



Identificação molecular de *Alternaria* spp. na cultura da batata

Guilherme Augusto Cabral Silva

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Dr Ricardo Harakava

Co-orientador: Dr. Jesus Guerino Tófoli

**São Paulo
2020**

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio

Identificação molecular de *Alternaria* spp. na cultura da batata

Guilherme Augusto Cabral Silva

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

São Paulo
2020

Guilherme Augusto Cabral Silva

Identificação molecular de *Alternaria* spp. na cultura da batata

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

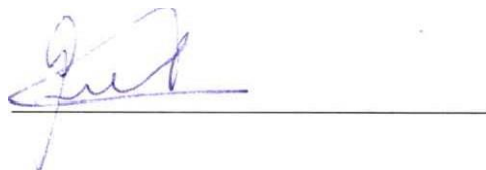
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador:
Professor Dr. Ricardo Harakava

**São Paulo
2020**

Eu Guilherme Augusto Cabral Silva, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura:



Data: 03/08/2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo Núcleo
de Informação e Documentação — IB

Silva, Guilherme Augusto Cabral.

Identificação molecular de *Alternaria* spp. na cultura da batata. / Guilherme Augusto Cabral Silva. São Paulo, 2020.

68 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2020D.GS002

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de PósGraduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Ricardo Harakava.

Versão do título para o inglês: Molecular identification of *Alternaria* spp. in potato crop.

I. Pinta preta 2. Bataticultura 3. *Solanum tuberosum* 4. PCR 5. Extração DNA
I. Silva, Guilherme Augusto Cabral II. Harakava, Ricardo III. Tófoli, Jesus Guerino IV. Instituto Biológico (São Paulo) V. Título.

IB/Bib1/2020/002

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Guilherme Augusto Cabral Silva

Título: Identificação molecular de *Alternaria* spp. na cultura da batata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 03/08/2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. César Júnior Bueno

Instituição: Instituto
Biológico

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

Prof. Dr. Ailton Reis

Instituição: Embrapa Hortaliças

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

Prof. Dr. Ricardo Harakava

Instituição: Instituto
Biológico

Julgamento: Aprovado

Assinatura: 

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Georgina Cabral e José Raimundo da Silva, pelo total apoio a minha formação pessoal e profissional, pelo amor a mim dedicado e por me proporcionarem paz na alma e felicidade na vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e oportunidade de trilhar esse caminho.

Agradeço aos meus pais pelo apoio e amor.

Agradeço aos meus amigos e colegas de trabalho pela paciência e orientação no desenvolvimento deste projeto.

Destaco a Dra. Samantha Zanotta pelo apoio e incentivo desde o começo deste projeto e por ser minha amiga nas horas mais críticas.

Agradeço imensamente a Eng. Agrônoma Ieda Terçariol pela amizade, conselhos e paciência durante o desenvolvimento do projeto, por me levantar nos momentos de queda e por me impulsionar ainda mais nesses momentos.

Agradeço a Dr. Fernando Salas por ser o elo entre mim e alguns produtores, possibilitando diversas viagens de coleta de amostras.

Agradeço ao Eng. Agrônomo Natalino Shimoyama por permitir que eu participasse de inúmeros congressos pela ABBA – Associação Brasileira da Batata, onde pude conhecer muitos produtores e empresas, possibilitando a continuidade do trabalho.

Agradeço a Dra. Eliana Rivas por me dar incentivo nos momentos finais do projeto e por diversas dicas ao longo do trabalho.

Agradeço ao Dr. Valdir Lourenço Junior, da EMBRAPA Hortaliças de Brasília pela disponibilidade e envio de isolados que foram extremamente úteis para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Cesar Júnior Bueno, Dra. Andrea Dantas de Souza e Dr. Ailton Reis por terem aceito participarem das bancas de qualificação e/ou de defesa, por suas importantíssimas colaborações, melhorando a qualidade e valorizando o trabalho.

E por fim, agradeço ao meu orientador, Dr. Ricardo Harakava e coorientador, Dr. Jesus Töfoli, pela infindável paciência e orientação no desenvolvimento deste projeto, por acreditarem em mim e pela oportunidade concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SILVA, G.A.C. **Identificação molecular de *Alternaria* spp. na cultura da batata.**

2020. 100 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo 2020.

Causada por fungos do gênero *Alternaria*, a pinta preta é uma das principais doenças da cultura da batata. O uso de fungicidas é uma das medidas de controle mais utilizadas para o seu manejo. Diante da crescente severidade apresentada pela doença em nossas condições de cultivo, o presente trabalho tem por objetivo: isolar e identificar com base no sequenciamento de DNA as espécies de *Alternaria* associadas à cultura da batata nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Material vegetal apresentando sintomatologia típica de pinta preta foi coletado em sete estados onde ocorre a produção de batata pelo Brasil. Os isolados obtidos tiveram a região ITS e o gene da calmodulina amplificados por PCR, seguido de sequenciamento e comparação com sequências depositadas no GenBank. Foram identificadas as espécies *A. alternata*, *A. arborescens* e *A. grandis*. Os resultados mostraram a predominância de *Alternaria grandis* como agente causal da pinta preta da batateira em diferentes regiões produtoras do Brasil. Outras espécies de *Alternaria* associadas a doenças foliares em batata aumentam a complexidade do que se conhece, podendo dificultar ainda mais o manejo da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Pinta preta. Bataticultura. *Solanum tuberosum*. PCR. Extração DNA.

ABSTRACT

SILVA, G.A.C. Molecular identification of *Alternaria* spp. in potato crop.

2020. 100 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo 2020.

Caused by fungi of the genus *Alternaria*, the early blight is one of the main diseases of the potato crop. The use of fungicides is one of the most used control measures for their management. In view of the increasing severity presented by the disease in our growing conditions, the present work aims to: isolate and identify, based on DNA sequencing, the *Alternaria* species associated with potato cultivation in the South and Southeast regions of Brazil. Vegetable material showing typical early blight symptoms was collected in seven states where potato production occurs in Brazil. The isolates obtained had the ITS region and the calmodulin gene amplified by PCR, followed by sequencing and comparison with sequences deposited on the GenBank. The species *A. alternata*, *A. arborescens* and *A. grandis* were identified. The results showed the predominance of *Alternaria grandis* as a causal agent of the early blight of potato in different producing regions of Brazil. Other species of *Alternaria* associated with leaf diseases in potatoes increase the complexity of what is known, which may make the management of the disease even more difficult.

KEYWORDS: Early blight. Potato crop. *Solanum tuberosum*. PCR. DNA extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura n ^o	Descrição	Página
1	Ilustração de uma planta de batata.....	20
2	Distribuição (em porcentagem - %) por região, da produção de batata, no Brasil.....	21
3	Sintomas de pinta preta em batata. A - D) sintoma de pinta preta na parte adaxial das folhas; E) sintoma de pinta preta no campo; F) sintoma de pinta preta em tubérculos de batata.....	26
4	Ciclo da doença pinta preta (<i>Alternaria</i> spp.).....	27
5	Coletas de amostras de batata com sintomas de pinta preta.....	39
6	Formulário desenvolvido para o envio de amostras ao Instituto Biológico.....	40
7	Gel de agarose 1,5%, de amplificação da região ITS com os iniciadores ITS 1 e ITS4. Isolados de <i>Alternaria</i> spp. 56, 04, 09, 11 ao 14, 16, 18, 26, 57 ao 76. Ld = Ladder/Padrão 100 bp.....	43
8	Gel de agarose 1,5%, de amplificação da região Calmodulina com os iniciadores CAL 228F e CAL 737R. Isolados de <i>Alternaria</i> spp. 43 ao 56. Ld = Ladder/Padrão 100 bp.....	44
9	Locais de coletas de amostras de batata com sintomas de pinta-preta: A) Vargem Grande do Sul/SP, B) Divinolândia/SP, C) Casa Branca/SP e D) Poços de Caldas/MG.....	46
10	Esporos de <i>Alternaria</i> spp.....	47
11	Árvores filogenética construída com sequências da região ITS de isolados de <i>Alternaria</i> spp. de batata. Foram incluídas sequências de espécimes depositados em coleções, retiradas do Genbank para comparação. Foi utilizado o método de Maximum Likelihood com bootstrap de 500 repetições, empregando o modelo de substituição nucleotídica de Jukes-Cantor e distribuição Gamma.....	50
12	Árvore filogenética construída com sequências do gene da calmodulina de isolados de <i>Alternaria</i> spp. de batata. Foram incluídas sequências de espécimes depositados em coleções, retiradas do Genbank para comparação. Foi utilizado o método de	52

Maximum Likelihood com bootstrap de 500 repetições,
empregando o modelo de substituição nucleotídica de Hasegawa-
Kishino-Yano.....

LISTA DE TABELAS

Tabela n°	Descrição	Página
1	Distribuição mundial da produção de batata por continente no ano de 2018.....	22
2	Ranking dos 24 maiores países produtores de batata, no ano de 2018, classificados por produção (ton) e por rendimento (kg/ha).....	23
3	Informações de isolados fornecidos pela Micoteca Mario Barreto Figueiredo do Instituto Biológico.....	41
4	Isolados de <i>Alternaria</i> spp. obtidos durante este estudo.....	47
5	Identificação dos isolados de <i>Alternaria</i> spp coletados em regiões produtoras de batata no Brasil.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

Abreviatura / Siglas / Símbolos	Definição
≈	Aproximadamente
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
°	Graus
µm	Micrometro
µg	Microgramas
A.	<i>Alternaria</i>
BOD	Incubadora com regulagem de temperatura
CABI	Center for Agriculture and Biosciences International
CIA	Clorofórmio Álcool Isoamílico
CIP	International Potato Center
Cm	Centímetros
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CV%	Coefficiente de variação em %
EUA	Estados Unidos da América
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
FAO	Food and Agriculture Organization of The United Nations
IB	Instituto Biológico
Kg	Quilograma
LDFH	Laboratório de Doenças Fúngicas em Horticultura
LDF	Laboratório de Diagnóstico Fitopatológico
M	Metros
mL	Mililitro
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Ppm	Partes por Milhão
RPM	Rotações por minuto
SP	São Paulo
spp.	Especies
Ton	Tonelada

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. A Batata e sua Importância.....	19
3.2. Pinta Preta.....	24
3.3. Os agentes causais da pinta preta.....	27
3.4. Identificação molecular das espécies de <i>Alternaria</i>	31
3.5. Controle químico da pinta preta e manejo da resistência.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. Locais de execução.....	38
4.2. Coleta de material infectado.....	38
4.3. Isolamento de <i>Alternaria</i> spp.	40
4.4. Obtenção de isolados padrões de espécies de <i>Alternaria</i>	40
4.5. Preservação dos isolados.....	41
4.6. Extração de DNA.....	42
4.7. Identificação molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	42
4.7.1. Amplificação da região ITS.....	42
4.7.2. Amplificação do gene da calmodulina	43
4.7.3. Sequenciamento.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1. Coleta de material infectado.....	46
5.2. Identificação das espécies de <i>Alternaria</i>	46
5.2.1 Amplificação e sequenciamento da região ITS	49
5.2.2 Amplificação e sequenciamento do gene da calmodulina.....	51

6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

Devido ao grande valor nutricional e alto rendimento, a cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) tem grande importância econômica e social em diversos países do mundo, onde essa cadeia produtiva assume características empresariais bem definidas, com avanços tecnológicos constantes e gerenciamento avançado de todo o processo produtivo (TÖFOLI, MELO, DOMINGUES, 2012).

Dentre os diversos fatores que limitam a produção de batata, podem-se destacar as pragas e as doenças, as quais se estabelecem nas plantas quando as condições ambientais são favoráveis. Causada por fungos do gênero *Alternaria*, a pinta preta é uma das principais doenças da bataticultura. Altamente destrutiva, de rápido ciclo de desenvolvimento, alta adaptabilidade e extrema severidade, a doença é responsável pela perda de milhares de toneladas de batata anualmente, tanto no Brasil quanto no mundo.

De grande importância mundial, a pinta preta ocorre com maior frequência em áreas subtropicais e tropicais, podendo causar danos variando de 6 a 100% na produção, caso não sejam adotadas pulverizações ou as epidemias se iniciem precocemente (TÖFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA., 2017; NAZARENO; JACOUD FILHO, 2003; VAN DER WAALS; KORSTEN; AVELING, 2001; FRY, 1994). A pinta preta tem crescido em importância, principalmente na Europa, causando perdas consideráveis na produção. Alguns autores atribuem esse aumento de importância da doença às mudanças climáticas, decorrentes do aquecimento global. (KAPSA, 2009; SCHULLER; HABERMEYER, 2002).

As principais características da pinta preta são diminuição de vigor, redução da área foliar e quebra de hastes e, conseqüentemente, queda de produção da planta. Períodos quentes e úmidos são ideais para o desenvolvimento da doença e a mesma torna-se mais agressiva a partir da fase de formação e crescimento dos tubérculos (TÖFOLI et al., 2015; WALE et al., 2008).

Os sintomas aparecem primeiramente nas folhas mais velhas e em seguida evoluem para as partes mais jovens da planta. Nas folhas, a doença se expressa através de lesões necróticas, pardo-escuras ou negras, com característicos anéis concêntricos e bordos bem definidos (DIAS; IMAUTI, FISCHER, 2016).

Plantas debilitadas e mal nutridas são mais pré-dispostas à pinta preta. Níveis adequados de matéria orgânica no solo e nutrientes como nitrogênio e magnésio podem reduzir a severidade da doença (TÖFOLI; DOMINGUES, 2004).

Uso de sementes certificadas, plantio de cultivares com algum nível de resistência, eliminação de restos culturais no solo, evitar plantio em áreas úmidas e sujeitas à neblina e controle de plantas daninhas são algumas das formas de combate da pinta preta na atualidade (TÖFOLI et al., 2013a; STEVENSON et al., 2008).

Atualmente no Brasil, não há cultivares comerciais de batata altamente resistentes à pinta preta, o que torna a utilização de fungicidas essencial para que se possa obter níveis competitivos de produtividade. Com o objetivo de prevenir e retardar a evolução da doença no ciclo de desenvolvimento da cultura, os fungicidas são aplicados e atuam como peça fundamental no combate à doença. Fatores como suscetibilidade da cultivar, escolha do fungicida adequado, tecnologia de aplicação, entre outros, são responsáveis pelo êxito no uso dos fungicidas (TÖFOLI et al., 2013b).

Os fungicidas desempenham um papel decisivo no controle da pinta preta. Eficácia, modo de ação, risco de resistência, efeitos colaterais, aspectos econômicos e sociais e legislação são fatores que devem ser tecnicamente considerados em programas de manejo que visem a sustentabilidade da cadeia produtiva da batata (TÖFOLI et al., 2016).

Até recentemente a espécie *Alternaria solani* era relatada como o agente etiológico da pinta preta da batata no Brasil (LOURENÇO JR. et al., 2009). Entretanto, Rodrigues (2009) encontrou somente *Alternaria grandis* em cultivos de batata nos estados de MG, PR e GO e no DF. Estudo de Peixoto (2015) também identificou somente *A. grandis* afetando batateiras nos estados de RS, SC, GO, SP, CE e BA e no DF.

O entendimento da dinâmica populacional dos fungos do gênero *Alternaria* ao longo dos anos permitirá um melhor embasamento para o desenvolvimento e a adoção de estratégias de manejo da doença, no auxílio ao desenvolvimento de cultivares resistentes à pinta preta e na aprimoração da eficiência dos métodos de controle.

2. OBJETIVOS

- Isolar espécies de *Alternaria* associadas à cultura da batata nas regiões Sul e Sudeste do Brasil;
- Identificar com base no sequenciamento de DNA, as espécies de *Alternaria* associadas à cultura da batata nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A Batata e sua Importância

O fácil cultivo, grande rendimento e alto valor nutricional fazem da batata uma das principais culturas presentes na alimentação humana. De acordo com o International Potato Center (2019), a batata é o terceiro alimento mais consumido no mundo, atrás do arroz e trigo.

Rica em carboidratos, vitaminas do complexo B e C, fósforo, potássio, proteínas de boa qualidade, fibra alimentar e outros nutrientes, a batata tem suma importância na alimentação de milhões de pessoas no mundo (TÖFOLI, 2013b; BANDINELLI, 2009).

A batata, *Solanum tuberosum* L., é originária dos Andes (América do Sul) e possui mais de 4.000 variedades comestíveis cultivadas em mais de 100 países (INTERNATIONAL POTATO CENTER, 2019).

A batateira (Figura 1) é uma herbácea anual, eudicotiledônea, da família *Solanaceae*, gênero *Solanum*, o qual possui mais de 2.000 espécies das quais pouco mais de 150 são produtoras de tubérculos. Apresentando caules aéreos, herbáceos e clorofilados, angulosos, ramificados, de disposição ereta, aberta ou prostrada, a batateira pode alcançar até 60 cm de altura e coloração verde ou arroxeadada. As folhas são compostas por três ou mais pares de folíolos laterais, um folíolo terminal e alguns rudimentares ou terciários. Variando em função da cultivar, os folíolos podem diferir quanto ao formato, número, coloração e tamanho. Pentâmeras e hermafroditas, as flores apresentam-se reunidas em inflorescências no topo da planta e podem apresentar coloração branca, arroxeadada, azulada ou rosada. Os frutos são verdes, amarelos ou violeta, do tipo baga, com sementes. O sistema radicular é delicado, superficial, com raízes concentradas nos primeiros 50 cm de profundidade. Além das hastes aéreas, as plantas de batata apresentam outros dois tipos de caule: os estólões, que se desenvolvem horizontalmente e os tubérculos, que se formam nas extremidades dos estólões (FORTES; PEREIRA, 2003).

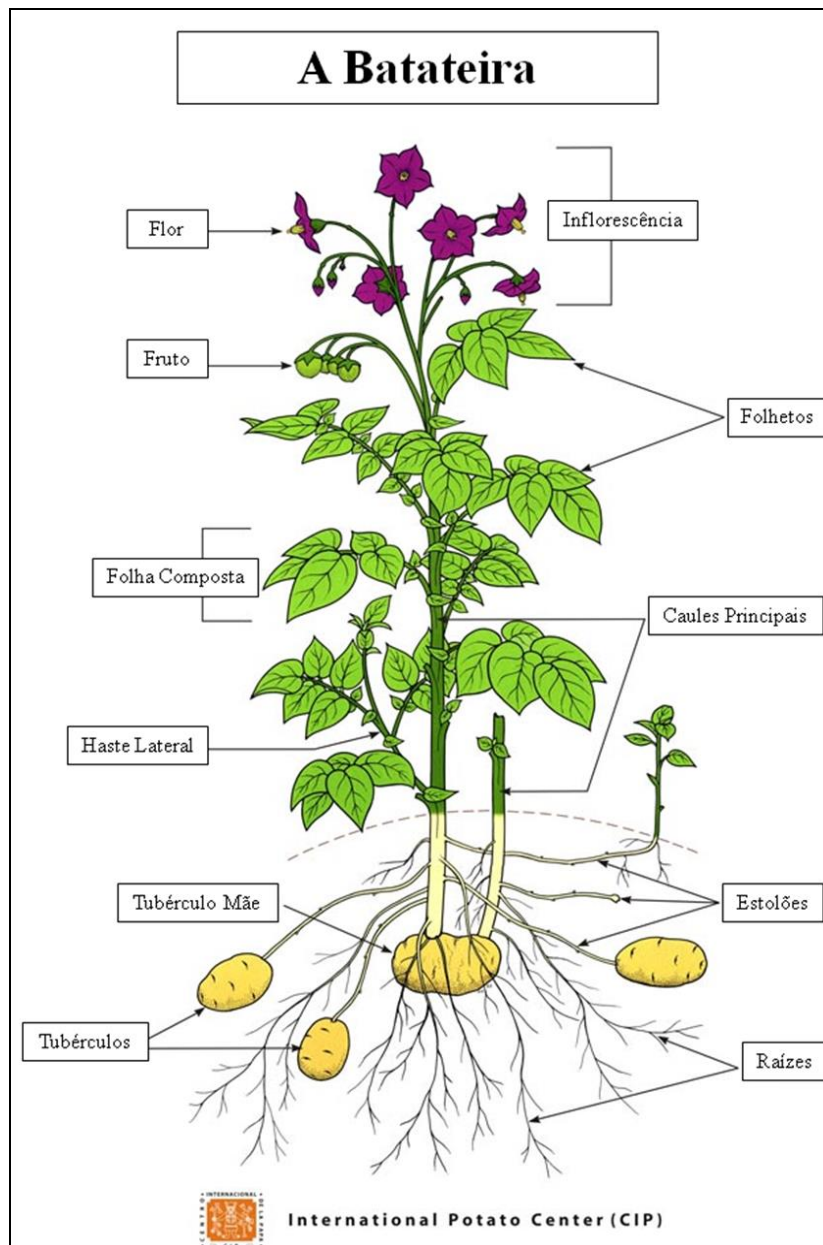


Figura 1. Ilustração de uma planta de batata. Fonte: Adaptado de CIP, 2019.

Atualmente, a cadeia produtiva da batata assume características empresariais bem definidas, com constantes avanços tecnológicos e no gerenciamento do processo produtivo (TÖFOLI, 2011).

De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia Estatística - 2020), os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul são responsáveis por quase 89% da produção nacional de batata (Figura 2).

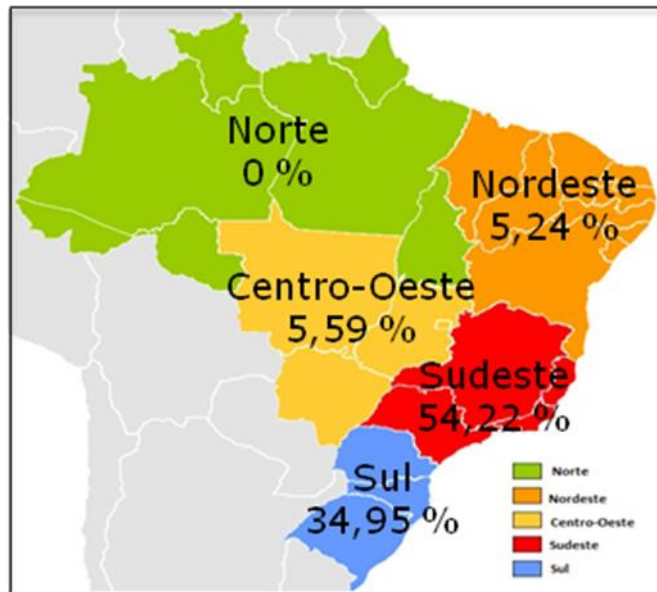


Figura 2. Distribuição (em porcentagem - %) por região, da produção de batata em 2020 no Brasil. Fonte: IBGE, 2020.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (2020), no Brasil foram registrados 125.824 hectares de área colhida de batata, com uma produção de 3.820.405 toneladas. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO (2020), o Brasil ocupa o 21º lugar na lista de países produtores de batata. Na América do Sul, o Brasil se destaca como o segundo maior produtor de batata com 3.688.029 toneladas, ficando atrás somente do Peru que produz 5.121.110 toneladas (FAO, 2020).

Mundialmente, em 2018, a produção total de batata foi 368.247.077 toneladas em 17.580.072 hectares. O continente que mais produz é a Ásia, seguida pela Europa, África, América do Norte, América do Sul, América Central e Oceania (Tabela 1) (FAO, 2020).

Tabela 1. Distribuição mundial da produção de batata por continente no ano de 2018.

Continente	Porcentagem (%)
Ásia	51,25
Europa	28,56
América do Norte	7,17
África	7,07
América do Sul	4,71
América Central	0,78
Oceania	0,46

Fonte: (FAO, 2020)

Dentre os 24 países que mais produziram batata em 2018 (Tabela 2), a liderança fica com a China (24,52%), seguida pela Índia (13,17%), Ucrânia (6,11%), Rússia (6,08%) e Estados Unidos da América (5,59%), enquanto o Brasil ocupa a 21ª posição com aproximadamente 1% da produção (FAO, 2020).

Ao analisarmos a Tabela 2 por rendimento ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), observamos que a classificação muda (Tabela 2), com os Estados Unidos ($\cong 49,7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), Bélgica ($\cong 47,5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), Alemanha ($\cong 46,7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), Holanda ($\cong 43,1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) e Reino Unido ($\cong 39,3 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), liderando o ranking. A China cai para a 21ª colocação com um rendimento de aproximadamente $18,7 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, enquanto o Brasil sobe para a 11ª, com aproximadamente $31,1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (FAO, 2020).

A Organização das Nações Unidas (ONU) decretou o ano 2008 como o Ano Internacional da Batata, devido ao seu caráter universal e seu alto potencial de auxílio no combate à fome no mundo (PEREIRA, 2008).

Como base da alimentação de mais de um bilhão de pessoas, estima-se que o consumo *per capita* de batata na Europa seja de 86 kg/ano, nos Estados Unidos de 24 kg/ano e no Brasil de 13-17 kg/ano. Fatores como poder aquisitivo, região e aspectos culturais afetam diretamente esses números (GODOY; SCOTTI; BUENO, 2003).

Tabela 2. Ranking dos 24 maiores países produtores de batata, no ano de 2018, classificados por produção (ton) e por rendimento (kg/ha).

País	Área Colhida (ha)	Produção (ton)	Ranking	Rendimento (kg/h)	Ranking
China	4813542	90321442	1°	187640	21°
Índia	2151000	48529000	2°	225611	16°
Ucrânia	1319900	22503970	3°	170498	24°
Rússia	1313495	22394960	4°	170499	23°
Estados Unidos	414115	20607342	5°	497624	1°
Bangladesh	477419	9744412	6°	204106	19°
Alemanha	252200	8920800	7°	353719	6°
França	199886	7870973	8°	393773	3°
Polônia	297484	7478184	9°	251381	14°
Holanda	164689	6029734	10°	366129	4°
Belarus	271772	5865123	11°	215810	18°
Canadá	134102	5790838	12°	431823	2°
Irã	164410	5321188	13°	323653	10°
Peru	323092	5121110	14°	158503	25°
Reino Unido	140000	5028000	15°	359143	5°
Egito	176670	4896476	16°	277154	13°
Argélia	149665	4653322	17°	310916	12°
Paquistão	193992	4591776	18°	236699	15°
Turquia	135904	4550000	19°	334795	8°
Cazaquistão	192326	3806992	20°	197945	20°
Brasil	118297	3688029	21°	311760	11°
Colômbia	141299	3107580	22°	219929	17°
Nepal	195268	3088000	23°	158142	26°
Bélgica	93331	3045443	24°	326306	9°
Romênia	173296	3022758	25°	174427	22°
Uzbequistão	86443	2911933	26°	336862	7°
TOTAL	17580072	368247077	-	209468	-

Fonte: (FAO, 2020)

Nas últimas décadas, a produção de batata vem passando por mudanças significativas no cenário mundial. Reduções de produtividade na América do Norte e Europa têm sido acompanhadas por aumentos notáveis na produção em países em desenvolvimento, como Índia e China (FAO, 2020). Na América Latina, a produção de batata aumentou cerca de 80% nos últimos 30 anos. Inúmeros fatores técnicos e comerciais apontavam o Brasil, Argentina e Colômbia como centros de produção onde aumentos substanciais, tanto de produção quanto de produtividade, deveriam ocorrer nas décadas seguintes (FERREIRA et al., 2008). Entretanto, entre 2009 e 2018, a

produção total anual manteve-se entre 3,5 e 4,0 milhões de toneladas, com gradativa redução da área cultivada de 140 mil ha para 120 mil ha (IBGE, 2020).

A produção nacional ocorre em três épocas de cultivo, denominadas safra das águas (colheitas de dezembro a março), da seca (colheitas de abril a julho) e de inverno (colheitas de agosto a novembro). O período de plantio dessas safras varia em função da região e da variedade da batata a ser plantada, porém estão sempre concatenadas, sendo que cada região desenvolve dois cultivos predominantes (ZANOTTA, 2019; WATANABE, 2013; FILGUEIRA, 2003).

Apesar da enorme importância para o agronegócio mundial, a cultura da batata está sujeita a fatores ambientais e sanitários que limitam a sua produção, dentre os fatores fitossanitários destacando-se as pragas e as doenças.

Diversas doenças fúngicas que afetam o desenvolvimento da batateira e que podem causar impactos sobre a produção já foram descritas, dentre elas as principais são requeima (*Phytophthora infestans*), pinta preta (*Alternaria* spp.), rizoctoniose (*Rhizoctonia solani*), sarna prateada (*Helminthosporium solani*), sarna pulverulenta (*Spongospora subterranea*), podridão seca (*Fusarium* spp.) e olho pardo (*Cylindrocladium clavatum*) (FILGUEIRA, 2008; DIAS; IMAUTE, FISCHER, 2016).

A pinta preta é a segunda doença da batata em importância no Brasil, perdendo apenas para a requeima (NOSSLLALA, 2017).

3.2. Pinta preta

A pinta preta, causada por fungos pertencentes ao gênero *Alternaria* é conhecida em outros idiomas por “alternaria blight”, “dry blight of potato and tomato”, “potato early blight”, “tomato early blight”, “tomato target spot” em inglês; “alternariosis de la papa y tomate”, “tizón temprano”, “tizón temprano de las papas” em espanhol; “alternaria des solanacées”, “alternariose de la chicoree”, “alternariose de la pomme de terre et de la tomate”, “brulure alternarienne de la pomme de terre”, brulure alternarienne de la tomate”, “taches foliaires larges” em francês; e “blattfleckenkrankheit: tomate”, “blattfleckenkrankheit: kartoffel”, “hartfaeule: kartoffel” em alemão (CABI, 2019).

Trata-se de uma das principais doenças da bataticultura, sendo *Alternaria* um patógeno extremamente agressivo, podendo destruir uma plantação de batata em uma semana (SOUZA DIAS, et al., 2016).

Favorecida por temperaturas variando entre 22 e 32° C e alternância de períodos secos e úmidos, a pinta preta é considerada uma doença de importância mundial. Ocorrendo com maior frequência em áreas tropicais e subtropicais, podendo causar danos variando de 6 a 100% na produção, caso medidas de controle não sejam adotadas ou a epidemia se inicie precocemente (TÖFOLI, DOMINHUES, ZANOTTA, 2017, NAZARENO; JACOUD FILHO, 2003; VAN DER WAALS; KORSTEN; AVELING, 2001; FRY, 1994).

A doença também tem crescido em importância na Europa e causado perdas consideráveis na produção. Alguns autores atribuem a essa crescente importância da pinta preta a mudanças no clima causado pelo aquecimento global (TÖFOLI, 2011; KAPSA, 2009; SCHULLER; HABERMEYER, 2002).

Além da batateira, os fungos do gênero *Alternaria* estão associados a outros cultivos com enorme importância comercial, tais como: tomateiro (*Solanum melongena* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Além de algumas plantas invasoras como: Maria-Pretinha (*Solanum americanum* L.), fisális (*Physalis* spp.), *Solanum* spp. entre outras (TÖFOLI; DOMINGUES; ZANOTTA, 2017).

A pinta preta é caracterizada pela redução prematura da área foliar, quebra das hastes, queda de vigor da planta, redução da produtividade e da qualidade dos tubérculos. O aumento da suscetibilidade à doença está geralmente associado à maturidade dos tecidos, florescimento e período de formação e crescimento dos tubérculos. A maior demanda de nutrientes e fotoassimilados exigidos pela tuberização tornam as folhas maduras mais vulneráveis à doença (TÖFOLI; DOMINGUES; ZANOTTA, 2017).

Os sintomas da pinta-preta em folhas são caracterizados por manchas necróticas, circulares, elípticas ou angulares, pardo-escuras, isoladas ou em grupos, com a presença de anéis concêntricos, bordos bem definidos, podendo apresentar ou não halos amarelados ao seu redor (Figura 3). O aumento da intensidade da doença no campo ocorre tanto pelo surgimento de novas lesões, como pela expansão das mais velhas, que podem coalescer destruindo todo o limbo foliar. As lesões em hastes e pecíolos podem surgir em plantas adultas e caracterizam-se por serem pardas, alongadas, deprimidas, apresentando ou não halos concêntricos. Nos tubérculos as lesões são escuras, de

formato irregular, deprimidas e tendem a provocar podridão seca (TÖFOLI; DOMINGUES; ZANOTTA, 2017).

A dispersão de *Alternaria* spp. ocorre principalmente pelo plantio de sementes infectadas, ação de ventos, água de chuvas e irrigação, circulação de pessoas e equipamentos agrícolas contaminados (TÖFOLI; DOMINGUES; ZANOTTA, 2017).



Figura 3. Sintomas de pinta preta em batata. A - D) sintoma de pinta preta na parte adaxial das folhas; E) sintoma de pinta preta no campo; F) sintoma de pinta preta em tubérculos de batata. Fotos Jesus G. Töfoli

O patógeno pode sobreviver de um plantio para outro em restos de cultura, plantas alternativas e voluntárias da família das solanáceas). O fungo também sobrevive em maquinário agrícolas, estacas, caixas usadas ou mesmo nas sementes e pode permanecer viável no solo na forma de micélio, esporos ou clamidósporos (NOSSLLALA, 2017; RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009; KEMMITT, 2002).

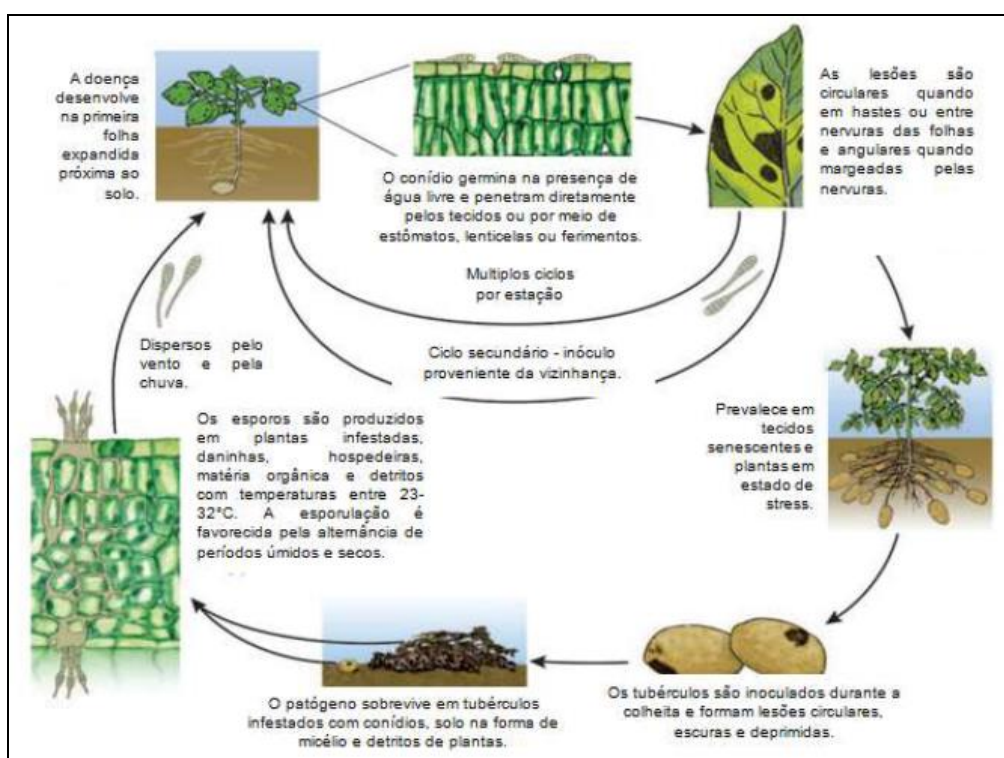


Figura 4. Ciclo da doença pinta preta (*Alternaria* spp.). Fonte: Adaptado de Wharton; Kirk, 2012.

Os esporos são dispersos pela água e vento, principalmente. As condições ambientais de temperaturas quentes (22 a 32°C) e alta umidade são consideradas ideais para a infecção. Na presença de umidade e em temperatura de 28 a 30°C, os conídios germinam em aproximadamente 40 minutos. A infecção dos tubérculos ocasionalmente ocorre através de ferimentos na superfície do tubérculo (Figura 4). O tempo entre o início da infecção e o aparecimento de sintomas nas folhas depende das condições ambientais, idade da planta e da suscetibilidade da cultivar (KEMMITT, 2002).

3.3. Os agentes causais da pinta preta

Acreditava-se que a pinta preta da batateira era causada exclusivamente pelo fungo *Alternaria solani* Sorauer (ROTEM, 1994). Descrito pela primeira vez por Ellis e Martin em 1882 e denominado de *Macrosporium solani*, nome que foi substituído em 1933 por Wiltshire por *Alternaria solani* Sorauer (FANCELLI, 1991). Depois, mais duas espécies de *Alternaria* mostraram estar associadas à batata e tomate, *A. grandis* e *A. linariae* (sin. *A. tomatophila*), respectivamente (SIMMONS, 2000).

No mundo, oito espécies de *Alternaria* já foram relatadas causando doenças em folhas de batata. *A. solani* foi considerado o principal agente causador da pinta preta na batata, por diversos autores (TÖFOLI, 2011; KAPSA, 2009; STEVENSON; KIRK; ATALLAH, 2008; DIAS; IMAUTI, 2005; NAZARENO; JACOUD FILHO, 2003; VAN DER WAALS et al., 2004; VAN DER WAALS; KORSTEN; AVELING, 2001). No entanto, a doença também pode estar associada a outras espécies do gênero, como *Alternaria alternata* (CWALINA-AMBROZIAK; BOGUCKA, 2012; ARDESTANI et al., 2010), *Alternaria grandis* (RODRIGUES et al., 2010; SIMMONS, 2007), *Alternaria tomatophila*, *Alternaria cretica*, *A. interrupta* (TAHERI et al., 2009), *A. tenuissima*, *A. dumosa*, *A. arborescens* e *A. infectoria* (ARDESTANI et al., 2010).

Conhecida há algum tempo no Brasil, *A. alternata* já está bem estabelecida nas nossas condições de cultivo em diferentes culturas. Em batata, as espécies *A. solani* e *A. grandis* têm sido associadas à pinta preta com maior frequência (RODRIGUES et al., 2009; BOITEUX; REISFCHNEIDER; 1994).

O gênero *Alternaria* pertence ao grupo dos fungos mitospóricos. A determinação taxonômica de espécies de *Alternaria* é baseada principalmente na morfologia dos conídios (CARDOSO, 2010). De acordo com Simmons (1997), as espécies são caracterizadas pela formação de conídios multicelulares, grandes, com septos longitudinais e transversais, ovóides ou obclavados, escuros e com bicos filamentosos. A correta identificação das espécies tem sido muito problemática uma vez que toda *Alternaria* de esporos grandes encontrada em solanáceas é comumente identificada como *A. solani*. Essa suposição mudou em 2000, quando Simmons distinguiu 22 espécies de *Alternaria* com base na morfologia (WLOUDENBERG et al., 2014).

De maneira geral, não se observa diferenças sintomatológicas significativas entre as espécies *A. alternata*, *A. solani* e *A. grandis*, porém essas diferem em relação ao tamanho e morfologia dos conídios. Os conídios de *A. solani* são geralmente individuais, ovais, podendo apresentar variações longas, curtas, largas e estreitas. Os conídios com bico único são longos, ovóides ou elipsóides com comprimento de 109-115 µm e largura entre 18-26 µm e um bico de 80-118 µm. Conídios com dois bicos podem atingir tamanhos de 80-106 µm e 16-21 µm de largura, acrescido de um bico inicial 58-88 µm de comprimento e um segundo bico 64-88 µm. Apresentam coloração palha, parda, marrom-oliváceo ou ouro claro, com 7 a 11 septos transversais e poucos ou nenhum, longitudinais. Os conídios são inseridos em conidióforos septados retos ou

sinuosos que ocorrem isolados ou em grupos, que apresentam 6 a 10 μm de diâmetro e 100 a 110 μm de comprimento e coloração idêntica aos conídios (TÖFOLI, 2011; SIMMONS, 2007). *A. alternata* apresenta conídios em forma de clava ou pêra invertidos, ovóides ou elipsóides, formados em longas cadeias, com bicos curtos, cilíndricos ou cônicos, e comprimento inferior a um terço do corpo, possui até oito septos transversais e vários longitudinais ou oblíquos (SIMMONS, 2007). *A. grandis* possui conídios com morfologia semelhante *A. solani*, porém com dimensões 50 a 100 % maiores (RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009). Os conídios com bico único são longos, ovóides ou elipsóides com comprimento de 141-192 μm e largura entre 26-38 μm e um bico de 160-200 μm . Conídios com dois bicos possuem corpos na faixa de 128-198 μm e 24-30 μm de largura, acrescido de um bico inicial 99-160 μm de comprimento e um segundo bico de 64-88 μm (SIMMONS, 2007).

A ocorrência das três espécies pode variar em função da localidade. Na Europa observa-se que a doença é causada pelo complexo *A. solani* e *A. alternata*, enquanto que nos Estados Unidos prevalece *A. solani*. No Brasil, os estudos mais recentes indicam predominância de *A. grandis* à pinta preta da batateira (TÖFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA., 2017, LATORSE et al., 2010; HAUSLADEN; LEIMINGER, 2009; LOURENÇO JR et al., 2009; RODRIGUES; MIZUBUTI, 2009).

Töfoli, Domingues e Zanotta (2017) ressaltam que observações em campo têm evidenciado que as epidemias de *A. solani* iniciam-se a partir dos 40 a 45 dias após a emergência, nas folhas mais velhas, evoluindo posteriormente para as mais novas. Em contrapartida, a doença causada por *A. grandis* tende a ser mais severa e precoce podendo destruir rapidamente toda a área foliar. Geralmente menos agressiva, *A. alternata* é comumente encontrada em complexo com outras espécies ou associada a tubérculos.

Como dito anteriormente, acreditava-se que a pinta preta era causada apenas por *A. solani* Sorauer (ROTEM, 1994). Entretanto, Simmons (2000) através de estudos morfológicos, mostrou que outras espécies do mesmo gênero também causam essa doença. Os mesmos resultados também foram confirmados por Frazer e Zitter (2003).

No Brasil, estudos recentes com a utilização de marcadores moleculares, constataram que *A. grandis* é a espécie predominante que ataca a cultura da batata (RODRIGUES, 2009). A menor ocorrência de *A. solani* no Brasil pode ter como possível explicação o fato da *A. grandis* ser mais agressiva (CARDOSO, 2014).

Cardoso (2010) constatou haver diferença nas agressividades de *A. tomatophila*, *A. grandis* e *A. solani* à batateira e ao tomateiro. Apesar de haver evidências de preferência das populações brasileiras de *Alternaria* spp. às espécies hospedeiras, a especificidade não é completa, ou seja, isolados das espécies que afetam o tomateiro podem infectar batateira e vice-versa. Frazer e Zitter (2003) e Cardoso (2010) ressaltam que isolados de *A. tomatophila* foram mais agressivos que isolados de *A. solani* quando inoculados em folhas, pecíolos e caules de tomateiro.

Essas diferenças de agressividade podem explicar o motivo do aumento da ocorrência de pinta preta, em diferentes regiões produtoras, mesmo com a intensiva aplicação de fungicidas. (CARDOSO, 2014).

A agressividade é definida pela quantidade de doença produzida em uma dada interação patógeno-hospedeiro (CARDOSO, 2010; ANDRIVON, 1993). De acordo com Pariaud et al. (2009), para estimar a agressividade de um patógeno separa-se e quantifica-se os elementos de características quantitativas do ciclo de vida do patógeno. Esses elementos são os componentes de agressividade, que correspondem aos componentes epidemiológicos, sendo os mais comuns período latente, período de incubação, taxa de expansão da lesão, área da lesão e frequência de infecção (CARDOSO, 2010; CHACÓN et al., 2007; SUASSUNA et al., 2004; CARLISLE, et al., 2002). Segundo Cardoso (2010), além das eventuais diferenças quanto aos componentes epidemiológicos associados à agressividade, também é possível que haja respostas diferenciais dos fungos do gênero *Alternaria* a variáveis ambientais e que estas possam estar relacionadas a preferência por determinados hospedeiros, pois tomate e batata costumam ser cultivados em locais com características ambientais distintas.

O aumento da intensidade de epidemias de pinta preta em batata pode estar relacionado com o aumento da gama de hospedeiros ou à maior agressividade das novas espécies de *Alternaria* (CARDOSO, 2014).

Embora estudos de caracterização morfológica, cultural e moleculares das novas espécies de *Alternaria* já tenham sido realizados, até o ano de 2000 somente *A. solani* era considerada como agente causal da pinta preta em batata. No Brasil, o primeiro relato de novas espécies em batata e tomate ocorreu em 2009 (CARDOSO, 2010; RODRIGUES, 2009).

Rotem (1994) destaca que o gênero *Alternaria* é um táxon grande, diversificado e de grande importância econômica. O fungo, mais especificamente, *A. solani*, pode sobreviver em restos culturais, sobretudo devido à presença de clamidósporos

(PATTERSON, 1991) e em outros hospedeiros (FANCELLI, 1991). Töfoli, Domingues e Zanotta (2017) ressaltam que o gênero *Alternaria* pode sobreviver entre cultivos, em hospedeiros suscetíveis e no solo na forma de micélio e/ou esporos. Os conídios caracterizam-se por serem altamente resistentes a baixos níveis de umidade, podendo permanecer viáveis por até dois anos nessas condições. Quando as condições ideais de desenvolvimento aparecem, como umidade e calor, os conídios germinam e infectam as plantas rapidamente. O fungo pode penetrar diretamente pela cutícula ou através dos estômatos. Após a penetração, os sintomas da doença se tornam evidentes de 4 a 7 dias após o início da infecção.

A disseminação de *Alternaria* spp. ocorre principalmente pelo plantio de sementes infectadas, ação de ventos, águas de chuva e irrigação, circulação de pessoas e equipamentos agrícolas (TÖFOLI; DOMINGUES; ZANOTTA, 2017).

3.4. Identificação molecular das espécies de Alternária

A identificação das espécies de *Alternaria* normalmente se baseia em caracterização morfológica e cultural, ou seja, são observadas características como cor, tamanho, forma dos conídios e padrões de esporulação. No entanto, este método não tem sido suficiente para a identificação de espécies deste gênero devido basicamente a alguns fatores tais como: baixo número de caracteres passíveis de serem analisados, alta instabilidade e dependência da composição do meio utilizado para o crescimento da cultura, condições de incubação, além das variações intrínsecas ao patógeno (PERES et al, 2003; SIMMONS, 2000; FUNGARO, 2000; SIMMONS; ROBERTS, 1993).

Métodos moleculares têm se mostrado como ferramentas poderosas em estudos fitopatológicos. Essas técnicas se baseiam na análise direta ou indireta da composição ou na sequência dos ácidos nucleicos para identificação e caracterização de organismos e características genéticas de interesse (MARQUES et al., 2002).

A PCR é uma das técnicas moleculares mais utilizadas. Iniciadores são desenhados para anelar em regiões específicas do DNA do organismo alvo, desencadeando a produção de milhões de cópias de uma determinada região e o DNA amplificado pode ser observado por meio de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.

Esta reação consiste em três passos chave: a fase de desnaturação da dupla fita de DNA em alta temperatura (94 a 96 °C); fase de anelamento, na qual o par de

oligonucleotídeos iniciadores se liga à sequência complementar na fita de DNA (temperatura variável de acordo com a composição dos iniciadores); e a fase de extensão da fita de DNA (72°C) (CHEN; JANES, 2002).

Existem diversas regiões ou genes de fungos cujas sequências podem permitir a distinção entre espécies, tais como a região ITS (internal transcribed spacer) entre os genes ribossômicos 18S e 26S, os genes “housekeeping” *d*-beta-tubulina, calmodulina, histona, RNA polimerase B, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, que são os mais utilizados. O sequenciamento de fragmentos de DNA é uma ferramenta muito utilizada na identificação de espécies de *Alternaria*. A análise de alguns genes tem mostrado diferenças nas sequências, e essas diferenças são suficientes para distinguirmos as espécies dentro do gênero.

Para o gênero *Alternaria*, as regiões gênicas mais comumente utilizadas são a ITS; Alt a 1, que codifica a principal proteína alergênica do gênero; a GPD, que codifica uma enzima essencial na via da glicólise e da gliconeogênese; calmodulina, codificadora de proteínas que funcionam como sensores celulares de cálcio (OZKILINC et al., 2018; BESSADAT et al., 2017; PEIXOTO, 2015; GANNIBAL et al., 2014; LAWRENCE et al., 2013; RODRIGUES et al., 2010a; BROETTO, 2010; WEITCHEL et al., 2003).

Revisões taxonômicas recentes dividiram o gênero *Alternaria* em 26 seções baseando-se em dados morfológicos e, principalmente, moleculares (GRUM-GRZHIMAYLO et al., 2015; WOUDENGERG et al., 2013; 2014;). Das espécies de *Alternaria* que afetam a cultura da batata, *A. solani*, *A. grandis* e *A. protenta* estão na seção *Porri* (com conídios médios a grandes e bicos longos) e *A. alternata*, *A. tenuissima* e *A. arborescens* estão na seção *Alternaria* (maioria das espécies com conídios pequenos e concatenados).

Comparações entre sequências de genes como ITS, mtSSU rDNA e GPG permitiram a diferenciação entre *Alternaria alternata* e *Alternaria brassicicola* (PRYOR; BIGELOW, 2003). Em 2003, Cramer e Lawrence conseguiram distinguir *Alternaria alternata* e *Alternaria brassicicola* analisando o gene Alt a 1.

Rodrigues e colaboradores (2010) analisando sequências dos genes Alt a 1 e GPD conseguiram diferenciar *Alternaria tomatophila* e *Alternaria grandis*.

Em 2013, Brun e colaboradores conseguiram distinguir as espécies de *Alternaria dauci* K., *Alternaria porri* E., *Alternaria solani* P. e *Alternaria tomatophila* analisando as regiões ITS, GPD e Alt a 1. Analisando sequências das regiões Alt a 1,

GPD e calmodulina, associado às características morfológicas e associação patógeno-hospedeiro, Gannibal e colaboradores (2014) identificaram as espécies *Alternaria solani* e *Alternaria tomatophila* em batata e tomate, respectivamente, em cultivos na Rússia. Woudenberg e colaboradores (2014) identificaram 63 espécies de *Alternaria* dentro da seção *Porri* mediante análise filogenética das sequências concatenadas da região ITS e dos genes GPD, RPB2, TEF-1 α e Alt a 1, associadas a estudos morfológicos e características culturais. As espécies *A. tomatophila*, *A. subcylindrica* e *A. cretica*, agruparam-se em um mesmo clado sendo sinonimizadas com *A. linariae*. *Alternaria protenta*, conhecida anteriormente como patógeno de girassol, também foi relatada como patogênica à batata, juntamente com *A. grandis* e *A. solani*. Em estudo sobre a seção *Alternaria*, Woudenberg e colaboradores (2015) empregaram sequenciamento de genomas completos de nove morfoespécies e transcriptomas de doze morfoespécies, além de sequenciamento de nove regiões/genes de 168 isolados de *Alternaria*, encontrando somente onze espécies filogenéticas (*A. alternata*, *A. gossypina*, *A. longipes* e outras) e um complexo de espécies *A. arborescens* que englobava quatro morfoespécies que não puderam ser distinguidas pelos dados genéticos.

Levantamento das espécies de *Alternaria* que ocorriam em batata na Bélgica foi realizada por Landschoot e colaboradores (2016) a partir de isolados obtidos entre os anos de 2012 a 2014. Empregando sequenciamento de sete regiões/genes, identificaram da seção *Porri*, as espécies *A. solani*, *A. grandis*, *A. protenta*, e da seção *Alternaria*, as espécies *A. alternata* e *A. arborescens*.

Nos EUA, levantamento realizado entre os anos de 2008 a 2011 em cultivos de batata (TYMON; PEEVER, JOHNSON, 2016) mostrou que *Alternaria* de esporos grandes (provavelmente *A. solani*) foi menos frequente que de esporos pequenos (*A. alternata*/*A. tenuissima*, *A. arborescens* e *A. arbusti*). *Colletotrichum coccodes* também foi isolado de folhas com lesões necróticas. As espécies *A. alternata*/*A. tenuissima* não puderam ser distinguidas entre si mas foram diferenciadas de *A. arborescens*/*A. arbusti* pela digestão do produto de PCR OPA1-3 com a enzima *Apa*I. *A. arborescens* foi diferenciada de *A. arbusti* por sequenciamento do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PD). Este foi o primeiro relato de *A. arborescens* nos EUA e os autores alertam que essa espécie, assim como *A. arbusti*, podem estar sendo erroneamente identificadas como *A. alternata* devido à morfologia semelhante. Em outro estudo, Tymon; Cummings; Johnson (2016) demonstraram que *A. solani* é mais agressiva que *A. arborescens* e *A. arbusti* a diversas cultivares de batata. As duas

espécies menos agressivas necessitaram de ferimento previamente à infecção para a formação de lesões.

3.5. Controle químico da pinta preta e manejo da resistência

Devido à importância da doença como fator limitante à cultura da batata, diferentes métodos de controle integrado são usados, como por exemplo, espaçamento adequado, utilização de batatas-sementes sadias, cultivares menos suscetíveis, retirada e destruição de plantas doentes, sendo estas da cultura ou voluntárias, eliminação de restos de cultura e controle químico (ZANOTTA 2019; NOSSLLALA; 2016; BOSCO et al., 2010; TAYLOR et al., 2003). Destes, os fungicidas desempenham um papel decisivo no controle da pinta preta (TÖFOLI et al., 2016)

Eficácia, modo de ação, risco de resistência, efeitos colaterais, aspectos econômicos e sociais e legislação são fatores que devem ser tecnicamente considerados em programas de manejo que visem a sustentabilidade da cadeia produtiva da batata.

Töfoli (2011) destaca que as estratégias de controle com fungicidas têm o objetivo de prevenir ou reduzir a ocorrência de doenças no campo. Para isso é necessário que se conheça detalhadamente o potencial de controle desses produtos para que possam alcançar os melhores níveis de controle em programas de aplicação ou sistemas de previsão de doenças. Variáveis como suscetibilidade das cultivares, condições meteorológicas, escolha do produto, modo e mecanismo de ação, resistência a chuvas, estágio fenológico da cultura e momento da aplicação podem influenciar diretamente a eficiência de controle de um fungicida. (TÖFOLI, MELO, DOMINGUES, 2012; TÖFOLI, DOMINGUES; MELO, 2014)

De acordo com Blum (2009), fungicidas de uso agrícola são compostos químicos, de origem natural ou sintética, que conferem proteção às plantas quando em contato, evitando a penetração e/ou posterior desenvolvimento de fungos em seus tecidos.

Agrios (2005), Russell (2005) e Zanotta (2019) ressaltam que a constante evolução técnico-científica dos princípios ativos permitiu o desenvolvimento de

produtos com diversos mecanismos de ação na planta e nas diferentes fases do processo infeccioso.

Os princípios ativos podem ser classificados em produtos de contato, mesostêmicos, translaminares e sistêmicos. Os produtos de contato caracterizam-se por formar uma película protetora na superfície da planta, que impede a penetração do patógeno. Os mesostêmicos apresentam alta afinidade com a camada cerosa superficial das folhas, podendo ser redistribuídos na fase de vapor ou ser absorvidos pelo tecido, entretanto não apresentam nenhum movimento. Os produtos sistêmicos são aqueles que possuem movimento pela planta, através de vasos condutores, podendo atingir locais distantes do local onde foi depositado, enquanto que os translaminares movimentam-se de forma mais limitada nos tecidos (TÖFOLI, MELO, DOMINGUES 2012; AZEVEDO, 2007; REIS, REIS, FORCELINI, 2007). Os fungicidas mesostêmicos, translaminares e sistêmicos são considerados produtos seletivos, porque, em geral, inibem processos metabólicos específicos inerentes a grupos restritos de fungos (ZANOTTA, 2019; TÖFOLI, DOMINGUES, ZANOTTA, 2017).

Apesar de eficazes no combate à pinta preta, a utilização incorreta do controle químico pode ser bastante prejudicial ao plantio, uma vez que pode levar à resistência do patógeno a determinado princípio ativo. De acordo com o Fungicide Resistance Action Committee (FRAC, 2019), a resistência de fungos a fungicidas pode ser classificada qualitativa ou quantitativamente. Na qualitativa, ocorre a perda de efetividade do fungicida de modo repentino e marcante, pela presença bem definida de populações de patógenos que apresentam suscetibilidade e resistência com respostas que variam amplamente. Na quantitativa, ocorre a diminuição da eficácia no controle da doença, assim como a diminuição da suscetibilidade das populações do patógeno, demonstrada por testes de monitoramento. Esse tipo de resistência se manifesta gradualmente.

Para observar se está ou não ocorrendo a diminuição da sensibilidade ao princípio ativo, é indicado calcular o CE_{50} , ou seja, a concentração efetiva para matar 50% dos microrganismos submetidos ao fungicida que neste caso é a fungitoxicidade de uma substância química (VALENCIO, 2017; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008; RUSSELL, 2004; LOOMIS, 1995; EDGINGTON, KHEW, BARRON, 1971; TORGESON, 1967; SHARVELLE, 1961).

Dekker, (1987), Georgopoulos, (1982) e Zanotta (2019) ressaltam que para se realizar um monitoramento de resistência de fungos a fungicidas é de extrema

importância que se analise um grande número de isolados, além disso, as técnicas de monitoramento requerem um alto investimento e tempo (RAPOSO, et al. 2015). Um dos métodos mais utilizados para medir essa resistência e determinar o EC₅₀ e o método de inibição do crescimento micelial da colônia em meio de cultura (ICM).

Como alternativa, a sensibilidade de fungos a fungicidas pode ser avaliada através da metodologia de microtitulação colorimétrica. Essa metodologia vem sendo recomendada pelo FRAC Internacional, já sendo empregada em diversos estudos de monitoramento de resistência (ZANOTTA, 2019; VALÊNCIO, 2017; VEGA et al., 2012; RAMPERSAD, 2011).

De acordo com Raposo e colaboradores (2015) e Zanotta (2019), no teste de microtitulação a quantidade de biomassa fúngica presente nos poços afeta a passagem de luz proporcionalmente, possibilitando quantificar o efeito do fungicida de forma rápida e reprodutível. Essas características tornam esse método muito apropriado para um monitoramento rápido e preciso de resistência em uma população de fungos a fungicidas. Este método consiste no fungo ser cultivado em poços de microplacas de poliestireno, sendo seu crescimento analisado por espectrofotômetro (ZANOTTA, 2019; LUDWIG; BOLLER, 1990).

Töfoli et al., (2016) destacam que novos produtos têm sido introduzidos no mercado brasileiro para o controle da pinta preta na batateira. Novas misturas, mecanismos de ação e características técnicas diferenciadas abrem novas perspectivas para o controle dessa doença. Para a pinta preta, a tendência atual é o desenvolvimento de misturas entre diferentes grupos de fungicidas como estrobilurinas e triazóis (azoxistrobina + difenoconazol, trifloxistrobina + tebuconazol, piraclostrobin + metconazol); estrobilurina e carboximida (piraclostrobina + boscalida) e anilino piridilamina e dicarboximida (pirimetanil + iprodiona). Entre as novas opções em desenvolvimento para o controle da pinta preta da batata, destaca-se o fungicida picoxistrobina.

Pesquisas em busca de novos conceitos e alternativas para o controle de doenças têm proposto compostos capazes de ativarem o sistema de defesa latente da planta a resistir ao ataque de patógenos (TÖFOLI, 2011; ROMEIRO, 2008). Enquanto que os fungicidas atuam suprimindo o patógeno, os indutores de resistência ativam o sistema de defesa da planta impedindo ou reduzindo o processo infeccioso (TÖFOLI, 2011; WALTERS; FOUNTAINE, 2009)

Walters (2010) e TÖFOLI (2011) ressaltam que a possibilidade de integração de fungicidas e indutores de resistência em misturas ou programas de aplicação no controle da pinta preta da batata abre perspectivas a um controle conceitualmente mais completo e eficaz.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de execução

Os experimentos foram realizados no Instituto Biológico em São Paulo, nos laboratórios: LDF - Laboratório de Diagnóstico Fitopatológico; LDFH - Laboratório de Doenças Fúngicas em Horticultura, Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada (ULRBMA) e na casa de vegetação do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal.

4.2. Coleta de material infectado

Material vegetal apresentando sintomatologia típica de pinta preta (Figura 5) foi coletado em sete estados (SP, MG, PR, RS, GO e BA) onde ocorre a produção de batata pelo Brasil.

Quando a coleta não podia ser feita presencialmente, foi desenvolvido um formulário (Figura 6) para coleta que, após ser respondido pelo produtor ou engenheiro agrônomo responsável pela área, era encaminhado junto com a amostra para o laboratório.



Figura 5. Coletas de amostras de batata com sintomas de pinta preta.

	AMOSTRAS DE REQUEIMA E PINTA PRETA		Requeima e Pinta Preta
	LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO FITOPATOLÓGICO		
Nome:		CPF:	
E-mail:		Telefone: ()	
Endereço:			
Data da coleta:		Cidade:	Estado:
Latitude:		Longitude:	Altitude:
Variedade:		Dias após plantio (DAP):	
TIPO DE AMOSTRA (MATRIZ)			
<input type="checkbox"/> Mudas <input type="checkbox"/> Folhas <input type="checkbox"/> Pecíolos <input type="checkbox"/> Hastes <input type="checkbox"/> Tubérculos <input type="checkbox"/> Batata-semente <input type="checkbox"/> Outros:			
PRAGAS A SEREM ANALISADAS			
<input type="checkbox"/> Requeima		<input type="checkbox"/> Pinta Preta	

Figura 6. Formulário desenvolvido para o envio de amostras ao Instituto Biológico.

4.3. Isolamento de *Alternaria* spp.

Para o isolamento de *Alternaria* spp. foram utilizados meios de cultura Ágar Água (AA) e Batata Dextrose Agar (BDA) preparado conforme indicação do fabricante.

Fragmentos do material contendo estruturas do patógeno foram transferidos para os meios de cultura descritos acima e incubados a 25°C com fotoperíodo de 12 horas.

4.4. Obtenção de isolados padrões de espécies de *Alternaria*

Para a realização dos estudos, foram cedidos pela Dra. Christiane Ceriani Aparecido - Micoteca Mario Barreto Figueiredo, Instituto Biológico de São Paulo – São Paulo/SP, seis isolados de espécies de *Alternaria* (Tabela 3):

Tabela 3. Informações de isolados fornecidos pela Micoteca Mario Barreto Figueiredo do Instituto Biológico.

Nº Micoteca	Espécie	Procedência / Ano	Hospedeira
MMBF 245	<i>Alternaria solani</i>	- /1962	-
MMBF 1708	<i>Alternaria tenuis</i>	- / 2008	<i>Lactuca sativa</i> L.
MMBF 1808	<i>Alternaria</i> sp	- / 2008	<i>Capsicum annuum</i> (semente)
MMBF 1013	<i>Alternaria alternata</i>	São Francisco de Paula / RS / -2005	<i>Solanum tuberosum</i>
MMBF 261/12/1612	<i>Alternaria solani</i>	Micoteca Maria Menezes / Recife	<i>Solanum lycopersicum</i>
MMBF 1016	<i>Alternaria grandis</i>	- / 2016	-

4.5. Preservação dos isolados

As culturas foram preservadas em tubos de ensaio contendo BDA e frascos contendo água destilada esterilizada pelo método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967) para evitar perdas durante a execução do projeto. Pequenos discos (7 mm) do meio de cultura com o fungo foram transferidos para frascos de vidro contendo aproximadamente 4 mL de água destilada esterilizada. Após a transferência dos discos para os frascos, estes foram fechados com uma rolha de borracha previamente esterilizada e permaneceram sob observação durante alguns dias para que fosse verificada a ocorrência de possíveis contaminações bacterianas. Não havendo tais contaminações, os frascos foram lacrados para evitar a perda d'água e acondicionados a 10°C. Para cada um dos isolados foram preparados dois frascos para o método Castellani e dois tubos para preservação em BDA.

4.6. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo método descrito por Dellaporta e colaboradores (1983) com modificações. O material foi triturado sob nitrogênio líquido dentro de tubos de 1,5 mL, adicionou-se 600 μ L solução de extração CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) e seguiu-se incubação por 30-45 minutos a 65°C com agitação moderada. Adicionou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), a mistura foi agitada por inversão e centrifugada a 14.000 G por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e a extração com clorofórmio/álcool isoamílico foi repetida. O sobrenadante foi novamente transferido para novos tubos de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 0,6 volume de isopropanol e mantidos a -4°C durante a noite. Após este período, os tubos foram centrifugados a 12.000 G por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com etanol absoluto seguido de lavagem com etanol 70%. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco a 36 °C por 20 min. O DNA foi suspenso em 40 μ L de água de osmose reversa esterilizada.

4.7. Identificação molecular por Reação da Cadeia Polimerase (PCR)

4.7.1. Amplificação da região ITS

A região ITS dos isolados foi amplificada por reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando-se os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3'), segundo White et al. (1990). O produto de aproximadamente 600 pares (Figura 7) de bases da reação foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão TAE e corado com brometo de etídeo.

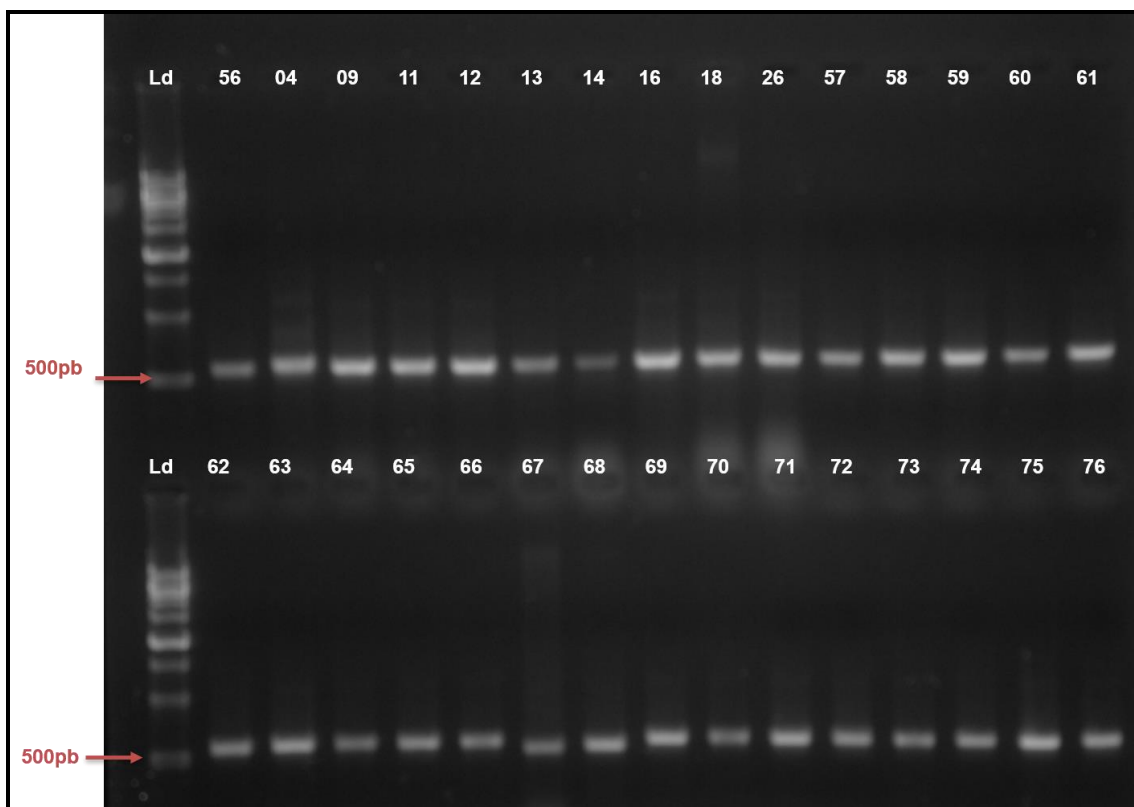


Figura 7. Gel de agarose 1,5%, de amplificação da região ITS com os iniciadores ITS 1 e ITS4. Isolados de *Alternaria* spp. 56, 04, 09, 11 ao 14, 16, 18, 26, 57 ao 76. Ld = Ladder/Padrão 100 bp.

4.7.2. Amplificação do gene da calmodulina

A PCR para a região calmodulina foi realizada utilizando-se os iniciadores CAL 228F (5'-GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC-3') e CAL 737R (5'-CATCTTTCTGGCCATCATGG-3'), segundo Carbone e Kohn. (1999). O produto de aproximadamente 500 pares de bases da reação foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com tampão TAE e corado com brometo de etídeo (Figura 8).

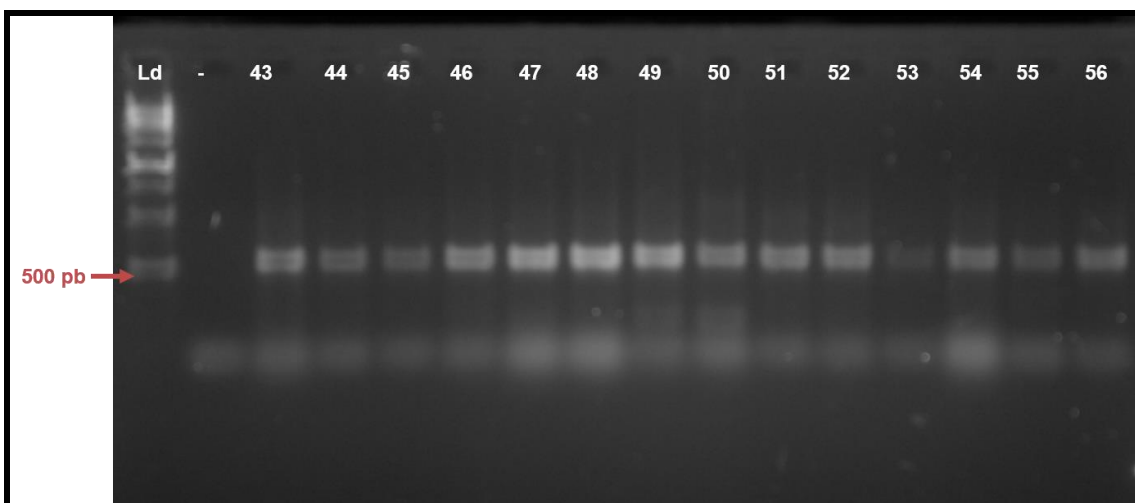


Figura 8. Gel de agarose 1,5%, de amplificação da região Calmodulina com os iniciadores CAL 228F e CAL 737R. Isolados de *Alternaria* spp. 43 ao 56. Ld = Ladder/Padrão 100 bp,

4.7.3. Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados seguindo protocolo descrito por Schmitz e Riesner (2006). Em microtubo de 1,5 mL, foram misturados 1,6 µL de EDTA 0,5 M, 21,0 µL PEG 6.000 a 50% e 8,1 µL de NaCl 5 M. Adicionou-se o produto da PCR (50 µL) à mistura e incubou-se a temperatura ambiente por 10 min. Após centrifugação a 14.000 G por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 125 µL de etanol 70%. O pellet foi seco a 36°C por 20 minutos. O DNA foi diluído em 30 µL água de osmose reversa esterilizada.

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia, descrito por Sanger et al. (1977). As reações para sequenciamento foram efetuadas com o Kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisadas em sequenciador ABI 3500 xL (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante.

As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999) e comparadas com sequências depositadas no GenBank por meio do programa Blastn.

As sequências da região ITS e do gene da calmodulina foram alinhadas empregando-se o programa MAFFT (KATOHI; ROZEWICKI; YAMADA, 2019). A determinação do melhor modelo de substituição nucleotídica e a construção das árvores

filogenéticas pelo método de “Maximum Likelihood” com bootstrap de 500 repetições foram realizadas com o programa MEGAX (KUMAR et al., 2018).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Coleta de material infectado

Foram efetuadas 15 coletas em campos e estufas de batata e colaboradores enviaram material, com sintomas de pinta preta, de regiões produtoras (Figura 9), totalizando 26 cidades nos estados de SP, MG, PR, RS, GO, BA e PE.



Figura 9. Locais de coletas de amostras de batata com sintomas de pinta-preta: A) Vargem Grande do Sul/SP, B) Divinolândia/SP, C) Casa Branca/SP e D) Poços de Caldas/MG.

5.2. Identificação das espécies de *Alternaria*

Das coletas efetuadas e amostras recebidas foram obtidos, 78 isolados (Tabela 4). Os isolamentos foram realizados a partir da visualização dos sintomas e/ou dos esporos de *Alternaria* spp. em microscópio (Figura 10).

Dos 78 isolados, três (57, 58 e 59) foram obtidos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), os demais foram isolados de batata (*Solanum tuberosum* L.)

Vinte isolados (57 ao 78) foram cedidos pelo pesquisador Dr. Valdir Lourenço Júnior da Embrapa Hortaliças, Brasília/DF.



Figura 10. Esporos de *Alternaria* spp

Tabela 4. Isolados de *Alternaria* spp. obtidos durante este estudo

N°	Nome do Isolado	Cidade / Estado
01	ALT 1	São José dos Ausentes / RS
02	ATL 2	Bom Jesus / RS
03	ALT 10 (1016)*	-
04	ALT 13	Casa Branca / SP
05	ALT 16	Bom Jesus / RS
06	ALT 20 (245)*	-
07	ALT 21 (261/12-1612)*	Recife / PE
08	ALT 22 (1013)*	-
09	ALT 24	Divinolândia / SP
10	ALT 26 ^a	São Sebastião da Grama / SP
11	ALT 26B	São Sebastião da Grama / SP
12	ALT 27 ^a	Andradas / MG
13	ALT 30	Ipuúna / MG
14	ALT 33B	Bom Jesus / RS
15	ALT 34	Guarapuava / PR
16	ALT 35B	Santa Juliana / MG
17	ALT 36 ^a	Poços de Caldas / MG
18	ALT 36B	Poços de Caldas / MG
19	ALT 38 ^a	Contenda / PR
20	ALT 38B	Contenda / PR

21	ALT 39 (1708)*	-
22	ALT 40 (1808)*	-
23	ALT 3	Ponta Grossa / PR
24	ALT 4	Bom Jesus / RS
25	ALT 9	Ponta Grossa / PR
26	ALT 7	Ponta Grossa / PR
27	ALT 11	Casa Branca / SP
28	ALT 12	Casa Branca / SP
29	ALT 14	Casa Branca / SP
30	ALT 15	Vargem Grande do Sul / SP
31	ALT 18	Vargem Grande do Sul / SP
32	ALT 26C	São Sebastião da Grama / SP
33	ALT 27B	Andradas / MG
34	ALT 27C	Andradas / MG
35	ALT 28 ^a	Ponta Grossa / PR
36	ALT 28B	Ponta Grossa / PR
37	ALT 28C	Ponta Grossa / PR
38	ALT 29	São Mateus do Sul / PR
39	ALT 31	Campo Largo / PR
40	ALT 33 ^a	Bom Jesus / RS
41	ALT 35 ^a	Santa Juliana / MG
42	ALT 36C	Poços de Caldas / MG
43	ALT 37	Águas da Prata / SP
44	ALT 41	Santa Juliana / MG
45	ALT 42 ^a	Irati / PR
46	ALT 42B	Irati/PR
47	ALT 43 ^a	Casa Branca / SP
48	ALT 43B	Casa Branca / SP
49	ALT 43D	Casa Branca / SP
50	ALT 44 ^a	Casa Branca / SP
51	ALT 44B	Casa Branca / SP
52	ALT 45	Perdizes / MG
53	ALT 45B	Perdizes / MG

54	ALT 45C	Perdizes / MG
55	ALT 45D	Perdizes / MG
56	ALT 45E	Perdizes / MG
57	EH 2167	Cristalina / GO
58	EH 2171	Brazlândia / GO
59	EH 2206	Taquara / GO
60	EH 2325	Perdizes / MG
61	EH 2327	Perdizes / MG
62	EH 2328	Perdizes / MG
63	EH 2337	Rio Paranaíba / MG
64	EH 2337	Rio Paranaíba / MG
65	EH 2340	Rio Paranaíba / MG
66	EH 2428	Serra do Salitre / MG
67	EH 2430	Serra do Salitre / MG
68	EH 2434	Serra do Salitre / MG
69	EH 2436	Santana de Patos / MG
70	EH 2437	Santana de Patos / MG
71	EH 2500	Mucugê / BA
72	EH 2632	Mucugê / BA
73	EH 2633	Mucugê / BA
74	EH 2634	Mucugê / BA
75	EH 2635	Mucugê / BA
76	EH 2636	Mucugê / BA
77	EH 2637	Mucugê / BA

*Isolados cedidos pela Micoteca do Instituto Biológico.

5.2.1. Amplificação e sequenciamento da região ITS

Foram amplificados fragmentos de aproximadamente 600 pares de bases (bp) para 78 isolados de *Alternaria* spp. Todos foram sequenciados e as sequências obtidas foram alinhadas no programa BioEdit e comparadas com sequências depositadas no GenBank.

Para o sequenciamento da região ITS (Tabela 5) 59 isolados foram identificados como *Alternaria* Seção Porri, 16 isolados foram identificados como pertencentes à Seção *Alternaria* que inclui *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* e outras espécies, um isolado como *A. brassicicola*/*A. mimicula* e dois isolados como *Fusarium oxysporum*. Como observado em trabalhos anteriores, as sequências da região ITS não permitiram distinguir *A. solani* de *A. grandis* e outras espécies próximas da Seção Porri, assim como *A. alternata* de *A. tenuissima* e *A. arborescens* e outras espécies próximas da Seção *Alternaria* (Figura 11).

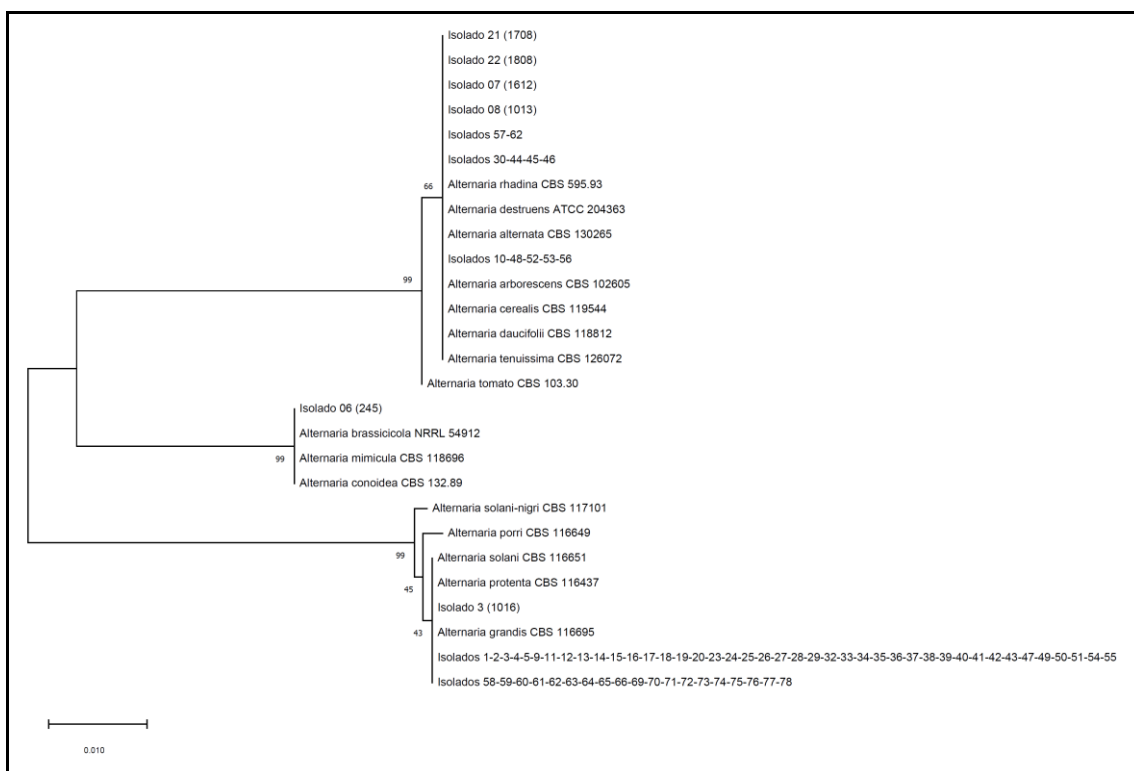


Figura 11. Árvores filogenética construída com sequências da região ITS de isolados de *Alternaria* spp. de batata. Foram incluídas sequências de espécimes depositados em coleções, retiradas do GenBank para comparação. Foi utilizado o método de Máximo Likelihood com bootstrap de 500 repetições, empregando o modelo de substituição nucleotídica de Jukes-Cantor e distribuição Gamma.

5.2.2. Amplificação e sequenciamento do gene da calmodulina

Foram amplificados fragmentos de aproximadamente 650 pares de bases (bp) para 74 isolados de *Alternaria*. Estas foram alinhadas no programa MAFFT e comparadas com sequências depositadas no GenBank.

Pelo sequenciamento da região calmodulina (Tabela 5), 57 isolados foram identificados como *Alternaria grandis* (Seção Porri), dez isolados apresentaram-se semelhantes a espécies relacionadas a *A. alternata* (Seção *Alternaria*) e seis isolados semelhantes a isolados do complexo de espécies *A. arborescens* (Seção *Alternaria*) e um isolado como *A. brassicicola/A. mimicula* (Figura 12). Um isolado (56) ficou em posição intermediária entre *A. alternata* e *A. arborescens* e, após verificação detalhada do eletroferograma do sequenciamento, constatou-se polimorfismo em algumas posições indicando heterozigossidade ou mistura de isolados.

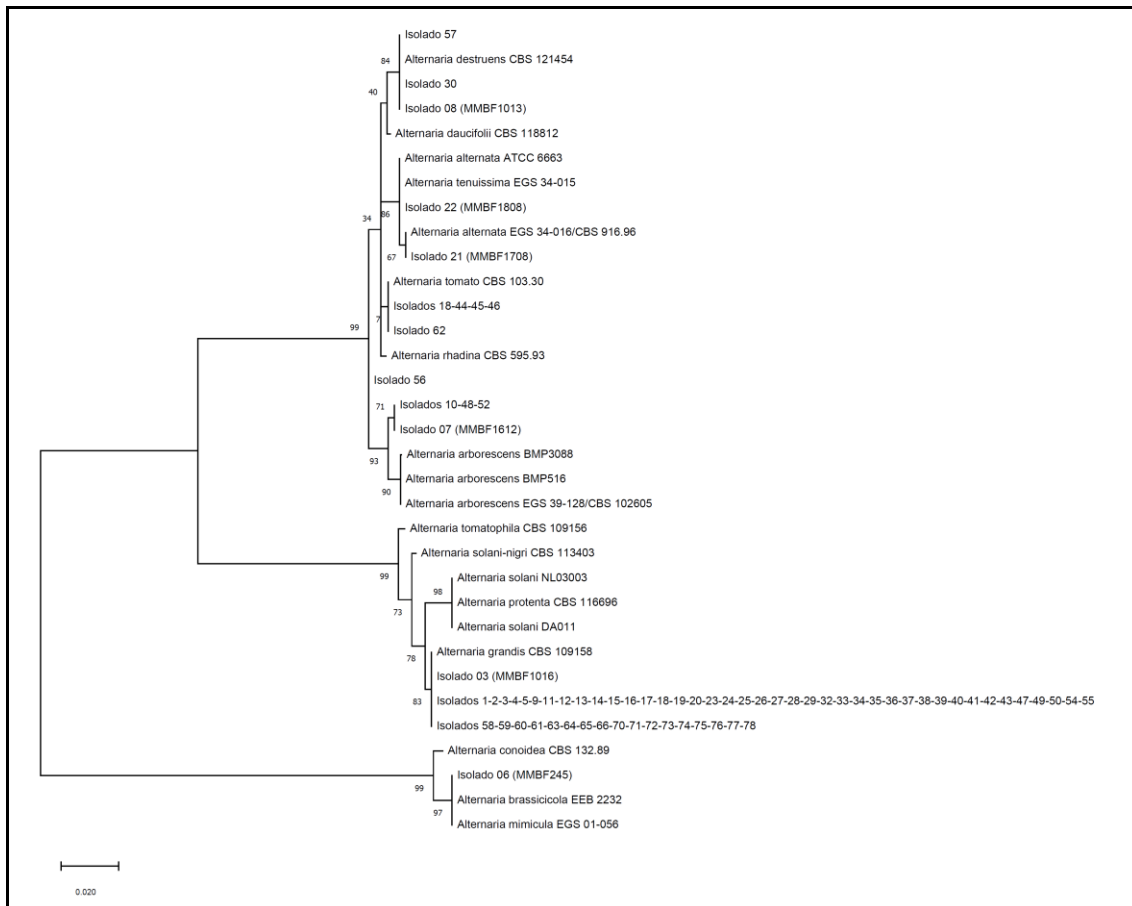


Figura 12. Árvore filogenética construída com sequências do gene da calmodulina de isolados de *Alternaria* spp. de batata. Foram incluídas sequências de espécimes depositados em coleções, retiradas do Genbank para comparação. Foi utilizado o método de Maximum Likelihood com bootstrap de 500 repetições, empregando o modelo de substituição nucleotídica de Hasegawa-Kishino-Yano.

O gene da calmodulina permitiu identificar os isolados de *A. grandis* que pela região ITS não era possível de distinguir de *A. solani*, *A. protenta* e outras da seção Porri. Esses resultados confirmam os obtidos por Rodrigues e colaboradores (2010) e Cardoso (2014), mostrando que *A. grandis* é o agente causal da pinta preta da batata amplamente predominante no Brasil.

De acordo com a revisão taxonômica de Woundenberg e colaboradores (2015) sobre a seção *Alternaria* do gênero *Alternaria*, os dez isolados semelhantes a *A. alternata* do presente estudo devem ser considerados como pertencentes a esta espécie. Esses autores sinonimizaram 35 morfoespécies sob *A. alternata* por não terem formado clados separados utilizando-se nove marcadores genéticos.

A virulência da espécie *A. alternata* sobre plantas de batata e tomate foi questionada em três estudos apresentados no 14º Euroblight Workshop, realizado em 2013 e com anais publicados em 2014. Stammler e colaboradores (2014) observaram na Alemanha, em experimentos em casa de vegetação com tomate e batata e de campo somente com batata, baixa ou nenhuma virulência de *A. alternata* aos hospedeiros, contrastando com a elevada virulência de *A. solani*. Spoelder; Ellens; Turkensteen (2014) verificaram na Holanda, que *A. alternata* não foi capaz de causar lesões em folhas de batateira destacadas, mesmo após fermento artificial, e que a inoculação de plantas no campo com *A. alternata* não aumentou a incidência de lesões já presentes por deficiência nutricional ou dano por ozônio. Shtienberg (2014), observou em Israel que, embora *A. alternata* tenha sido capaz de infectar experimentalmente folhas destacadas de batateira, lesões necróticas que ocorrem em plantações e que costumam ser associadas a esta espécie de fungo não são efetivamente controladas pelo uso de fungicidas. Este autor associou estes sintomas à carência de nitrogênio que ocorre em solos arenosos após chuvas intensas, tendo sido capaz de reduzir as lesões com aplicação de adubação nitrogenada. Em virtude destes relatos, o papel de *A. alternata*, detectada em batateiras no presente estudo, como agente causal da pinta preta ainda precisa ser elucidado.

Membros do complexo de espécies *A. arborescens* ainda não haviam sido relatados causando pinta preta em batata no Brasil.

Estudo recente sobre a diversidade de fungos do gênero *Alternaria* que afetam a cultura da batata na Bélgica mostrou a presença de *A. solani*, *A. grandis*, *A. protenta*, *A. alternata* e *A. arborescens* (LANDSCHOOT et al., 2017). Nesse estudo, os isolados do complexo de espécies *A. arborescens* puderam ser subdivididos em dois grupos com base na sequência do gene da histona H3.

Tabela 5. Identificação dos isolados de *Alternaria* spp. coletados em regiões produtoras de batata no Brasil

Isolado	Identificação por ITS	Identificação pela Calmodulina
01	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
02	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
03	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
04	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
05	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
06	<i>A. brassicicola/A. mimicula</i>	<i>A. brassicicola/A. mimicula</i>
07	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	CEAA
08	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
09	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
10	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	CEAA
11	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
12	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
13	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
14	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
15	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
16	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
17	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
18	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
19	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
20	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
21	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
22	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
23	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
24	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
25	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
26	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
27	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
28	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
29	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
30	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
31	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
32	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
33	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
34	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
35	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
36	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
37	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
38	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
39	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
40	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>

41	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
42	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
43	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
44	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
45	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
46	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
47	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
48	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	CEAA
49	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
50	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
51	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	-
52	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	CEAA
53	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	CEAA
54	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
55	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
56	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	CEAA
57	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
58	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
59	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
60	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
61	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
62	<i>Alternaria</i> Seção <i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>
63	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
64	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
65	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
66	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
67	<i>Fusarium oxysporum</i>	-
68	<i>Fusarium oxysporum</i>	-
69	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	-
70	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
71	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
72	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
73	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
74	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
75	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
76	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
77	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>
78	<i>Alternaria</i> Seção <i>Porri</i>	<i>A. grandis</i>

*CEAA = Complexo de espécies *Alternaria arborescens*

Hausladen e Leiminger (2007), na Alemanha e Blixt e Andersson (2010), na Suécia relatam que a pinta preta vem sendo causada pelas espécies *A. solani* e *A. alternata*.

Em 2010, no Irã, foram relatadas cinco espécies de *Alternaria* em batata, *A. tenuissima*, *A. dumosa*, *A. arborescens*, *A. infectoria* e *A. interrupta* (ARDESTANI *et al.*, 2010).

Até 2013, na China, as únicas espécies de *Alternaria* relatadas que causavam doença em batata eram a *A. solani* (TAI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012) e *A. alternata* (FAN *et al.*, 2013).

Entretanto em 2013, Zheng e colaboradores estudaram a estrutura populacional de espécies de *Alternaria* associadas a doenças foliares da batata na China. Um total de 511 isolados foram coletados e a espécie *A. tenuissima* foi a mais prevalente (75,5%), seguida por *A. alternata* (18,6%) e *A. solani* (5,9%). Ressaltando que este foi o primeiro relato de *A. tenuissima* causando doenças foliares na batata na China.

Os autores observaram que *A. tenuissima* é quase tão agressiva à batata quanto as outras duas espécies relatadas anteriormente (ZHENG *et al.*, 2013).

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo confirmam a predominância de *Alternaria grandis* como agente causal da pinta preta da batateira em diferentes regiões produtoras do Brasil.

Outras espécies de *Alternaria* associadas a doenças foliares em batata aumentam a complexidade do que se conhece, podendo dificultar ainda mais o manejo da doença.

Membros do complexo de espécies *Alternaria arborescens* ainda não haviam sido relatados causando pinta preta em batata no Brasil.

O sequenciamento do gene da calmodulina foi eficiente para a distinção de *A. grandis* de outras espécies da Seção *Porri* do gênero *Alternaria*, assim como permitiu discriminar isolados do complexo de espécies *Alternaria arborescens* de outras espécies relacionadas a *Alternaria alternata* da Seção *Alternaria*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 919p.
- ANDRIVON D. 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. **Phytopathology** 83: 889-890.
- ARDESTANI, S.T. et al. 2010. New *Alternaria* species associated with potato leaf spot in various potato growing regions of Iran. **Iranian Journal of Plant Pathology** 45: 83e86.
- AZEVEDO, L.A.S. **Fungicidas sistêmicos: prática e teoria**. Campinas: O Autor, 2007. 290 p.
- BANDINELLI, M. G. **Micropropagação e miniestaquia na propagação de batata**. 2009, 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, 2009
- BESSADAT et al., 2017. *Alternaria* species associated with earlyblight epidemics on tomato and other Solanaceae crops in northwestern Algeria. *European Journal of Plant Pathology* **148**, 181–197.
- BLIXT, E.; ANDERSSON, B. 2010. Occurrence of *Alternaria solani* in Sweden and its sensitivity to strobilurins. **Twelfth EuroBlight workshop**, Arras, France, 3–6 May 2010
- BLUM, M. M. C. **Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. 2009. 174 f. Tese de doutorado em fitopatologia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.
- BOITEUX, L.S.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Potato early blight caused by *Alternaria alternata* in Brasil. **Plant Disease**, St Paul, v. 78, p. 101, 1994.
- BOSCO, L. C. et al. Sistema de previsão de requeima em cultivos de batata em Santa Maria, RS. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 649-660, 2010.
- BROETTO, L. Caracteriação funcional da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase na superfície celular do entomopatógeno *Metharhizium anisopilae*. 2010. Tese de Doutorado em Biologia celular e molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010

- BRUN, S. et al. Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. *Fungal Biology*, v. 117, p. 32-40, 2013
- CENTER FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCES INTERNATIONAL (CABI), 2019. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40970>. Acesso em: 18 julho 2019.
- CARBONE, I.; KOHN, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- CARDOSO CR, 2010. **Agressividade de *Alternaria tomatophila*, *A. grandis* e *A. solani* em batateira e tomateiro.** Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, dissertação de mestrado.
- CARDOSO CR, 2014. **Potato And Tomato Early Blight: Molecular Identification Of *Alternaria* Species, Host Range And Epidemics.** Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, tese de doutorado.
- CARLISLE, D.J.; COOKE, L.R.; WATSON, S.; BROWN, A.E. 2002. Foliar aggressiveness of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* on detached leaflets of three potato cultivars. *Plant Pathology* 51:413-423.
- CHACÓN, M. et al. 2007. Aggressiveness of *Phytophthora infestans* and phenotypic analysis of resistance in wild *Petota* accessions in Ecuador. *Plant Pathology*. 56. 549 - 561. 10.1111/j.1365-3059.2007.01604.x.
- CHEN, B.Y.; JANES, H. W. PCR cloning protocols. Humana Press. Segunda Edição, p. 192-439, 2002.
- CRAMER, R. A.; LAWRENCE, C. B. Cloning of a gene encoding an Alt a 1 Isoallergen Differentially Expressed by the necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola* during *Arabidopsis* infection. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 4, p.2361-2364
- CWALINA-AMBROZIAK, B.; BOGUCKA, B. Severity of late blight (*Phytophthora infestans*/Mont./de Bary) and early blight of potato (*Alternaria solani* Sorauer, *A. alternata*/Fr./Keissler) in three potato cultivars under differentiated soil and foliar fertilization. *Journal of Elementology*, Olszytn, v.17, n.3, p.379-388, 2012.
- DEKKER, J. How to detect and measure fungicide resistance. In: **Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology**, 1987. 299 p.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

- DIAS, J.A.C.S.; IAMAUTI, M.T. Doenças da batateira (*Solanum tuberosum*). In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. 663 p.
- DIAS, J.A.C.; IAMAUTI, M.T.; FISCHER, I.H. Doenças da Batateira. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2016. v.2, p.125-147.
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic Spectrum of Benzimidazole Compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.
- S. FAN; J. et al. **From Subsistence to Profit: Transforming Smallholder Farms** Food Policy Report. International Food Policy Research Institute, Washington D.C (2013)
- FANCELLI, M.I. 1991. **Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *A. solani* f. sp. *lycopersici* N. F.** Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, tese de doutorado.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), Roma, 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/>. Acesso em: 28 jan. 2020.
- FERREIRA, P.B. et al. O mercado de batatas congeladas no Brasil. Estudo de caso: batatas Maccain. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA. 46., 2008, Recife. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/9/349.pdf>. Acesso em: 25 de março de 2018
- FIGUEIREDO, M.B. Estudo sobre a aplicação do método Castellani para a conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, v.33, p. 9-13, 1967
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 412 p.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas I: batata o alimento universal**. In: **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na propagação e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2008. Pate II: olericultura especial, 161p.

- FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Classificação e descrição botânica. IN: PEREIRA, S. A.; DANIELS, J. (Eds.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 69-79.
- FRAZER JT, ZITTER, TA, 2003. Two species of *Alternaria* cause early blight of potato, (*Solanumtuberosum*) and tomato (*Lycopersiconesculentum*). **Phytopathology** (suppl. 3), **93**.
- FRY, W. E. Role of early and late blight suppression in potato pest management. In: ZENDER, G. W.; POWLESON, M. L.; JANSSON R. K.; RAMAN, K. V. **Advances in potato pest: biology and management**. Saint. Paul, 1994. p. 166-177.
- Fungicide Resistance Action Committee - FRAC, Disponível em: http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/phytin-microtiter-method-sporangia-basf-2006-v1.pdf?sfvrsn=479a419a_4 Acesso em: 17 out. 2019.
- FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. *Biotecnologia - Ciência & Desenvolvimento*, Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 12-16, 2000.
- GANNIBAL, P.B.; ORINA, A.S.; MIRONENKO, N. V.; LEVITIN, M.M. 2014. Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology* **139**, 609–623.
- GEORGOPOULOS, S. G. Detection and measurement os fungicide resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen: **Center for Agricultural Publishing and Documentation**, 1982. p. 24-31.
- GODOY, R.C.B.; SCOTTI, C.A.; BUENO, L.A.P. A batata no estado do Paraná. In: PEREIRA, A.S., DANIELS, J. (Ed.). **O cultivo da batata na Região Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 25-37.
- GRUM-GRZHIMAYLO et al., **On the diversity of fungi from soda soils**. *Fungal Diversity* (2015), [10.1007/s13225-015-0320-2](https://doi.org/10.1007/s13225-015-0320-2)
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, n. 41, p. 95-98, 1999.

- HAUSLADEN, H.; LEIMINGER, J. 2007. Potato early blight in Germany (*Alternaria solani* - *Alternaria alternata*), PPO Special report no. 12, Westerdijk CEM Schepers HTAM, (eds) **Applied Plant Research BV**, Wageningen
- LEIMINGER, J.H. 2009. *Alternaria* spp. an Kartoffeln — Empirische Untersuchungen zur Epidemiologie, Schadrelevanz und integrierten Bekämpfungsstrategien. Ph.D. Thesis, Technische Universität München, Germany.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> Acesso: 28 de jan. de 2020.
- INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP. Lima, 2019. Disponível em: <https://cipotato.org/crops/potato/>. Acesso em: 22 janeiro 2019.
- KAPSA, J. Effectiveness of some fungicides in control of *Alternaria alternate* and *Alternaria solani*. **PPO-Special Report**, Hamar, v. 13 p. 127-134, 2009.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 2019;20(4):1160-1166. doi:10.1093/bib/bbx108
- KEMMITT, G. 2002. Early Blight of Potato and Tomato. The Plant Health Instructor. 10.1094/PHI-I-2002-0809-01. LATORSE, M.P. et al. Tuber blight control: effect of foliar applied fungicides such as Infinito on viability of sporangia of *Phytophthora infestans*. **PPO-Special Report**, v.12, p.37-47, 2007.
- KUMAR, J.P.; GIRI, S.D. SARKAR, A. **ScienceDirect Mesoporous NiO with different morphology : Synthesis, characterization and their evaluation for oxygen evolution reaction** Int. J. Hydrogen Energy, 1–11 (2018), 10.1016/j.ijhydene.2018.06.097
- LATORSE et al. Molecular analysis of *Alternaria* populations early blight causal agents in potato plants. **PPO-Special Report**, Arras, n. 14, p. 179-186, 2010.
- LANDSCHOOT et al., “Boscalid-resistance in *Alternaria alternata* and *Alternaria solani* populations : an emerging problem in Europe,” CROP PROTECTION, vol. 92, pp. 49–59, 2017.
- LANDSCHOOT et al., Assessing the Belgian potato *Alternaria* population for sensitivity to fungicides with diverse modes of action. Europe Journal of Plant Pathology, 148 (3), 657-672. Doi: 10.1007/s10658-016-1123-3. 2016.
- LAWRENCE DP, GANNIBAL PB, PEEVER TL, PRYOR BM, 2013. The sections of *Alternaria*: Formalizing species-groups concepts. **Mycologia** **105**, 530-546.

- LOOMIS, T. A. **Fundamentos de toxicologia**. 3. Ed. Zaragoza: Acribia, 1995. p. 444.
- LOURENÇO JUNIOR, V.; et al. 2009. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. **Phytopathology** **99**, 765-774.
- LUDWIG, A. BOLLER, T. A method for the study of fungal growth inhibition by plant proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, n. 1-2, p. 61–66, 1990.
- MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R. & FONSECA, A.S.K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. & AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul, 2002. 433p.
- NAZARENO, N. R. X.; JACOUND FILHO, D. S. Doenças fúngicas. In: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. (Ed.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 239-276, 2003.
- NOSSLLALA, S.K. **Sensibilidade in vitro de isolados de *Alternaria grandis* e *Alternaria solani* a fungicidas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017. doi:10.11606/D.11.2017.tde-09082017-155800. Acesso em: 2019-11-19.
- OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicología**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. 704 p.
- OZKILINC, H.; ROTONDO, F.; PRYOR, B.M.; PEEVER, T.L. 2018. Contrasting species boundaries between sections *Alternaria* and *Porri* of the genus *Alternaria*. **Plant Pathology** **67**(2) : 303-314.
- PARIAUD, B.; RAVIGNE, V.; HALKETT, F.; GOYEAU, H.; CARLIER, J.; LANNOU, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. **Plant Pathology** **58**, 409-424.
- PATTERSON, C.L. 1991. Importance of chlamydospores as primary inoculum of *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight on tomato. **Plant disease** **75**, 274-278.
- PEIXOTO, C.C. **Caracterização molecular, morfológica e biológica do agente etiológico da pinta preta em solanáceas no Brasil**. 2015.89f. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2015.

- PEREIRA, A.S. Batata: fonte de alimento para a humanidade. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. contra-capas, 2008.
- PERES, N.A.R.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. *Plant Disease*, v.87, p.750, 2003.
- PRYOR, B. M.; BIGELOW, D. M. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia*, v. 95, n. 6, p. 1141-1154, 2003.
- RAMPERSAD, S. N. A Rapid Colorimetric Microtiter Bioassay to Evaluate Fungicide Sensitivity Among *Verticillium dahliae* Isolates. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 03, p. 248-255, 2011.
- RAPOSO, R. et al. Application of an Automated Quantitative Method to Determine Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 03, p. 294-296, 2015.
- REIS, E. M.; REIS, A. C.; FORCELINI, C. A. **Manual de fungicidas. Guia para o controle químico de doenças de plantas**. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, 2007. 153 p.
- RODRIGUES, T.T.M.S.; BERBEE, M.L.; SILVA, M.B.; QUEIROZ, M.V.; MIZUBUTI, E.S.G. Mudanças na população de *Alternaria* associada à pinta preta no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, p. 186, 2009. Suplemento.
- RODRIGUES, T.T.M.S.; et al. First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. **New Disease Reports**, v. 22, p. 28, 2010.
- RODRIGUES, T.; MIZUBUTI, E.S.G. Pinta preta: surge uma nova espécie. **Batata Show**, Itapetininga, v. 24, p. 14-16, ago. 2009.
- ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 411-433.
- ROTEM J, 1994. The genus *Alternaria*. Biology, epidemiology, and pathogenicity. **APS Press**, St.Paul.
- RUSSELL, P.E. A century of fungicide evolution. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 143, n. 01, p. 11–25, 2005.

- RUSSELL, P. E. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management.** 2004. 60f. FRAC, Cambridge, 2004.
- SANGER, F., et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463–5467, 1977.
- SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v.354, n. 02, p.311-313, 2006.
- SCHULLER, E.; HABERMEYER, J. First results from an *Alternaria solani* field trial in potatoes. **PPO-Special Report**; Lelystad, v. 8, p. 265-269, 2002.
- SHTIENBERG, D. *Alternaria* diseases of potatoes: epidemiology and management under Israeli conditions. In Schepers, H. T. A. M. PPO-Special Report no. 16. DLO Foundation. Wageningen, 2014. p. 169-180.
- SIMMONS, E.G. *Alternaria* themes and variations (151-223). **Mycotaxon**. 65:1-91. 1997
- SIMMONS EG, 2000. *Alternaria* themes and variations (244-286) species on Solanaceae. **Mycotaxon** **75**, 1-115.
- SIMMONS, E. **Alternaria: an identification manual.** Utrecht: CBS, 2007. 775 p. (CBS Biodiversity Series, 6)
- SIMMONS, E. G.; ROBERTS, R. G. (1993) *Alternaria* themes and variations (73). **Mycotaxon** 48: 109-140.
- SOUZA DIAS, J. A. C.; IAMAUTI, M. T.; FISCHER, I.H. Doenças da batateira. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia Vol 2: Doenças de plantas cultivadas.** 5.ed. Ouro Fino-MG: Ceres, 2016. p. 125-147.
- SPOELDER, J.; ELLENS, R.; TURKENSTEEN, L. Comparing pathogenicity of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* in potato. In Schepers, H. T. A. M. PPO-Special Report no. 16. DLO Foundation. Wageningen, 2014. p. 97-102.
- STAMMLER, G.; BÖHME, F.; PHILIPPI, J.; MIESSNER, S.; TEGGE, V. Pathogenicity of *Alternaria*-species on potatoes and tomatoes. In Schepers, H. T. A. M. PPO-Special Report no. 16. DLO Foundation. Wageningen, 2014. p. 85-96.

- STEVENSON, W.; KIRK, W.; ATALLAH, Z. K. Managing foliar disease: early blight, late blight and white mold. In: JOHNSON, D. A. (Ed.). **Potato health management**. APS: Saint Paul, 2008. p. 209-222.
- SUASSUNA, N. D.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. **Plant Pathology**, v. 53, n. 04, p. 405-413. 2004.
- TAHERI, A.S. et al. 2009. *Alternaria interrupta*, a new pathogen causing potato early blight in Iran. **Rostaniha** 10: 72-73.
- TAI, L.M. et al. 2012. Biological characteristics of different isolates of *Alternaria solani* isolated from potato in Heilongjiang province. **Plant Protection** 38, 85–9.
- TAYLOR, M. C. et al. Relative performance of five forecasting schemes for potato late blight (*Phytophthora infestans*) I. Accuracy of infection warnings and reduction of unnecessary, theoretical, fungicide applications. **Crop Protection**, v. 22, n. 02, p. 275-283, 2003.
- TÖFOLI, J.G. et al. Controle da requeima e pinta preta da batata por fungicidas: conceitos, evolução e uso integrado. **Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p.41-52, 2013b.
- TÖFOLI, J.G. et al. Requeima e pinta preta na cultura da batata: importância, características e manejo sustentável. **Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p.33-40, 2013a.
- TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J.T. *Alternaria* spp. emoleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.21-34, 2015.
- TÖFOLI, J. G. **Ação de fungicidas e indutores de resistência no controle da requeima e pinta preta na cultura da batata**. 2011. 176f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2011.
- TÖFOLI, J. G.; MELO, P. C. T.; DOMINGUES, R. J. Ação protetora, residual, curativa e anti esporulante de fungicidas no controle da requeima e da pinta preta da batata em condições controladas. **Biológico**, v. 79, n. 2, p. 209-221, 2012.
- TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J. Alternarioses em hortaliças: sintomas, etiologia e manejo integrado. **Biológico**, São Paulo, v. 66, n. 1/2, p. 23-33, 2004.

- TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; ZANOTTA, S. **Doenças fúngicas da batata**. In: SALAS, F.J.S.; TÖFOLI J.G. (Eds.). *Cultura da batata: pragas e doenças*. 1. ed. Instituto Biológico: São Paulo, 2017. 222 p.
- TÖFOLI, J.G.; MELO P.C. T.; DOMINGUES R.J.; FERRARI J.T. Controle da requeima e pinta preta da batata por fungicidas e seu reflexo sobre a produtividade e a qualidade de tubérculos. **Arq. Inst. Biol.**, v.83, p.1-12, e1172013, 2016.
- TYMON, L. S., PEEVER, T. L., JOHNSON, D. A. 2016. Identification and enumeration of small-spored *Alternaria* species associated with potato in US Northwest. *Plant Dis.* 100: 465-472
- SHARVELLE, E. G. *The nature and uses of modern fungicides*. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1961. 308 p.
- TORGESON, D. C. Determination and Measurement of Fungitoxicity. In: TORGESON, D. C. **Fungicides: An Advanced Treatise**, New York: Academic Press, v. 1, 1967. 742 p.
- VALENCIO, S. A. X. **Microtitulação colorimétrica para avaliar a sensibilidade de *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* spp. a fungicidas e caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp.** 2017. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.
- VAN DER WAALS, J.E.; KORSTEN, L.; SLIPPERS, B. 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease* 88: 959-964.
- VAN DER WAALS, J.E.; KORSTEN L.; AVELING T.A.S. A review of early blight of potato. **African Plant Protection**, Queenswood, v. 7, p. 91-102, 2001.
- VEGA, B. et al. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate Qoi sensitivity for *alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 09, p. 1262-1270, 2012.
- WALE, S.; PLATT, H.W.; CATTILIN, N. *Disease pests and disorders of potatoes*. Amsterdam: **Elsevier**, 2008. 179p.
- WALTERS, D.R. Induced resistance: destined to remain on the sidelines of crop protection. **Phytoparasitica**, Tel Aviv, v. 38, n..1, p. 1-4, 2010.
- WALTERS, D.R.; FOUNTAINE, J.M. 2009 Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions **Journal of Agricultural Science** 147, 523–535.

- .WATANABE, E. Y. **Produtividade de um clone de batata submetido às adubações mineral e orgânica.** 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de concentração: Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.
- WEICHEL, M. Nuclear transport factor 2 represents a novel cross-reactive fungal allergen. *Allergy*, v. 58, p. 198-206, 2003
- WHITE, T.J. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand Dh, Shinsky Jj, White TJ (eds), *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* **Academic Press**, San Diego, pp. 315-322.
- WOUDENBERG, J. H. C., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., de Vries, M., Stielow, J. B., Thomma, B. P. H. J., and Crous, P. W. 2015. *Alternata* section, *Alternaria*: species, formae speciales or pathotypes? *Stud. Mycol.* 82: 1-21.
- WOUDENBERG, J. et al. 2014. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentagled. **Studies in Mycology.** Volume 79, pages 1-47.
- WOUDENBERG, et al., ***Alternaria* redefined** *Studies in Mycology*, 75 (2013), pp. 171-212
- ZANOTTA, S. **Caracterização da população de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary em regiões produtoras de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Brasil.** 2019.124f. Tese (Doutorado). Instituto Biológico, São Paulo, SP, 2019.
- ZHANG, Z. et al. (2012). An R2R3 MYB transcription factor in wheat, TaPIMP1, mediates host resistance to *Bipolaris sorokiniana* and drought through regulation of defense- and stress-related genes. **New Phytol.** 196, 1155–1170. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04353.x
- ZHENG, H.H.; WU, X.H. 2013. First report of *Alternaria* blight of potato caused by *Alternaria tenuissima* in China. **Plant Disease** 97, 1246.