restritas a códons do gene β -tubulina (Zhang et
245 al., 2010; Whang & Zhang, 2018).

246 Em condições experimentais similares, os resultados apresentados nesse trabalho,
247 quanto ao uso de difenoconazol sobre espécies de *Alternaria*, são compatíveis aos relatados
248 por Thejakumar & Devappa (2016), nos quais doses a partir de 500 ppm, promoveram
249 porcentagem de inibições significativas de *Alternaria alternata*. Os resultados relacionados ao
250 flutriafol foram semelhantes aos resultados de difenoconazol, o que é compreensível, uma vez
251 que ambos os fungicidas pertencem ao mesmo grupo químico e, portanto, possuem o mesmo
252 modo de ação.

253 Estudos relatam que fungicidas do grupo triazol, como difenoconazol (Romero et al.,
254 2020) e flutriafol (Kongcharoen et al., 2020), são eficazes no controle de diferentes espécies,

255 pertencentes a muitos gêneros fúngicos fitopatogênicos, e sugerem que ele possui baixo risco
256 de promoção de resistência fúngica, uma vez que esses produtos apresentam efetividade
257 mesmo utilizando pequenas concentrações (Fonseka&Gudmestad, 2016, He et al., 2019).

258 Devido à extensa aplicação de produtos do grupo dicarboximida, como procimidona, a
259 resistência a este tipo de fungicidas tem sido relatada em diversos fungos fitopatogênicos,
260 incluindo *Alternaria* spp. como *A. alternata*, *A. brassicicola* e *A. longipes* (Avenot et al.,
261 2005, Dry et al., 2004, Luo et al., 2012, Wang et al., 2021). Considerando os resultados
262 apresentados por Wag et al. (2021), no qual isolados de *A. alternata* foram caracterizados
263 quanto ao nível de resistência a procimidona, nesse trabalho, apesar do efeito fungitóxico
264 moderado do procimidona sobre as espécies de *Alternaria* da erva-doce, os efeitos inibitórios
265 alcançados nos permitem inferir que os isolados testados nesse trabalho não possuem
266 resistência a esse produto.

267 A respeito das espécies de *Alternaria* da erva-doce, com exceção de um isolados de *A.*
268 *alternata* e dois de *A. tomato – like*, o fungicida pirimetanil proporcionou níveis de controle
269 significativo. Esses resultados estão fundamentados no alto nível de controle, com médio
270 risco de resistência fúngica, proporcionado pelo pirimetanil (Budde-Rodriguez et al., 2022).
271 Mesmo com boa estabilidade nos níveis par a maioria das espécies *Alternaria* avaliadas, há
272 relatos de ocorrência de resistência de alguns fungos fitopatogênicos submetidos ao
273 pirimetanil (Fonseka&Gudmestad, 2016), incluindo isolados de *A. solanie* *A. alternata*, que
274 não tiveram seu desenvolvimento afetados pelo fungicida (Fairchild et al. 2013).

275 A de ocorrência de efeito hormese, observado em isolados de *A. alternata* e *A. tomato-*
276 *like*, utilizados nesse estudo, podem indicar uma predisposição ao surgimento de linhagens
277 resistentes ao pirimetanil. Hormese é um conceito toxicológico, caracterizado por estimulação
278 de organismos expostos a doses subinibitórias de um agente estressor, como químicos ou

279 radiação, naturalmente tóxico em doses elevadas (Calabrese, 2015, Calabrese& Baldwin,
280 2002; Pradhan et al., 2019). Em fungos patogênicos a plantas, o efeito hormese pode ser
281 observado como dose-resposta no desenvolvimento micelial, por exemplo, em condições de
282 exposição a doses subinibitórias de fungicidas (Garzon et al., 2011, Lu et al., 2018). No
283 contexto agrícola, a exposição de patógenos a doses subletais ou subinibitórias de um
284 fungicida, que promovem estímulos no desenvolvimento desse patógeno, pode resultar em
285 aumento da virulência sobre safras (Di et al., 2015, Lu et al., 2018).

286 Embora os números de isolados representativos a cada espécie tenha sido pequeno,
287 esse trabalho apresenta informações inéditas acerca da ação de difenoconazol, flutriafol,
288 procimidona, pirimetanil e tiofanato-metílico, bem como a determinação de CE50, sobre
289 espécies de *Alternaria*, provenientes de cultivos de erva-doce. Diante da plasticidade
290 comportamental dos diferentes isolados e espécies abordadas nessa pesquisa, em respostas a
291 ação dos fungicidas testados, este trabalho representa contribuições significativas a
292 comunidade científica.

293 Os resultados aqui apresentados, servirão como base a futuras pesquisas sobre
294 espécies de *Alternaria* da erva-doce quanto a: sensibilidade/resistência fúngica aos fungicidas
295 citados; resposta patogênica quando submetidas a aplicações desses produtos *in vivo*,
296 ocorrência mutações gênicas em sítios compatíveis a ação desses fungicidas, melhoramento
297 genético e adoção de medidas de controle eficientes.

Referências

Avenot, H., Simoneau, P., Iacomivasilescu, B., Bataillesimoneau, N. 2005. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene *AbNIK1* from *Alternaria*

- brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrroleresistance. *Current Genetics*, <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0568-2>
- Budde-Rodriguez, S., Pasche, J. S., Mallik, I. & Gudmestad, N. C. 2022. Sensitivity of *Alternaria* spp. from potato to pyrimethanil, cyprodinil, and fludioxonil. *Crop Protection*, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105855>
- Calabrese, E. J. 2015. Hormesis: principles and applications. *Homeopathy*, 104, 69-82.
- Calabrese, E. J. & Baldwin, L. A. 2002. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, <https://doi.org/10.1191/0960327102ht217oa>
- Di, Y. L., Zhu, Z. Q., Lu, X. M., & Zhu, F. X. 2015. Pathogenicity stimulation of *Sclerotinia sclerotiorum* by subtoxic doses of carbendazim. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0161-RE>
- Dry, I. B., Yuan, K. H., Hutton, D. G. 2004. Dicarboximide resistance in field isolates of *Alternaria alternata* is mediated by a mutation in a two-component histidine kinase gene. *Fungal Genetics and Biology*, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.09.002>.
- Edgington, L. V. & Klew, K. L. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*. 61, 42-44.
- Fairchild K. L., Miles, T. D. & Wharton, P. S. 2013. Assessing fungicide resistance in populations of *Alternaria* in Idaho potato fields. *Crop Protect*, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.03.003>
- Fonseka, D. L. & Gudmestad, N. C. 2016. Spatial and temporal sensitivity of *Alternaria* species associated with potato foliar diseases to demethylation inhibiting and anilino-pyrimidine fungicides. *Plant Disease*, <http://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0116-RE>

- Garzon, C. D., Molineros, J. E., Yanez, J. M., Flores, F. J., Jimenez-Gasco, M. M. & Moorman G. W. 2011. Sublethal doses of mefenoxam enhance *Pythium* damping-off of geranium. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0693>
- He, M., Wang, Y., Wu, E., Shen, L., Yang, L., Wang, T., Shang, L., Zhu, W. & Zhan, J. 2019. Constraining Evolution of *Alternaria alternata* Resistance to a Demethylation Inhibitor (DMI) Fungicide Difenconazole. *Frontiers in Microbiology*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01609>
- Kongcharoen, N., Kaewsalong, N. & Dethou, T. 2020. Efficacy of fungicides in controlling rice blast and dirty panicle diseases in Thailand. *Scientific Reports*, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73222-w>
- Kumar, V., Singh, G., & Tyagi, A. 2017. Evaluation of Different Fungicides Against *Alternaria* Leaf Blight of Tomato (*Alternaria solani*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.605.262>
- Lu, X., He, S., Ma, H., Li, J. & Zhu, F. 2018. Hormetic effects of flusilazole preconditioning on mycelial growth and virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1638-RE>
- Luo, Y., Yang, J., Zhu, M. L., Liu, C. J., Li, H. Y., Lu, Z., et al. 2012. The group III two-component histidine kinase AIHK1 is involved in fungicides resistance, osmosensitivity, spore production and impacts negatively pathogenicity in *Alternaria longipes*. *Current Microbiology*, <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0093-8>
- Luo, Y., Yang, J., Zhu, M. L., Liu, C. J., Li, H. Y., Lu, Z., et al. 2012. The group III two-component histidine kinase AIHK1 is involved in fungicides resistance,

osmosensitivity, spore production and impacts negatively pathogenicity in *Alternaria longipes*. *Current Microbiology*, <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0093-8>

Ma, G., Bao, S., Sui, Y. & Wu, X. 2021. Morphological and Molecular Characterization of *Alternaria* Species Causing Leaf Blight on Watermelon in China. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0130-RE>

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2021. Agrofit—Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários from MAPA website. Brasil: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed: 10 outubro 2021.

Mu, X., Wang, K., Chai, T., Zhu, L., Yang, Y., Zhang, J. Pang, S., Wang, C. & Li, X. 2015. Sex specific response in cholesterol level in zebrafish (*Danio rerio*) after long-term exposure of difenoconazole. *Environmental Pollution*, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.11.019>

Pradham S., Miller, L., Marcillo, V., Koch, A. R., Grachet, N. G., Molineros, J. E., Walker, N. R. Melouk, H. & Garzon, C. D. 2019. Hormetic effects of thiophanate-methyl in multiple isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0872-RE>

Reis, R. F., de Goes, A., Mondal, S. N., Shilts, T., Brentu, F. C. & Timmer, L. W. 2006. Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. *Plant Disease*, <http://doi.org/10.1094/PD-90-1051>

Romero, P. I. A., Machado, J. P. H., Mizubuti, E. S., Sandoval, N. S. E. & Ferreira, A. F. T. A. F. 2020. A Pinta Preta (*Alternaria grandis*) - a inimiga da bataticultura brasileira.

- The Early Blight (*Alternaria grandis*) – the brazilian potato crop enemy. *Revista Agrária Acadêmica*, <http://doi.org/10.32406/v3n42020/57-65/agrariacad>
- Thejakumar, M. B. & Devappa, V. 2016. Efficacy of different fungicides against *Alternaria alternata* and *Cercosporacapsici* under in-vitro conditions. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(5), 126-129.
- Thomma, B. P. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, <http://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>
- Waghunde, R. R., Patel, U. T. & Vahunia, B. 2018. Morphological and cultural variability of *Alternaria Macrospora* causing leaf Blight in cotton. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3), 3096-3099.
- Wang, B., Lou, T., Wei, L., Chen, W., Huang, L. et al. 2021. Biochemical and molecular characterization of *Alternaria alternata* isolates highly resistant to procymidone from broccoli and cabbage. *Phytopathology Research*, <https://doi.org/10.1186/s42483-021-00092-z>
- Wang, H. C. & Zhang, C. Q. 2018. Multi-resistance to thiophanate-methyl, diethofencarb, and procymidone among *Alternaria alternata* populations from tobacco plants, and the management of tobacco brown spot with azoxystrobin. *Phytoparasitica*, <https://doi.org/10.1007/s12600-018-0690-6>
- Woudenberg, J. H., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., de Vries, M., Stielow, J. B., Thomma, B. P., et al. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: species, formaespeciales or pathotypes? *Studies in Mycology*, <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>

Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M. & Crous, P. W. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>

Zhang, C. Q., Liu, Y. H., & Zhu, G. N. 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. *European Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9557-5>

Tabela 1 Doses de fungicidas (ppm) utilizadas para a determinação da concentração mínima inibitória - CMI desses produtos sobre espécies de *Alternaria* *in vitro*

Dfator**	Doses de fungicidas (ppm)*				
	Difenoconazol	Flutriafol	Pirimetaniil	Procimidona	Tiofanato-metílico
2	6000	1660	4000	3000	1400
1	3000	830	2000	1500	700
0,5	1500	415	1000	750	350
0,25	750	207,5	500	375	175
0,125	375	103,7	250	187,5	87,5
0,063	187,5	52,3	125	93,7	43,7
0,031	93,7	25,7	62,5	46,9	21,8
0,016	46,9	12,8	31,2	23,4	10,9
0,008	23,4	6,4	15,6	11,7	5,5
0,004	11,7	3,2	7,8	5,9	2,7

* Fungicidas: Difenoconazol: Score® (0,6 l para 200 l de calda), Flutriafol: Tenaz 250 SC (0,5 l para 600 l de calda), pirimetaniil: Mythos®, (200 ml para 100 l de calda), procimidona: Sumilex 500 WP (150 g para 100 l de calda) e tiofanato-metílico: Cercobin® 875 WG (70 g para 100 l de calda). Doses estabelecidas para o controle de *Alternariaspp.* de acordo com a regulamentação do Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA;

**Dfator = Fator de diluição aplicado a dose de fungicida regulamentada pelo MAPA. As doses de fungicida regulamentadas (ppm) foram destacadas em negrito.

Tabela 2 Efeito, valores de CE₅₀ e classificação fungitóxica de difenoconazol (Score®) sobre o diâmetro do crescimento micelial – DCM (cm)* de espécies de *Alternaria*, após oito dias de cultivo *in vitro*

Dose (ppm)	<i>A. alternata</i>			<i>A. longipes</i> – like			<i>A. tomato</i> - like			<i>A. jacinthicola</i>		<i>Alternaria sp.</i>
	CFS 026	CFS 076	CFS 140	CFS 163	CFS 213	CFS 025	CFS 033	CFS 142	CFS 042	CFS 146	CFS 147	
3000	0,59 ± 0,18 A	0,60 ± 0,20 A	0,5 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,53 ± 0,00 A	0,50 ± 0,05 A	0,68 ± 0,13 A	0,50 ± 0,00 A	
750	0,53 ± 0,05 A	0,56 ± 0,15 A	0,5 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,71 ± 0,00 B	0,50 ± 0,28 A	0,86 ± 0,03 B	0,50 ± 0,00 A	
187,5	0,56 ± 0,13 A	0,50 ± 0,00 A	0,5 ± 0,00 A	0,63 ± 0,25 A	0,56 ± 0,13 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,75 ± 0,00 B	0,50 ± 0,06 A	0,87 ± 0,07 B	0,50 ± 0,00 A	
46,9	0,79 ± 0,20 A	0,82 ± 0,09 B	0,75 ± 0,06 B	0,73 ± 0,17 A	0,77 ± 0,21 B	0,90 ± 0,23 B	0,90 ± 0,14 B	1,16 ± 0,15 C	0,71 ± 0,11 B	0,98 ± 0,09 B	0,89 ± 0,14 B	
11,7	1,40 ± 0,12 B	1,93 ± 0,10 C	1,35 ± 0,09 C	1,39 ± 0,31 B	1,65 ± 0,02 C	1,69 ± 0,15 C	1,58 ± 0,24 C	2,04 ± 0,03 D	1,18 ± 0,09 C	1,78 ± 0,28 C	1,43 ± 0,09 C	
0	6,00 ± 0,57 C	4,19 ± 0,06 D	6,92 ± 0,63 D	5,49 ± 0,46 C	4,75 ± 0,09 D	5,78 ± 0,39 D	5,69 ± 0,05 D	5,61 ± 0,34 E	5,94 ± 0,29 D	4,70 ± 0,26 D	7,45 ± 0,48 D	
CE₅₀ (ppm)	0,11	6,78	0,01	0,36	1,41	1,02	0,62	0,02	1,56	1,77	0,02	
Fungitoxicidade	Alta	Moderada	Alta	Alta	Moderada	Moderada	Alta	Alta	Moderada	Moderada	Alta	

* A dose de 3000 ppm representa a dosagem regulamentada (0,6 l para 200 l de calda) e 0 ppm representa a ausência do fungicida.

** Valores médios de DCM ± valores de desvio médio. Diferentes letras maiúsculas, na coluna, representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em DIC.

CE₅₀ = Concentração efetiva capaz de inibir 50% do crescimento micelial.

Fungitoxicidade: CE₅₀ < 1 ppm = Alto; 1 < CE₅₀ < 50 ppm = Moderada; CE₅₀ > 50 = não tóxico.

Tabela 3 Efeito, valores de CE₅₀ e classificação fungitóxica de flutriafol (Tenaz 250 SC) sobre o diâmetro do crescimento micelial – DCM (cm)* de espécies de *Alternaria*, após oito dias de cultivo *in vitro*

Dose (ppm)	<i>A. alternata</i>		<i>A. longipes</i> - like			<i>A. tomato</i> - like			<i>A. jacinthicola</i>		<i>Alternaria</i> sp.
	CFS 026	CFS 076	CFS 140	CFS 163	CFS 213	CFS 025	CFS 033	CFS 142	CFS 042	CFS 146	CFS 147
830	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,5 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A
207,5	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,5 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 B	1,04 ± 0,65 A	0,54 ± 0,08 A	0,50 ± 0,00 A
52,3	1,27 ± 0,73 B	3,11 ± 0,09 B	0,5 ± 0,00 A	2,96 ± 1,32 B	3,77 ± 0,21 B	3,10 ± 0,15 B	2,88 ± 0,11 B	2,21 ± 0,43 B	2,36 ± 1,58 A	3,21 ± 0,11 B	0,50 ± 0,00 A
12,8	4,78 ± 0,12 C	3,70 ± 0,07 C	3,06 ± 0,78 B	5,08 ± 0,36 C	4,61 ± 0,05 C	4,33 ± 0,19 C	4,30 ± 0,11 C	3,81 ± 0,14 C	4,18 ± 0,06 B	4,11 ± 0,06 C	4,26 ± 0,38 B
3,2	5,76 ± 0,32 D	3,91 ± 0,06 D	4,93 ± 0,29 C	5,49 ± 0,24 C	4,75 ± 0,42 C	5,34 ± 0,28 D	5,40 ± 0,16 D	4,90 ± 0,20 D	4,56 ± 0,08 B	4,58 ± 0,09 D	5,88 ± 0,13 C
0	6,00 ± 0,57 D	4,19 ± 0,06 E	6,9 ± 0,63 D	5,49 ± 0,46 C	4,96 ± 0,09 C	5,78 ± 0,39 E	5,69 ± 0,05 E	5,61 ± 0,34 E	5,94 ± 0,29 B	4,70 ± 0,26 D	7,45 ± 0,48 D
CE₅₀ (ppm)	10,44	4,43	8,76	4,47	2,42	8,85	7,46	18,13	30,15	4,19	13,89
Fungitoxicidade	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada

* A dose de 830 ppm representa a dosagem regulamentada (0,5 l para 600 l de calda) e 0 ppm representa a ausência do fungicida.

** Valores médios de DCM ± valores de desvio médio. Diferentes letras maiúsculas, na coluna, representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em DIC.

CE₅₀ = Concentração efetiva capaz de inibir 50% do crescimento micelial.

Fungitoxicidade: CE₅₀ < 1 ppm = Alto; 1 < CE₅₀ < 50 ppm = Moderada; CE₅₀ > 50 = não tóxico.

Tabela 4 Efeito, valores de CE₅₀ e classificação fungitóxica de pirimetanil (Mythos®) sobre o diâmetro do crescimento micelial – DCM (cm)* de espécies de *Alternaria*, após oito dias de cultivo *in vitro*

Dose (ppm)**	<i>A. alternata</i>			<i>A. longipes</i> - like			<i>A. tomato</i> - like			<i>A. jacinthicola</i>		<i>Alternaria</i> sp.
	CFS 026	CFS 076	CFS 140	CFS 163	CFS 213	CFS 025	CFS 033	CFS 142	CFS 042	CFS 146	CFS 147	
2000	0,74 ± 0,16 A	0,55 ± 0,10 A	0,70 ± 0,00 B	0,68 ± 0,13 A	0,55 ± 0,10 A	0,73 ± 0,05 B	0,50 ± 0,00 A	0,91 ± 0,09 B	0,58 ± 0,10 A	0,50 ± 0,00 A	0,99 ± 0,09 A	
500	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,59 ± 0,06 A	0,50 ± 0,00 A	0,55 ± 0,10 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,50 ± 0,00 A	0,68 ± 0,35 A	
125	1,28 ± 0,09 B	0,56 ± 0,10 A	3,42 ± 0,18 C	0,72 ± 0,22 A	0,65 ± 0,19 A	1,16 ± 0,06 C	0,63 ± 0,10 A	1,53 ± 0,13 C	1,79 ± 0,30 B	1,56 ± 0,28 B	2,24 ± 0,86 B	
31,2	1,99 ± 0,42 B	1,14 ± 0,25 B	6,58 ± 0,39 D	1,69 ± 0,55 B	0,93 ± 0,19 A	1,54 ± 0,18 D	1,03 ± 0,29 B	1,50 ± 0,23 C	2,35 ± 0,26 C	2,43 ± 0,28 C	4,29 ± 2,00 C	
7,8	4,33 ± 1,59 C	1,53 ± 0,45 C	6,91 ± 0,63 D	1,96 ± 0,31 B	0,81 ± 0,99 A	1,55 ± 0,18 D	0,85 ± 0,04 B	1,70 ± 0,09 C	2,66 ± 0,47 C	2,33 ± 0,22 C	5,84 ± 1,57 D	
0	6,00 ± 0,57 D	4,19 ± 0,06 D	7,13 ± 0,63 D	5,49 ± 0,46 C	4,96 ± 0,09 B	5,78 ± 0,39 E	5,69 ± 0,05 C	5,61 ± 0,34 E	5,94 ± 0,29 D	4,70 ± 0,26 D	7,45 ± 0,48 D	
CE₅₀ (ppm)	7,64	0,46	5,53	0,38	0,16	0,02	0,01	0,05	1,84	4,62	6,73	
Fungitoxicidade	Moderada	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Moderada	Moderada	Moderada	

*Valores médios de DCM ± valores de desvio médio. Diferentes letras maiúsculas, na coluna, representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em DIC.

** 2000 ppm representa a dosagem regulamentada (200 ml d para 100 l de calda) e 0 ppm representa a ausência do fungicida.

CE₅₀ = Concentração efetiva capaz de inibir 50% do crescimento micelial.

Fungitoxicidade: CE₅₀ < 1 ppm = Alto; 1 < CE₅₀ < 50 ppm = Moderada; CE₅₀ > 50 = não tóxico.

Tabela 5 Efeito, valores de CE₅₀ e classificação fungitóxica de procimidona (Sumilex 500 WP) sobre o diâmetro do crescimento micelial – DCM (cm)* de espécies de *Alternaria*, após oito dias de cultivo *in vitro*

Dose (ppm)**	<i>A. alternata</i>		<i>A. longipes</i> - like			<i>A. tomato</i> - like			<i>A. jacinthicola</i>		<i>Alternaria</i> sp.
	CFS 026	CFS 076	CFS 140	CFS 163	CFS 213	CFS 025	CFS 033	CFS 142	CFS 042	CFS 146	CFS 147
1500	2,70 ± ^{0,12} A	1,85 ± ^{0,06} A	1,53 ± ^{0,05} A	1,98 ± ^{0,13} A	2,00 ± ^{0,72} A	1,86 ± ^{0,13} A	1,80 ± ^{0,34} A	1,50 ± ^{0,08} A	2,60 ± ^{1,80} A	1,75 ± ^{0,06} A	2,08 ± ^{1,02} A
375	2,93 ± ^{0,05} B	1,73 ± ^{0,05} A	1,63 ± ^{0,10} A	2,08 ± ^{0,13} A	2,23 ± ^{1,44} A	1,83 ± ^{0,10} A	2,38 ± ^{0,69} B	1,45 ± ^{0,10} A	2,30 ± ^{0,78} A	1,73 ± ^{0,05} A	1,88 ± ^{0,26} A
93,7	2,98 ± ^{0,05} B	2,08 ± ^{0,05} B	2,00 ± ^{0,08} B	2,20 ± ^{0,08} A	2,55 ± ^{0,05} A	1,90 ± ^{0,08} A	2,08 ± ^{0,15} A	1,60 ± ^{0,14} A	2,00 ± ^{0,08} A	1,93 ± ^{0,13} B	2,08 ± ^{0,17} A
23,4	3,13 ± ^{0,13} C	2,48 ± ^{0,10} C	2,68 ± ^{0,17} C	2,50 ± ^{0,20} B	2,95 ± ^{0,06} A	2,33 ± ^{0,13} B	2,55 ± ^{0,06} B	1,80 ± ^{0,08} B	2,38 ± ^{0,10} A	2,13 ± ^{0,10} C	2,95 ± ^{0,13} B
5,9	3,65 ± ^{0,07} D	3,53 ± ^{0,15} D	5,53 ± ^{0,21} D	4,33 ± ^{0,10} C	4,70 ± ^{0,14} B	3,78 ± ^{0,05} C	4,50 ± ^{0,12} C	3,83 ± ^{0,05} C	4,15 ± ^{0,06} B	3,78 ± ^{0,05} D	5,16 ± ^{0,10} C
0	6,00 ± ^{0,57} D	4,19 ± ^{0,06} E	7,13 ± ^{0,63} E	5,49 ± ^{0,46} D	4,96 ± ^{0,09} C	5,78 ± ^{0,39} D	5,69 ± ^{0,05} D	5,61 ± ^{0,34} D	5,94 ± ^{0,29} C	4,70 ± ^{0,26} E	7,45 ± ^{0,48} D
CE₅₀ (ppm)	3,71	40,42	15,16	24,19	19,17	5,13	19,76	4,81	15,89	12,72	20,56
Fungitoxicidade	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada

*Valores médios de DCM ± valores de desvio médio. Diferentes letras maiúsculas, na coluna, representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em DIC.

** 1500 ppm representa a dosagem regulamentada (150 g para 100 l de calda) e 0 ppm representa a ausência do fungicida.

CE₅₀ = Concentração efetiva capaz de inibir 50% do crescimento micelial.

Fungitoxicidade: CE₅₀ < 1 ppm = Alto; 1 < CE₅₀ < 50 ppm = Moderada; CE₅₀ > 50 = não tóxico.

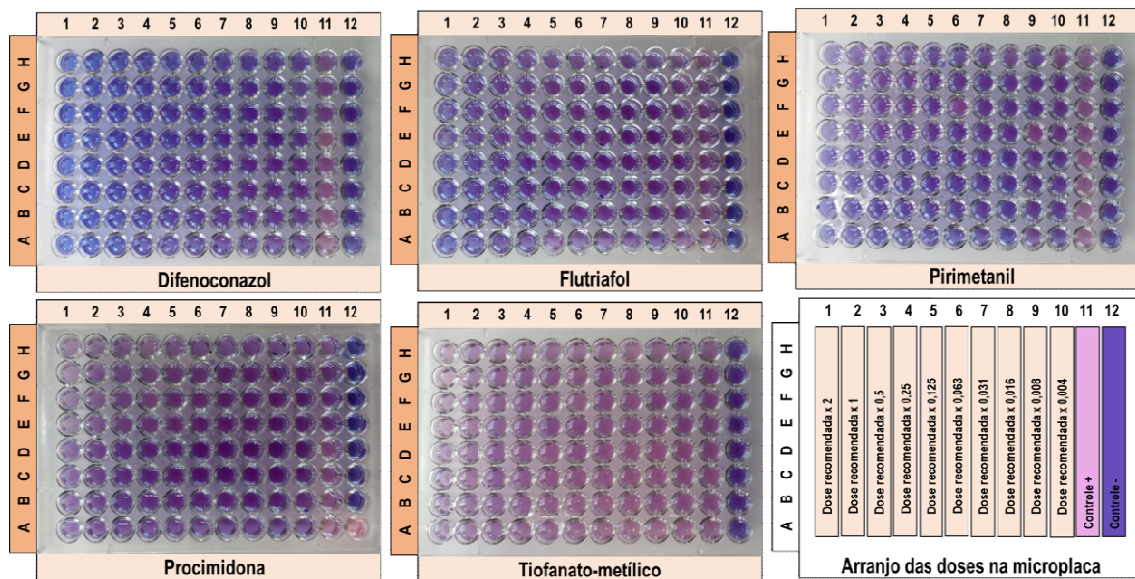


Fig. 1. Resultado do teste de sensibilidade de *Alternariaalternata* (CFS 026) aos fungicidas difenoconazol (Score®), pirimetanil (Mythos), flutriafol (Tenaz 250 SC), procimidona (Sumilex 500 WP) e tiofanato-metílico (Cercobin® 875 WG), para determinação da concentração mínima inibitória – CMI (ppm), após 24 h de incubação.

Nota: As placas foram observadas 3 h, após a coloração com resazurin 0,1%; doses recomendadas: difenoconazol (3000 ppm), pirimetanil (2000 ppm), flutriafol (830 ppm), procimidona (1500 ppm) e tiofanato-metílico (700 ppm).

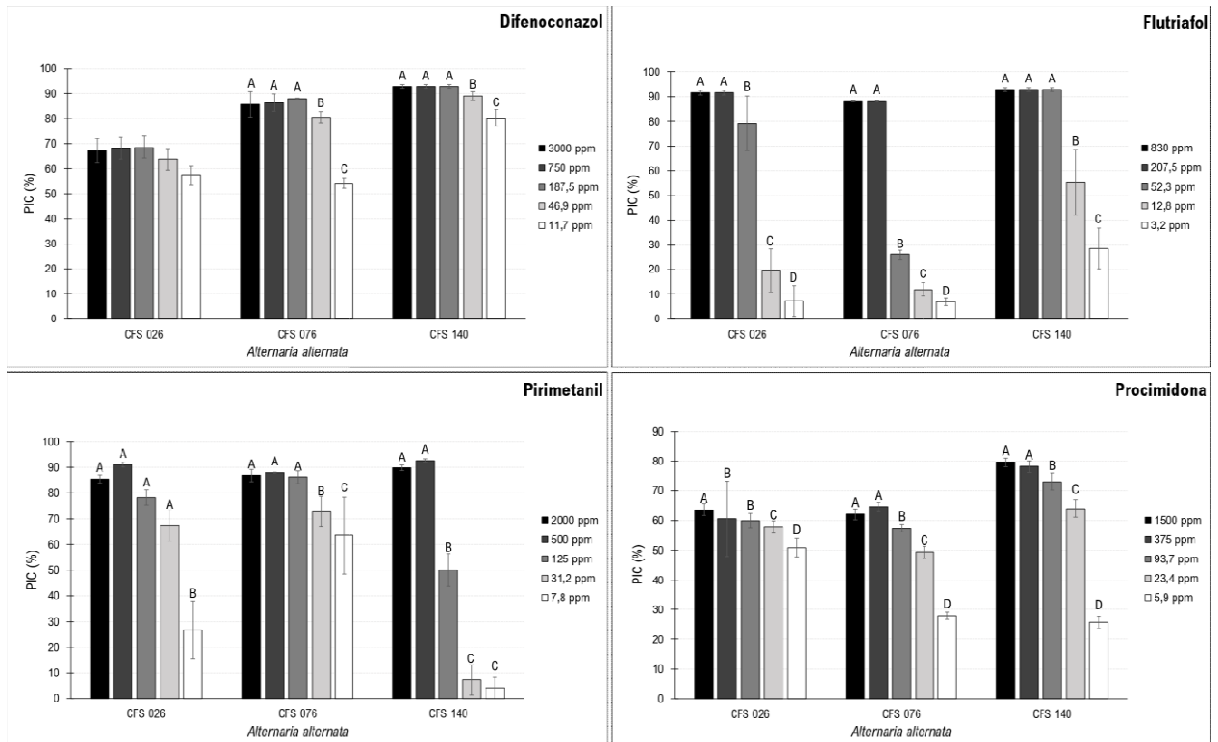


Fig. 2. Porcentagem de inibição de crescimento micelial – PIC (%) de *Alternaria alternata* (CFS 026, CFS 076 e CFS 140) cultivados por oito dias *in vitro*, sob diferentes doses de: difenoconazol, flutriafol, pirimetanil e procimidona (ppm). **Nota:** Colunas pretas representam o PIC da dose recomendada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, sobre cada isolado testado; Valores médios de PIC foram determinados segundo a equação: $PIC = \frac{C_c - C_t}{C_c} * 100$, sendo C_c = Crescimento do controle; C_t = Crescimento tratamento; Para um isolado, diferentes letras representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em DIC.

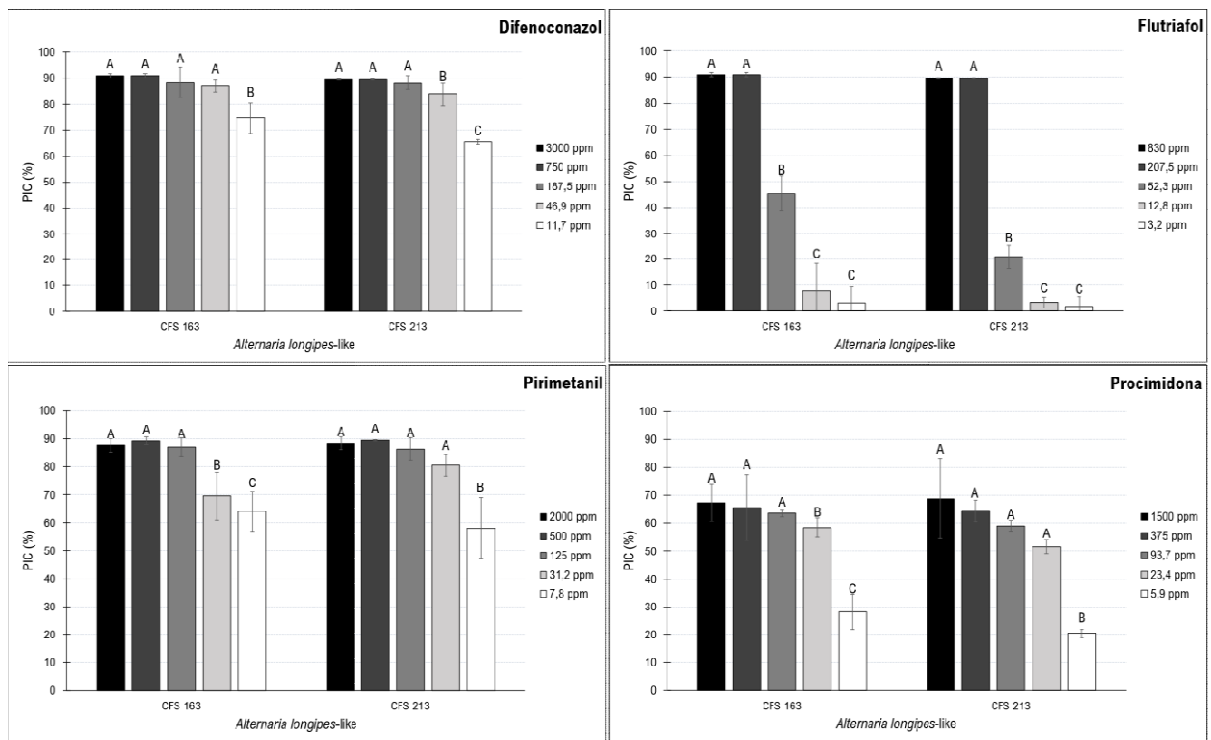


Fig. 3. Porcentagem de inibição de crescimento micelial – PIC (%) de *Alternaria longipes*-like (CFS 163 e CFS 213) cultivados por oito dias *in vitro*, sob diferentes doses de: difenoconazol, flutriafol, pirimetanil e procimidona (ppm). **Nota:** Colunas pretas representam o PIC da dose recomendada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, sobre cada isolado testado; Valores médios de PIC foram determinados segundo a equação: $PIC = \frac{C_c - C_t}{C_c} * 100$, sendo C_c = Crescimento do controle; C_t = Crescimento tratamento; Para um isolado, diferentes letras representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em DIC.

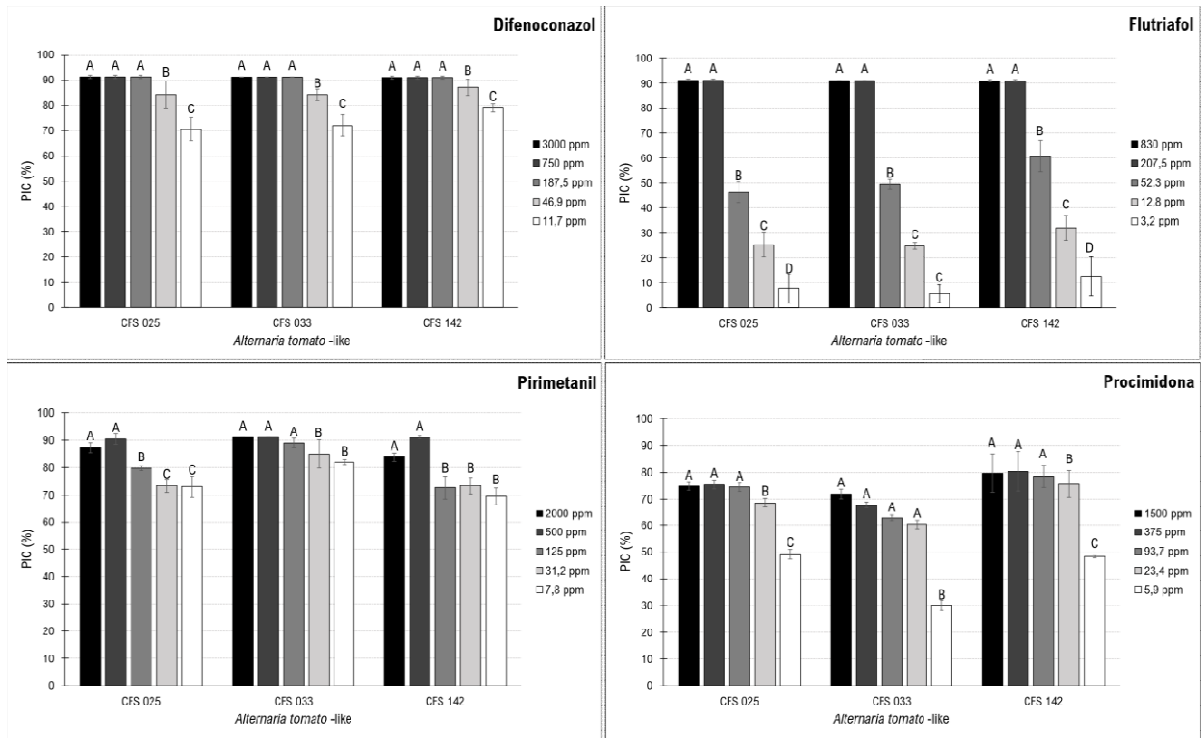


Fig. 4. Porcentagem de inibição de crescimento micelial – PIC (%) de *Alternaria tomato*-like (CFS 025, CFS 033 e CFS 142) cultivados por oito dias *in vitro*, sob diferentes doses de: difenoconazol, flutriafol, pirimetanil e procimidona (ppm). **Nota:** Colunas pretas representam o PIC da dose recomendada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, sobre cada isolado testado; Valores médios de PIC foram determinados segundo a equação: $PIC = \frac{C_c - C_t}{C_c} * 100$, sendo C_c = Crescimento do controle; C_t = Crescimento tratamento; Para um isolado, diferentes letras representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, em DIC.

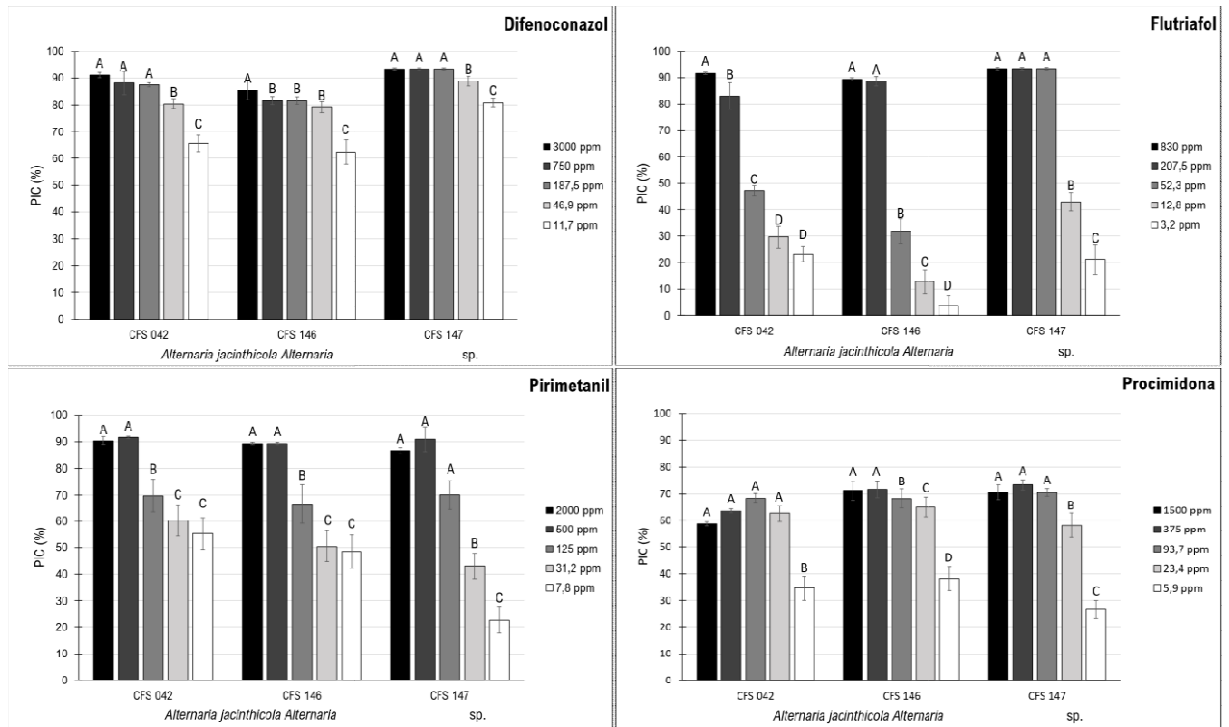


Fig. 5. Porcentagem de inibição de crescimento micelial – PIC (%) de *Alternaria jacinthicola* (CFS 042 e CFS 146) e *Alternaria* sp. (CFS 147) cultivados por oito dias *in vitro*, sob diferentes doses de: difenoconazol, flutriafol, pirimetanil e procimidona (ppm). **Nota:** Colunas pretas representam o PIC da dose recomendada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, sobre cada isolado testado; Valores médios de PIC foram determinados segundo a equação: $PIC = \frac{C_c}{C_t} * 100$, sendo C_c = Crescimento do controle; C_t = Crescimento tratamento; Para um isolado, diferentes letras representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) pelo teste de Scott knott a 5% de probabilidade, em DIC.

Capítulo V

Conclusões Gerais

A partir do exposto conclui-se que:

- Quatro diferentes espécies e uma linhagem monofiléticas desconhecida do gênero *Alternaria* são responsáveis por causar a mancha foliar de *Alternaria* em erva-doce nos estados do Nordeste do Brasil;
- As espécies causadoras da mancha foliar de *Alternaria* não diferem quanto ao nível de agressividade;
- Os fungicidas difenoconazol, flutriafol e pirimetanil são potenciais controladores do crescimento micelial de *Alternaria* spp., sendo portanto, indicados para realização de testes in vivo, com destaque para o bom desempenho do primeiro.