



MARCOS VINÍCIUS CORRÊA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS NA
DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Alternaria alternata*
PATOTIPO TANGERINA, A FUNGICIDA SDHI**

LAVRAS – MG

2023

MARCOS VINÍCIUS CORRÊA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS NA DETERMINAÇÃO DA
SENSIBILIDADE DE *Alternaria alternata* PATOTIPO TANGERINA, A FUNGICIDA
SDHI**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Eduardo Alves

Orientador

Ma. Indiara Carol Lopes Pinheiro

Coorientadora

LAVRAS – MG

2023

MARCOS VINÍCIUS CORRÊA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS NA DETERMINAÇÃO DA
SENSIBILIDADE DE *Alternaria alternata* PATOTIPO TANGERINA, A FUNGICIDA
SDHI**

**EVALUATION OF DIFFERENT METHODS FOR DETERMINING THE
SENSITIVITY OF *Alternaria alternata* PATHOTYPE TANGERINE, THE SDHI
FUNGICIDE**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 16 de março de 2023.

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dr. Patricia Ricardino da Silveira UFLA

Ma. Indiara Carol Lopes Pinheiro UFLA

Adriano Francis Dorigan UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves

Orientador

Ma. Indiara Carol Lopes Pinheiro

Coorientadora

LAVRAS – MG

2023

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Adriana e Deivison, os responsáveis pela minha formação como pessoa. A minha irmã, Gabriela, pela amizade e companheirismo.

Aos meus avós Paulo e Vilma, pela educação e grande exemplo de vida.

A todos os meus outros familiares, que me apoiaram e ajudaram em momentos difíceis.

À Julia Carvalho, por todos diálogos, conselhos, puxões de orelha, paciência e, especialmente, pela amizade incondicional.

Ao meu amigo, Otávio Machado, por todos os conselhos, momentos de descontração, companheirismo e, especialmente, pela confiança e amizade construída.

Ao professor Dr. Eduardo Alves pela orientação e oportunidade de trabalhar no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA.

À minha coorientadora mestre Indiara Pinheiro, pelos ensinamentos, suporte e paciência durante a condução dos meus experimentos.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, pelo convívio diário e ensinamentos transmitidos.

A todos os meus professores, que contribuíram com o conhecimento a mim transmitido.

Finalmente, a todas as outras pessoas que, por ventura, fizeram parte da minha vida e contribuíram para este trabalho de alguma maneira, direta ou indiretamente.

Obrigado!

RESUMO

A mancha marrom de alternaria, causada por *Alternaria alternata* patótipo tangerina é uma importante doença fúngica que afeta tangerinas, tangelos e tangores, gerando sérios danos à produção. No Brasil, o primeiro relato do patógeno ocorreu no Rio de Janeiro em 2001 e atualmente a doença está disseminada em vários estados, com ênfase em Minas Gerais, sendo o município de Campanha um dos maiores produtores do país. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar diferentes métodos na determinação da sensibilidade de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina, a um fungicida inibidor da succinato desidrogenase. Foram avaliadas as sensibilidades de 7 isolados de *A. alternata* obtidos de folhas e frutos de Tangerina Ponkan da cidade de Campanha no estado de Minas Gerais ao fungicida Cantus, pertencente ao grupo químico dos inibidores da succinato desidrogenase (SDHI). O fungicida foi adicionado em meio de cultura BDA com e sem ácido salicilhidroxâmico (SHAM) em dose discriminatória de 10ppm. A avaliação consistiu na determinação da inibição do crescimento micelial, comparado com a testemunha. Quando comparados os resultados entre os experimentos de crescimento micelial sem SHAM e com SHAM, observou-se um decréscimo médio de 9,97mm no crescimento micelial com SHAM. Tal resultado justifica o uso do SHAM como inibidor da rota alternativa de respiração fúngica. Nos experimentos de crescimento micelial todos os isolados foram fenotipicamente sensíveis, isso é, com valores de crescimento relativo menores que 50%, por outro lado, nos experimentos de germinação apenas o isolado CP4 apresentou fenótipo de sensibilidade. Portanto, visto que a avaliação da germinação de esporos é o método mais utilizado para avaliação da sensibilidade a fungicidas, é possível inferir que a avaliação do crescimento micelial não é um método eficiente para determinação de sensibilidade.

Palavras-chave: Mancha marrom de alternaria; boscalida; dose discriminatória; ácido salicilhidroxâmico.

SUMMARY

Alternaria brown spot, caused by *Alternaria alternata* pathotype tangerine, is an important fungal disease that affects tangerines, tangelos and tangors, causing serious damage to production. In Brazil, the first report of the pathogen occurred in Rio de Janeiro in 2001 and the disease is currently disseminated in several states, with emphasis on Minas Gerais, with the municipality of Campanha being one of the largest producers in the country. In this context, the objective of this work was to compare different methods for determining the sensitivity of *A. alternata* pathotype tangerine isolates to a succinate dehydrogenase inhibitor fungicide. The sensitivities of 7 isolates of *A. alternata* obtained from leaves and fruits of Tangerina Ponkan from the city of Campanha in the state of Minas Gerais to the fungicide Cantus, belonging to the chemical group of succinate dehydrogenase (SDHI) inhibitors, were evaluated. The fungicide was added to PDA culture medium with and without salicylhydroxamic acid (SHAM) at a discriminating dose of 10ppm. The evaluation consisted of determining the inhibition of mycelial growth, compared with the control. When comparing the results between mycelial growth experiments without SHAM and with SHAM, an average decrease of 9.97mm in mycelial growth with SHAM was observed. This result justifies the use of SHAM as an inhibitor of the alternative route of fungal respiration. In the mycelial growth experiments, all isolates were phenotypically sensitive, that is, with relative growth values lower than 50%, on the other hand, in the germination experiments, only the CP4 isolate showed a sensitivity phenotype. Therefore, since the evaluation of spore germination is the most used method for evaluating sensitivity to fungicides, it is possible to infer that the evaluation of mycelial growth is not an efficient method for determining sensitivity.

Keywords: *Alternaria* brown spot; boscalid; discriminatory dose; salicylhydroxamic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Informações sobre os isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina utilizados: município de origem, código do isolado, hospedeiro e data da coleta dos isolados.	14
Tabela 2 - Características do fungicida utilizado: ingrediente ativo (i.a.), produto comercial, empresa fabricante e concentração do ingrediente ativo (i.a.) no produto comercial.	14
Tabela 3 - Crescimento relativo (CR) de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina produzidas em meio de cultura BDA. As médias representam os resultados do experimento com e sem SHAM. ..	18
Tabela 4 - Porcentagem de germinação de esporos de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina produzidos em meio de cultura Ágar-Água.....	19
Figura 1 - Preparação para avaliação de resistência <i>in vivo</i> . (A) Sequencia de imersão (Etanol 70%, hipoclorito de sódio, água, água); (B) Secagem; (C) Ajuste da concentração de conídios com auxílio da câmara de Neubauer; (D) folhas inoculadas.	17
Figura 2 - Preparação para observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV). (A) Karnovsky (pH 7,2) e tampão cacodilato 0,05M; Série de acetona para desidratação; (C) Stubs.	17
Figura 3 - Crescimento micelial de colônias de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina produzidas em meio de cultura BDA. As médias representam os resultados do experimento com e sem SHAM.....	18
Figura 4 - Eletromicrografias de varredura com detalhes de conídios de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina em folhas destacadas de tangelo. Sendo (A) controle do isolado CP1; (B) controle do isolado CP1; (C) tratamento a 10 ppm de boscalida; (D) tratamento a 10 ppm de boscalida; (E) controle do isolado CP4; (F) controle do isolado CP4; (G) tratamento a 10 ppm de boscalida; (H) tratamento a 10 ppm de boscalida.....	20
Figura 5 - Eletromicrografias de varredura com detalhes de conídios de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina em folhas destacadas de tangelo. Sendo A e B isolado CP20; C e D isolado CP27. 21	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Produção de tangerina	11
2.2	Mancha marrom de alternaria.....	11
2.3	Controle da mancha marrom de alternaria	12
2.4	Fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (ISDH).....	12
2.5	Resistência de <i>A. alternata</i> a fungicidas QoI, DMI e SDHI	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Isolados de <i>Alternaria alternata</i>	14
3.2	Fungicida.....	14
3.3	Avaliação da sensibilidade de <i>Alternaria alternata</i> a SDHI por meio do crescimento micelial	15
3.5	Avaliação da sensibilidade de <i>Alternaria alternata</i> a SDHI por meio da germinação	15
3.6	Avaliação da resistência prática.....	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5	CONCLUSÃO.....	22
	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

A mancha marrom de alternaria (MMA), causada por *Alternaria alternata* patótipo tangerina é uma importante doença fúngica que afeta tangerinas, tangelos e tangores, gerando sérios danos à produção. A presença desta em áreas de cultivo de citros já foi relatada em diversos países. No Brasil, o primeiro relato ocorreu no Rio de Janeiro, em 2001 e atualmente a doença está disseminada em vários estados, com ênfase em Minas Gerais, especialmente no município de Campanha, um dos maiores produtores do país (GOES et al., 2001; TIMMER et al., 2003).

Embora muito cultivada a variedade de tangerina Ponkan é bastante suscetível à mancha marrom de alternaria. O patógeno atinge órgãos jovens da parte aérea da planta causando lesões de coloração marrom escura em folhas e frutos jovens, e lesões de coloração marrom com presença de halo amarelado em folhas maduras (SPÓSITO et al.; TIMMER et al., 2003).

O controle da MMA requer táticas de manejo integrado, com a combinação de práticas culturais e aplicação de fungicidas. O uso de fungicidas constitui a principal medida de controle da mancha marrom de alternaria. Os fungicidas comerciais mais utilizados são à base de cobre e os inibidores da quinona oxidase (QoI), ou a sua combinação com inibidores da desmetilação (DMI) (MENDONÇA; PEREZ & TIMMER, 2005).

Devido a importância do controle da doença para garantir uma boa produção, são necessárias sucessivas pulverizações, muitas vezes de forma sequencial com o mesmo mecanismo de ação, de QoI ou DMI. Essa forma de manejo pode levar a perda da sensibilidade do patógeno (BRENT & HOLLOWAY, 2007a), dificultando e comprometendo a eficiência dos tratamentos, como já verificados no estado da Flórida nos Estados Unidos (VEGA & DEWDNEY, 2014).

Os fungicidas pertencentes ao grupo ISDH atuam no complexo mitocondrial II, mais especificamente na enzima succinato desidrogenase (SDH). Atuam bloqueando o transporte de elétrons da succinato para ubiquinona, e impedindo a conversão de succinato a fumarato, interferindo em dois processos importantes, sendo eles: o transporte de elétrons mitocondrial e no ciclo de Krebs (STAMMLER et al., 2015; KLAPPACH & STAMMLER, 2019). Embora os novos fungicidas ISDH sejam eficientes para o manejo de diversas doenças, sua utilização excessiva, sem a rotação de modos de ação, tem favorecido o aumento da pressão de seleção de indivíduos resistentes ou com sensibilidade reduzida a diferentes fitopatógenos (AVENOT & MICHAILIDES, 2010).

No Brasil o fungicida Cantus não é registrado para o controle da MMA, entretanto existem trabalhos nos EUA verificando a sensibilidade de *A. alternata* à boscalida. Sendo assim, é necessário verificar a sensibilidade de *A. alternata* a outros grupos de fungicidas, como o dos inibidores da succinato desidrogenase (ISDH) ao qual pertence o Cantus.

Tendo em vista o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos na determinação da sensibilidade de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina a fungicida inibidor da succinato desidrogenase.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de tangerina

A produção mundial de tangerinas e seus híbridos atingiu 39,1 milhões de toneladas em 2020. A China é o país que mais produz tangerina no mundo, com 59,1% da produção total. O Brasil é o quarto maior produtor mundial, com 2,6% da produção em 2020 (FAO, 2023), sendo a tangerina Ponkan, a principal cultivar plantada no país (LORENZI et al. 2006).

No Brasil, os principais Estados produtores são: São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná. Sendo eles responsáveis por aproximadamente 86% do total da produção brasileira. Minas Gerais é o segundo maior produtor, com 233.048 toneladas/ano em média no período de 2019 a 2021 (IBGE, 2023).

Em Minas Gerais o município de Campanha destaca-se por ser o maior produtor de tangerina Ponkan do estado, com produção média de 42.900 toneladas/ano e o terceiro maior produtor no Brasil (IBGE, 2023).

2.2 Mancha marrom de alternaria

A mancha marrom de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria alternata* patótipo tangerina (Fr:Fr) Keissler., já foi relatada em diversos países produtores de citros (TIMMER et al., 2003). No Brasil, o primeiro relato foi no Rio de Janeiro, em 2001 (GOES et al., 2001), e posteriormente foi relatada presente em outros estados produtores de citros, como São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná, afetando seriamente os pomares formados pela tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) e tangor Murcott, principais variedades cultivadas no País. (SPÓSITO et al., 2003).

O ciclo da MMAse inicia com a sobrevivência do patógeno em folhas, ramos e frutos afetados, presentes na planta ou em restos culturais (TIMMER et al., 1998). Os conídios, são produzidos em abundância na superfície das lesões de tecidos maduros ou mortos e disseminados pela ação de chuva e vento. O processo de infecção e colonização de *A. alternata* ocorre pela penetração direta ou através dos estômatos, iniciando a produção de toxina hospedeiro específica, a ACT, causando a destruição das células ao redor do ponto de penetração garantindo nutrientes para sua sobrevivência (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER et al., 2003). Períodos de molhamento foliar de 10 a 12 horas e temperaturas de 20 a 30°C favorecem a infecção do patógeno (TIMMER et al., 2003; STUART et al., 2009).

Nas folhas jovens, inicialmente os sintomas aparecem na forma de lesões necróticas com halo amarelado resultantes da atuação da toxina ACT liberada nos tecidos do hospedeiro. Em folhas maduras os sintomas da mancha marrom de alternaria são manchas amarronzadas, circundadas por um halo amarelo. Posteriormente, essas lesões aumentam de tamanho, se tornando lesões alongadas e escuras, ocasionando com o tempo, secamento e queda das folhas (REIS et al., 2006). Nos frutos, as lesões aparecem rapidamente após a infecção, são de coloração marrom-escura, deprimidas e com halo amarelado (FEITCHENBERG et al., 2005).

2.3 Controle da mancha marrom de alternaria

O controle da MMA é feito principalmente com aplicações de fungicidas, método que apresenta vários fatores desfavoráveis, devido ao grande número de aplicações que são necessárias, podendo chegar até 12 aplicações com fungicidas à base de cobre no Brasil (PEREZ & TIMMER, 2005), o que pode levar a danos ao ambiente e a saúde dos envolvidos. Práticas culturais como proporcionar maior espaçamento entre as plantas, possibilitando maior circulação de ar e evitando alta umidade, além de evitar adubação nitrogenada pesada e irrigação excessiva (MENDONÇA, 2005). Além disso, o fungo só se multiplica em tecidos mortos, sendo recomendável a realização de podas de inverno para eliminação dos restos culturais do pomar (TIMMER et al., 2003).

2.4 Fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (ISDH)

Os fungicidas pertencentes ao grupo ISDH atuam no complexo mitocondrial II, mais especificamente na enzima succinato desidrogenase (SDH). Atuam bloqueando o transporte de elétrons da succinato para ubiquinona, e impedindo a conversão de succinato a fumarato, interferindo em dois processos importantes, sendo eles: o transporte de elétrons mitocondrial e no ciclo de Krebs (AVENOT & MICHAILIDES, 2010; STAMMLER et al., 2015; KLAPPACH & STAMMLER, 2019).

Em 2003, foi lançado no mercado o ingrediente ativo boscalida com amplo espectro de ação sobre os fungos fitopatogênicos, passando a atuar sobre basidiomicetos e ascomicetos. Assim, os fungicidas ISDH passaram a ter maior importância no mercado de produtos de proteção de plantas (AVENOT & MICHAILIDES, 2010; STAMMLER et al., 2015; KLAPPACH & STAMMLER, 2019).

Embora os novos fungicidas ISDH sejam eficientes para o manejo de diversas doenças, sua utilização excessiva, sem a rotação de modos de ação, tem favorecido o aumento

da pressão de seleção de indivíduos resistentes ou com sensibilidade reduzida a diferentes fitopatógenos (AVENOT & MICHAILIDES, 2010).

2.5 Resistência de *A. alternata* a fungicidas QoI, DMI e SDHI

O controle da MMA consiste no uso de fungicidas inibidores da quinona oxidase (QoI), ou a sua combinação com inibidores da desmetilação (DMI). São empregadas sucessivas pulverizações destes no campo, muitas vezes de forma sequencial e com o mesmo modo de ação, devido a essa forma de manejo ocorre um favorecimento da perda de sensibilidade do patógeno e seleção de linhagens resistentes, além dos danos ambientais devido ao acúmulo de resíduos químicos (BRENT & HOLLON, 2007a).

Nesse contexto, em 2008, no estado da Flórida nos Estados Unidos da América, foi detectada em alta frequência a resistência de *Alternaria* spp a fungicidas QoI em pomares de tangerina (VEGA & DEWDNEY, 2014), tornando o manejo da doença mais desafiador.

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

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados de *Alternaria alternata*

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), situado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

Os isolados de *A. alternata* utilizados neste trabalho foram previamente obtidos por Pinheiro (2021), de folhas e frutos infectados de Tangerina Ponkan (*Citrus reticulata*) coletados em pomares localizados na cidade de Campanha no estado de Minas Gerais (Tabela 1).

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

Município	Código	Hospedeiro	Data de coleta (mês/ano)
Campanha	CP1 ^A	Tangerina Ponkan	02/20
Campanha	CP3 ^A	Tangerina Ponkan	02/20
Campanha	CP4 ^A	Tangerina Ponkan	02/20
Campanha	CP6 ^A	Tangerina Ponkan	02/20
Campanha	CP8 ^B	Tangerina Ponkan	02/20
Campanha	CP20 ^B	Tangerina Ponkan	02/20
Campanha	CP27 ^B	Tangerina Ponkan	02/20

Legenda: ^A fruto; ^B folha.

Fonte: Pinheiro (2021).

3.2 Fungicida

O fungicida Cantus® (boscalida, 500 g kg⁻¹; Basf), que possui ingrediente ativo boscalida (Tabela 2) foi diluído em água destilada e autoclavada para obtenção de uma solução estoque de 1 g L⁻¹.

Tabela 2 - Características do fungicida utilizado: ingrediente ativo (i.a.), produto comercial, empresa fabricante e concentração do ingrediente ativo (i.a.) no produto comercial.

Ingrediente ativo (i.a.)	Produto Comercial	Empresa	Concentração do i.a.
Boscalida/Anilida	Cantus®	Basf	500 g.Kg ⁻¹

Fonte: Do autor (2023).

3.3 Avaliação da sensibilidade de *Alternaria alternata* a SDHI por meio do crescimento micelial

Para avaliação da sensibilidade, os isolados foram reativados, discos de micélio com 5 mm de diâmetro conservados em “Castellani” foram colocados em placas contendo meio de cultura BDA e incubados a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12h. Destas placas foram retirados discos de micélio com 5 mm de diâmetro e transferidos para placas de BDA com e sem fungicida. Quatro isolados foram repicados em cada placa, replicadas quatro vezes cada. Posteriormente, as placas foram seladas com plástico filme, e transferidas para estufas BOD, a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12h, por cinco dias.

No experimento sem ácido salicilhidroxâmico (SHAM), o fungicida foi adicionado em meio de cultura BDA, acrescido de cloranfenicol, um antibiótico que age impedindo a realização da síntese proteica. No experimento com ácido salicilhidroxâmico (SHAM), o fungicida foi adicionado em meio de cultura BDA, acrescido de cloranfenicol e ácido salicilhidroxâmico (SHAM) a 0,05 mM. SHAM foi adicionado ao meio com objetivo de inibir a rota alternativa da respiração do fungo.

Foram utilizadas doses discriminatórias de 10 ppm do fungicida para determinação da sensibilidade. O experimento foi avaliado em duplicatas, sendo empregado o delineamento de blocos inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Para avaliação foi medido o diâmetro das colônias nos dois sentidos perpendiculares da placa, utilizando paquímetro digital. Deste modo, foi calculado o diâmetro médio da colônia subtraindo o tamanho do disco de micélio original (5 mm) para cada isolado. Os valores de crescimento micelial foram convertidos em crescimento relativo (CR) para cada isolado, comparando o tamanho da colônia do controle com o tamanho da colônia na presença de fungicida através da seguinte fórmula: $100 \times (\text{média do diâmetro da colônia da placa sem fungicida} / \text{média do diâmetro da colônia da placa com fungicida})$.

3.5 Avaliação da sensibilidade de *Alternaria alternata* a SDHI por meio da germinação

Para montagem do experimento de germinação, discos de micélio conservados em “Castellani” foram colocados em placas contendo meio de cultura Ágar-Água e incubados a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro por 14 dias para promoção da esporulação. Após a produção dos conídios, 4 mL de água destilada e autoclavada foi adicionada em cada placa e os conídios foram desalojados com alça de Drigalski. A suspensão obtida foi transferida para tubos Falcon de 15 mL. A concentração de conídios foi medida em câmara de Neubauer e ajustada a um

valor de $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$. Uma mistura de 50 μL da suspensão de conídios e 100 μL de solução (Água-Fungicida-SHAM) contendo o fungicida boscalida nas concentrações de 0 (controle) e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados em placas de 48 poços estéreis. As placas foram acondicionadas em BOD durante 12h, decorrido esse período a germinação dos conídios foi paralisada pela adição de uma alíquota de 20 μL de lactoglicerol em cada poço da placa. Foram avaliados 100 conídios de forma aleatória em cada poço da placa. Conídios que possuíam o tubo germinativo com tamanho igual ou superior ao seu próprio tamanho foram considerados germinados. A germinação foi avaliada em Microscópio de Epifluorescência DM 2000 (Leica).

O experimento foi avaliado em duplicatas, sendo empregado o delineamento de blocos inteiramente casualizado, com três repetições.

3.6 Avaliação da resistência prática

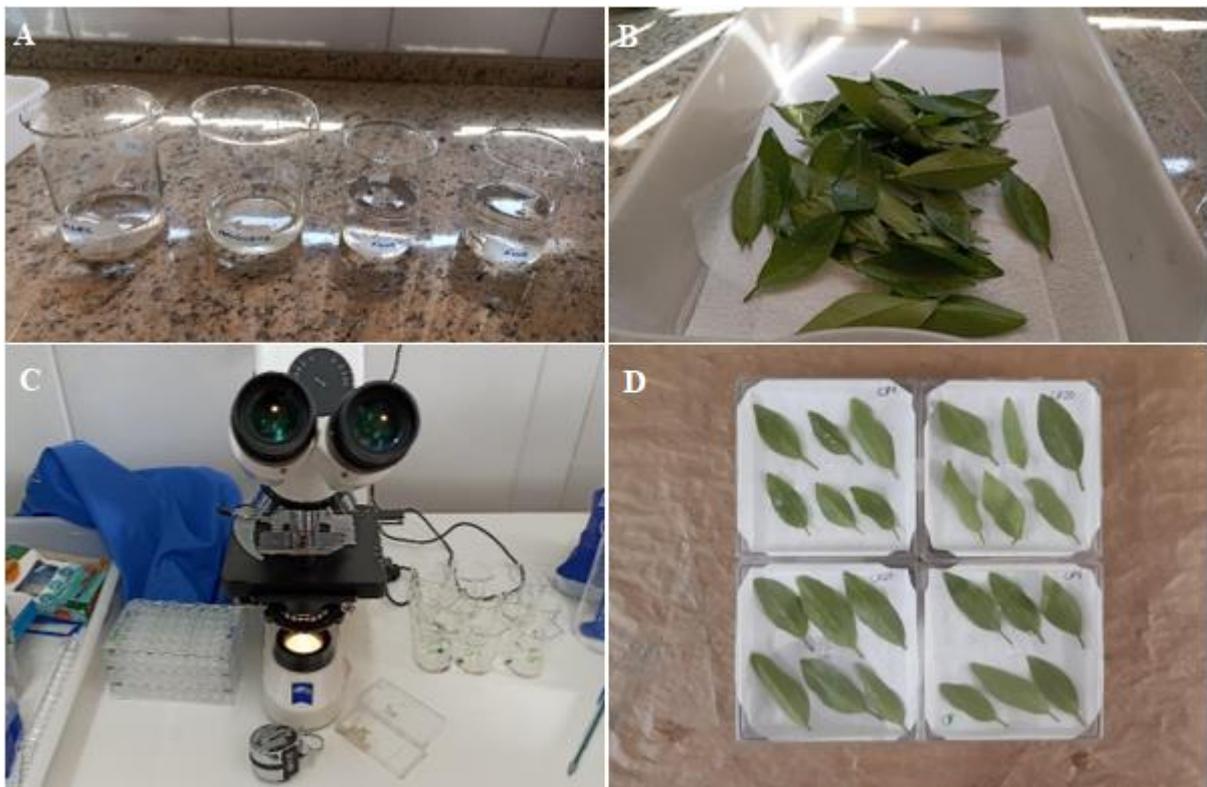
Para a montagem do experimento de avaliação da resistência prática, folhas novas do híbrido tangelo Piemonte foram destacadas e imersas em etanol 70% por 30 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio por 1 minuto. Essas folhas foram lavadas em água destilada e autoclavada por duas vezes e colocadas em capela para secagem. Após este procedimento, metade das folhas foram tratadas com solução (Água-Fungicida) contendo o fungicida boscalida na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Discos de micélio conservados em “Castellani” foram colocados em placas contendo meio de cultura Ágar-Água e incubados a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro por 14 dias para promoção da esporulação. Após a produção dos conídios, 4 mL de água destilada e autoclavada foi adicionada em cada placa e os conídios foram desalojados com alça de Drigalski. A suspensão obtida foi transferida para tubos Falcon de 15 mL. A concentração de conídios foi medida em câmara de Neubauer e ajustada a um valor de $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$. As suspensões de conídios foram passadas nas folhas destacadas com cotonetes. Cada tratamento era composto por três repetições.

A avaliação da germinação de conídios de *A. alternata* patótipo tangerina em folhas destacadas do híbrido tangelo foi realizada. A observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi feita com suspensões de conídios preparadas como descrito acima. As concentrações de $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de boscalida foram utilizadas. Ao total três folhas destacadas foram inoculadas para cada tratamento e o experimento foi realizado uma vez (Figura 1). Fragmentos de 5 mm foram retirados das folhas após 24 h posterior à inoculação com o auxílio de um furador. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (pH 7,2) e

desidratadas em série de acetona (BOZZOLA; RUSSELL, 1999). A secagem dos espécimes foi realizada em aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030 Balzers) seguido de recobrimento com ouro em evaporador Sputter Coater (Bal-tec SCD 050 Balzers) (Figura 2). A aquisição das imagens foi feita em MEV Zeiss LEO EVO 40 XVP no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFPA. As imagens obtidas foram editadas e pranchas foram preparadas utilizando o software Corel Draw.

Figura 1 - Preparação para avaliação de resistência *in vivo*. (A) Sequencia de imersão (Etanol 70%, hipoclorito de sódio, água, água); (B) Secagem; (C) Ajuste da concentração de conídios com auxílio da câmara de Neubauer; (D) folhas inoculadas.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 2 - Preparação para observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV). (A) Karnovsky (pH 7,2) e tampão cacodilato 0,05M; Série de acetona para desidratação; (C) Stubs.

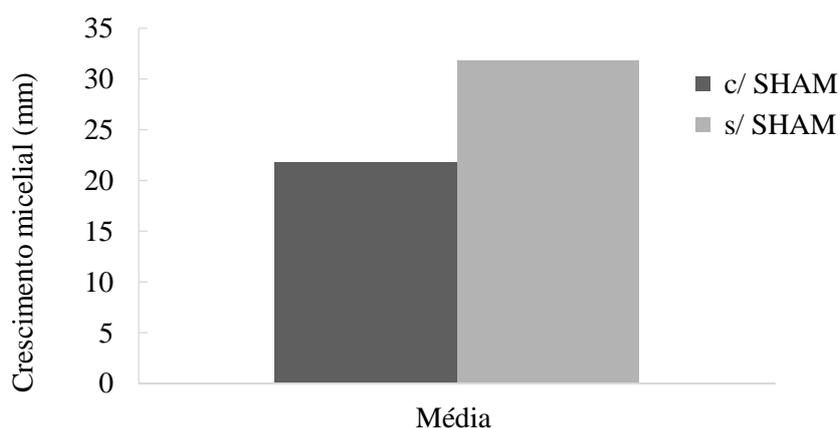


Fonte: Do autor (2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença na taxa de crescimento micelial (Figura 3). Em média, a taxa de crescimento micelial foi 9,97mm menor no experimento com SHAM quando comparado ao experimento sem SHAM. Justificando assim, o uso do SHAM como inibidor da rota alternativa de respiração fúngica. Como visto por Costa (2014), onde espécies de *Colletotrichum* na presença do fungicida azoxistrobina acrescido do SHAM apresentaram crescimento micelial reduzido quando comparado com a testemunha e o fungicida sem a presença do SHAM.

Figura 3 - Crescimento micelial de colônias de *A. alternata* patótipo tangerina produzidas em meio de cultura BDA. As médias representam os resultados do experimento com e sem SHAM.



Fonte: Do autor (2023).

Além disso, ainda com relação aos resultados entre os experimentos de crescimento micelial, todos os isolados foram classificados fenotipicamente como sensíveis a boscalida, ou seja, com valores de crescimento relativo, menores que 50% (Tabela 3).

Tabela 3 - Crescimento relativo (CR) de *A. alternata* patótipo tangerina produzidas em meio de cultura BDA. As médias representam os resultados do experimento com e sem SHAM.

Isolado	Crescimento relativo (mm)	
	c/ SHAM	s/ SHAM
CP1	36,57	47,00
CP3	40,72	42,56
CP4	7,99	8,86
CP6	13,62	24,13

CP8	13,63	33,88
CP20	16,36	29,48
CP27	23,70	36,52

Fonte: Do autor (2023).

Por outro lado, nos experimentos de germinação foi observado que o fungicida boscalida não foi capaz de inibir a germinação de conídios de *A. alternata*. Todos os isolados de *A. alternata*, com exceção do CP4, foram classificados como fenotipicamente resistentes (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Stammere Speakman (2006), que observaram que esporos de isolados de *B. cinerea* continuaram a germinar na presença de boscalida mesmo na concentração mais alta.

Tabela 4 - Porcentagem de germinação de esporos de *A. alternata* patótipo tangerina produzidos em meio de cultura Ágar-Água.

Isolado	Germinação relativa (%)
CP1	79,33
CP3	70,47
CP4	30,62
CP6	51,39
CP8	50,92
CP20	89,91
CP27	112,91

Fonte: Do autor (2023).

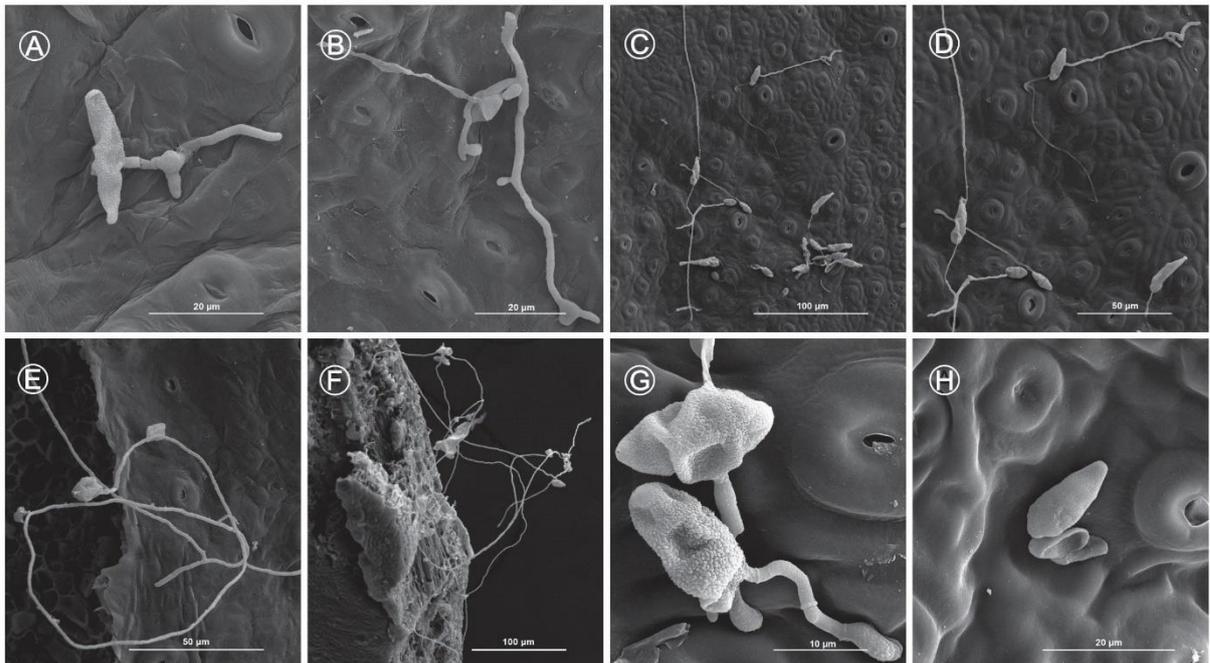
De acordo com o observado é possível inferir que a avaliação do crescimento micelial não permite diferenciar, quanto à sensibilidade ao fungicida, os isolados em estudo, por outro lado o teste de germinação de esporos se mostrou um método eficiente. Justificando porque o método de avaliação da germinação de esporos é o mais utilizado para avaliação da sensibilidade a fungicidas ISDH (MONDAL et al., 2005; POSSIEDE et al., 2009).

Por meio da avaliação da sensibilidade de *A. alternata* pela germinação de conídios foi visto que o fungicida analisado não impediu a germinação dos conídios, como também foi observado por Reis (2022), que testou diversos fungicidas para *A. alternata*, entre eles boscalida.

A germinação dos conídios de *A. alternata* dos isolados, em folhas foram avaliadas em microscopia eletrônica de varredura. No tratamento de 0ppm de boscalida foi possível observar a germinação dos conídios para todos os isolados. A germinação dos conídios foi inibida na presença de boscalida a 10 ppm para o isolado CP4. Corroborando com Condé

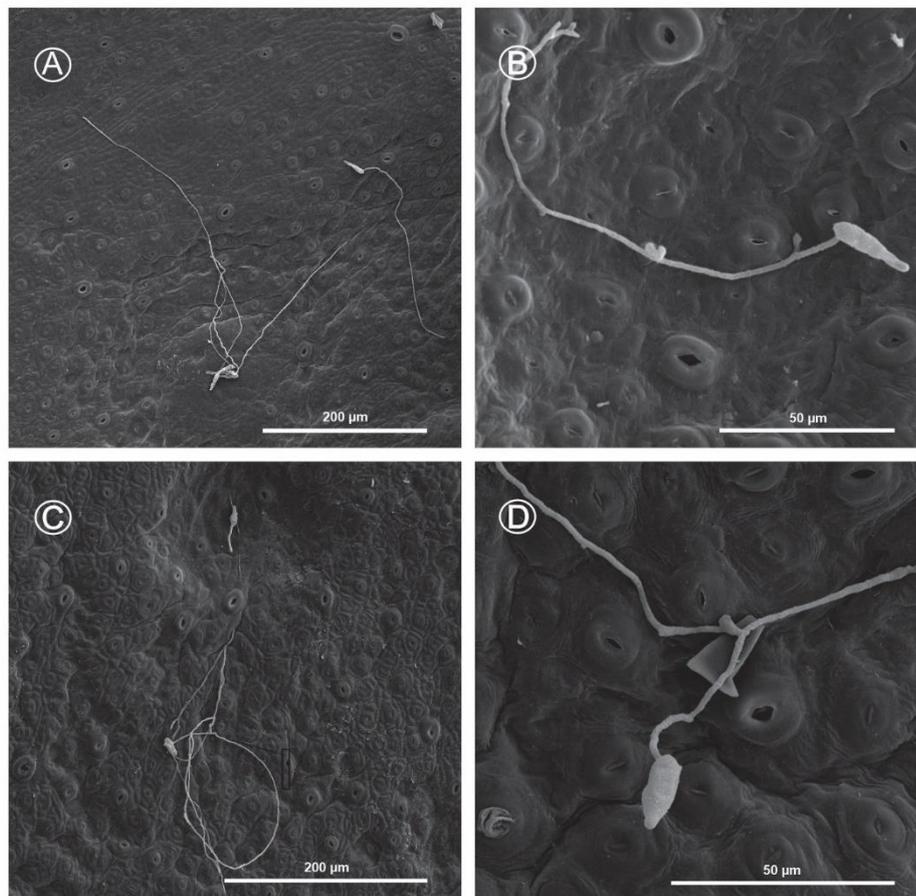
(2018), que verificou resultados semelhantes para germinação de conídios em 0 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de piraclostrobina, onde não foi possível observar a germinação dos conídios para os isolados.

Figura 4 - Eletromicrografias de varredura com detalhes de conídios de *A. alternata* patótipo tangerina em folhas destacadas de tangelo. Sendo (A) controle do isolado CP1; (B) controle do isolado CP1; (C) tratamento a 10 ppm de boscalida; (D) tratamento a 10 ppm de boscalida; (E) controle do isolado CP4; (F) controle do isolado CP4; (G) tratamento a 10 ppm de boscalida; (H) tratamento a 10 ppm de boscalida.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 5 - Eletromicrografias de varredura com detalhes de conídios de *A. alternata* patótipo tangerina em folhas destacadas de tangelo. Sendo A e B isolado CP20; C e D isolado CP27.



Fonte: Do autor (2023).

Segundo o Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas (FRAC), *A. alternata* é um patógeno considerado de alto risco por apresentar resistência em curto período de tempo de exposição a fungicidas. Situações semelhantes foram observadas em outros patossistemas fúngicos, como *Alternaria solani* em batata ou *Botrytis cinerea* em morango, em que a resistência a boscalida tem aumentado em populações devido a utilização de forma sucessiva do mesmo princípio ativo, eliminando as populações mais sensíveis do patógeno, porém gradativamente sendo aumentada a frequência das formas menos sensíveis (BRENT & HOLLIMON, 2007b; MALLIK et al. 2014; VELOUKAS et al. 2013).

Por fim, é importante ressaltar que mais importante do que rotacionar princípios é preciso rotacionar modos de ação, por exemplo, a piraclostrobina, azoxistrobina, entre outros, que são princípios ativos diferentes, contudo possuem o mesmo modo de ação.

5 CONCLUSÃO

Portanto, é possível inferir que a avaliação do crescimento micelial não é um método eficiente para determinação de sensibilidade de *Alternaria alternata* a fungicida SDHI, sendo o teste de germinação de esporos o melhor método.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT – Sistema de agrotóxicos fitossanitários. 2022. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 16 fev. 2023.
- AMARO A. A.; CASER D. V.; Diversidade do mercado de tangerinas. Informações Econômicas, SP, v. 33, n.12, dez. 2003.
- AMARO, A.A.; CASER, D.V. Diversidade do mercado de tangerinas. Informações Econômicas, São Paulo, v. 33, n. 12, p. 51-67, 2003.
- ANASTASIOS A. M.; KONSTANTINOS N. V.; ANASTASIOS N. M.; GEORGE S. K. Characterization of boscalid-resistance conferring mutations in the SdhB subunit of respiratory complex II and impact on fitness and mycotoxin production in *Penicillium expansum* laboratory strains. Pesticide Biochemistry and Physiology, v138, p. 97-103, 2017.
- AVENOT, H. F.; & MICHAILIDES, T. J. Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. Crop Protection (Guildford, Surrey), v. 78, p. 214-221, 2015.
- AVENOT, H. F.; & MICHAILIDES, T. J. Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. Plant Disease, v. 91, p. 1345-1350, 2007.
- AVENOT, H. F.; SELLAM, A.; KARAOGLANIDIS, G.; and MICHAILIDES, T. J. Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. Phytopathology, v. 98, p. 736-742, 2008.
- AVENOT, H.; MORGAN, D.P.; MICHAILIDES, T.J. Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine® (pyraclostrobin þ boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternaria late blight of pistachios in California. Plant Pathol, v. 57, p. 135–140, 2008.
- AVENOT, H.; SELLAM, A.; and MICHAILIDES, T. Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. Plant Pathology, v. 58, p. 1134-1143, 2009.
- AVENOT, H.F.; MICHAILIDES, T.J. Monitoring the sensitivity to boscalid of *Alternaria alternata* populations from California pistachio orchards. (Abstr.). Phytopathology, v. 99, S6, 2009.
- AVENOT, H.F.; MICHAILIDES, T.J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. Crop Protect, v. 29, p. 643–651, 2010.
- AVENOT, H.F.; SOLORIO, C.; MORGAN, D.P.; MICHAILIDES, T.J. Sensitivity and crossresistance patterns to demethylation-inhibiting fungicides in California populations of *Alternaria alternata* pathogenic on pistachio. Crop Protect. 88, 72–78, 2016.

AVENOT, H.F.; THOMAS, A.; GITAITIS, R.D.; LANGSTON JR.; D.B.; STEVENSON, K.L. Molecular characterization of boscalid- and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram. *Pest Manag. Sci.* v. 68, p. 645–651, 2012.

AZEVEDO, F. A.; POLYDORO, D. A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K. C.; STUART, R. M.; COSTA, F. P.; PIO, R. M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação in vitro e in vivo de *Alternaria alternata*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, n. 3, p. 944-951, 2010.

BARALDI, A. L. M.; POLONI, N. M.; FISCHER FILHO, J. A.; PEREIRA, F. D.; & GÓES, A. Sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom de alternária a fungicidas do grupo químico das estrobilurinas. *Citrus Research & Technology*, 42, e1065, 2022.

BERNARDI, L. M. et al. Avaliação dos impactos socioambientais de tecnologias de manejo do HLB implantadas em polos de citricultura familiar nos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 25, 2019.

BRENT, K. J.; & HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? (FRAC Monograph, N° 1, 48 p.). Bruxelas: CropLife International, 2007a.

BRENT, K. J.; & HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance: the assessment of risk (FRAC Monograph, N° 2). Brussels: Crop Life International, 2007b.

CEAGESP. Tangerina. 2022. Disponível em: <<https://ceagesp.gov.br/hortiescolha/hortipedia/tangerina/>>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CONDÉ, T. O. Diversidade e caracterização da resistência de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina a estrobilurinas. Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018. 52 p.

COSTA, J. F. de O. Caracterização e epidemiologia comparativa de espécies de *Colletotrichum* em anonáceas no estado de Alagoas. Tese (Doutorado em Proteção de plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2014.

EMBRAPA. Produção brasileira de tangerina em 2018. 2019. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/tangerina/b1_tangerina.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2023.

FAO. FAOSTAT: Statistical database. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

FELIPINI R. B. Mancha marrom (*Alternaria alternata* f.sp. *citri* patótipo tangerina): processo infeccioso nas culturas Pokan, Murcott e Fremont. Tese (Doutorado) – USP Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Piracicaba, 2019.

FERREIRA, E. A.; MOREIRA, S. I.; PERINA, F. J.; ALVES, E. Mancha-marrom-de-*Alternaria* em tangerineiras e seus híbridos: identificação e manejo. EPAMIG. Circular Técnica. 2016.

FILHO H. P. S.; LARANJEIRA F. F.; OLIVEIRA A. A. R. Mancha marrom de alternaria em tangerinas. Embrapa Mandioca e Fucultura Tropical. Citros em foco, e1, 2009.

FRAC BRASIL. Fungicide Resistance Action Committee, Brazil.

FRAC. FungicideResistance Management. 2022. Disponível em: <<https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/background>>. Acesso em: 12 fev. 2023.

GOES, A.; MONTES DE OCA, A. G.; REIS, R. F. Ocorrência de la mancha de Alternaria en mandarina Dancyenel estado de Rio de Janeiro. Fitopatologia Brasileira, v. 26, p. 386, 2001.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática. SIDRA Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

IEA – Instituto de Economia Agrícola. Estatísticas da Produção Paulista. 2020. Disponível em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1 >. Acessoem: 04 fev. 2022.

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

LEROUX, P.; CHAPLAND, F.; DESBROSSES, D.; GREDET, M. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. Crop Prot. 18, 687–697, 2000.

LOPES, E. D.; ALBUQUERQUE, I. C.; ARAÚJO, E. Mancha-marrom-de alternária: uma grave doença nos pomares de tangerina da Paraíba. Tecnologia & Ciência Agropecuária, v. 3, n. 3, p. 23–27, 2009.

LORENZI, H.; BACHER, B. L.; LACERDA, M. T. C. de; SARTORI, S. F. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 640, 2006.

MALLIK, I.; ARABIAT, S.; PASCHE, J.; BOLTON, M. D.; PATEL, J.S.; and GUDMESTAND, N. C. Molecular characterization and detection of mutations associated with resistance to succinate dehydrogenase-inhibiting fungicides in *Alternaria Solani*. Phytopathology, v. 104, p. 40-49, 2014.

MENDONÇA, V. Poda de recuperação em tangerineira ‘Ponkan’ (*Citrus reticulata* Blanco). 2005. 61f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação da Universidade de Lavras, Lavras-MG. 2005.

MONDAL, S. N.; BHATIA, A.; SHILTS, T.; & TIMMER, L. W. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. Plant Disease, v. 89, p. 1186-1194, 2007.

PASCHE, J. S.; WHARAM, C. M.; & GUDMESTAD, N. C. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. Plant Disease, v. 88, p. 181-187, 2004.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W. Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangerine in Brazil. *Crop Protection*, Guildford v. 25, p. 454-460, 2005.

PEREZ, A.; and MINOR, T. Fruit and Tree Nuts Outlook, FTS-367. U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, September 27, 2018.

PERINA F. J. Óleos essenciais e frações ativas no controle da mancha marrom (*Alternaria alternata*) em tangerina ponkan. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

PINHEIRO, I. C. L. Avaliação da sensibilidade de isolados de *Alternaria* patótipo tangerina a triazóis, estrobilurinas e carboxamida. Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

REIS, A C. B. Avaliação da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerinas, a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase. Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Piracicaba, 2022.

REIS, R. F.; ALMEIDA, T. F.; STUCHI, E. S.; & GOES, A. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the *Alternaria* brown spot. *Scientia Horticulturae*, v. 113, p. 336-342, 2007.

REIS, R. F.; GOES, DE A.; MONDAL, S. N.; SHILTS, T.; BRENTU, F. C.; & TIMMER, L. W. Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. *Plant disease*, v.90, n.8, p. 1051-1054, 2006.

RUSSEL, P. E. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management, FRAC, Crop Life International, Brussels, Monogr, v. 3, p. 1-60, 2004.

SEBRAE. Cultivo e mercado da tangerina. Disponível em: <<http://www.sebraemercados.com.br/cultivo-emercado-da-tangerina/>>. Acesso em: 17 fev. 2023.

SILVA E. A. Controle da mancha de *Alternaria* (*Alternaria alternata* patótipo tangerina) com extratos vegetais em tangerina – Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agroecologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, 2016.

SILVA G. A.; LANDAU E. C. Dinâmica da Produção Agropecuária e da Paisagem Natural no Brasil nas Últimas Décadas. *Evolução da Produção de Tangerina*, Capítulo 39, p. 1274-1300.

SPÓSITO, M. B. et al. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 231, 2003.

SPÓSITO, M. B. Mancha-Marrom-de-*Alternaria*. In: ZAMBOLIM, L.; BASSANEZI, R. B. (Eds.). *Doenças Quarentenárias dos Citros*. Viçosa: Editora UFV, p. 109–116, 2006.

STAMMLER, G.; and SPEAKMAN, J. Microtiter Method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to Boscalid. *J. Phytopathol* v. 154 p. 508- 510, 2006.

- STUART, R. M.; BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F. A. DE; MACHADO, M. A. *Alternaria* brown spot. *Citrus Research & Technology*, v. 30, n. 1-2, p. 29-44, 2009.
- TIMMER, L. W.; PEEVER, T. L.; SOLEL, Z. V. I.; AKIMITSU, K. *Alternaria* diseases of citrus—Novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 42, n. 2, p. 99-112, 2003.
- TIMMER, L. W.; SOLEIL, Z.; & OROZCO-SANTOS, M. *Alternaria* brown spot of mandarines. In L. H. Timmer, S. M. Garnsey, & J. H. Graham (Eds.), *Compendium of citrus diseases*, 2. ed., p. 19, 2000.
- TIMMER, L. W.; SOLEL, Z.; GOTTWALD, T. R.; IBANEZ, A. M.; ZITKO, S. E. Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathology*, v. 88, n. 11, p. 1218-1223, 1998.
- VEGA, B.; DEWDNEY, M. M. Distribution of QoI resistance in populations of tangerine-infecting *Alternaria alternata* in Florida. *Plant Disease* v. 98, n. 1, p. 67-76, 2014.
- VEGA, B.; DEWDNEY, M. M. Sensitivity of *Alternaria alternata* from citrus to boscalid and polymorphism in iron-sulfur and in anchored membrane subunits of succinate dehydrogenase. *Plant Dis.* v. 99, p 231-239, 2015.
- VEGA, B.; LIBERTI, D.; HARMON, P. F.; DEWDNEY, M. M. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate QoI sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. *Plant Dis.* v. 96, p. 1262-1270, 2012.
- VELOUKAS, T.; MARKOGLU, A.; and KARAOGLANIDIS, G. S. Differential effect of *Sdhb* gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* v. 97, p. 118-122, 2013.
- YANG, J. H.; BRANNEN, P. M.; SCHNABEL, G. Resistance in *Alternaria alternata* to SDHI fungicides causes rare disease outbreak in peach orchards. *Plant Dis.* v. 99, p. 65-70, 2015.