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

**Adaptabilidade de isolados de *Monilinia fructicola* com diferentes
níveis de sensibilidade à azoxistrobina**

Isabela Vescove Primiano

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

**Piracicaba
2015**

**Isabela Vescove Primiano
Engenheira Agrônoma**

Adaptabilidade de isolados de *Monilinia fructicola* com diferentes níveis de sensibilidade à azoxistrobina

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

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

**Piracicaba
2015**

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

Primiano, Isabela Vescove

Adaptabilidade de isolados de *Monilinia fructicola* com diferentes níveis de sensibilidade à azoxistrobina / Isabela Vescove Primiano. - - Piracicaba, 2015.
82 p. : il.

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

1. Podridão parda 2. Estrobilurina 3. Resistência a fungicida 4. *Prunus* I. Título

CDD 634.25
P953a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais, Eduardo e Edenílze,
que me educam, me orientam e me apoiam em todas as situações, principalmente,
incentivando a continuar a minha formação na área da pesquisa;*

*Aos meus irmãos e irmãs, Eduardo, Patrícia, João Vitor e Egiane,
que me apoiam e enriquecem os meus conhecimentos,*

*Aos meus sobrinhos, João Vitor, André Luiz e Laura,
que me enchem de alegrias e descontrações.*

Dedico.

*A Deus que sempre me mostra o caminho da Verdade e da Vida e
à Nossa Senhora que sempre cuida de nós como Seus filhos;*

*A todos que acreditam na pesquisa do Brasil e fazem
desta uma realidade.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora por estarem presentes na minha vida, sendo fonte de força, determinação e consolo.

À professora Dr^a Lilian Amorim pela orientação, baseada em amizade e confiança, pela disponibilidade e paciência, pelas oportunidades e pelos incentivos a extrair o máximo do meu potencial.

À professora Dra. Larissa May-de-Mio, da Universidade Federal do Paraná, pelas ideias inseridas no trabalho, pela disposição em ajudar e pelo suporte durante a realização dos meus experimentos.

À professora Dra. Natália Peres, da Universidade da Flórida, por ter me aceitado em seu laboratório, pela confiança depositada, pelos conhecimentos transmitidos, além de ter me acolhido tão bem durante a minha estadia.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido pela bolsa de estudos de mestrado nos meses iniciais e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos de mestrado (processo nº 13/20285-0) e pela bolsa de estágio no exterior (BEPE - processo nº 14/09472-5). Informo que as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas nesse documento são de minha responsabilidade, sem necessariamente refletir a opinião da FAPESP.

Ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP e a todos os professores pelos ensinamentos concedidos e por sempre se colocarem à disposição em auxiliar o desenvolvimento do projeto e a minha formação profissional.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP.

À Sílvia Lourenço e ao Luiz Ortiz pela amizade e carinho, pelos conselhos, pela prontidão em ajudar e auxílio constante e fundamental nos meus experimentos.

Ao Dr. Rafael Morales pelo envio dos isolados e transmissões de conhecimentos proporcionadas.

Ao Dr. Wagner Pereira pela amizade, paciência, conversas e ensinamentos iniciais na área molecular.

Ao produtor Daniel Juliato pela abertura e troca de informações práticas que propiciaram o aumento do meu aprendizado.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisa e Educação da Costa do Golfo (Gulf Coast Research and Education Center) da Universidade da Flórida, em especial aos do laboratório de Fitopatologia, sob coordenação da profa. Dra. Natália Peres. Teresa Seijo, muito obrigada pela paciência em ensinar os procedimentos das técnicas moleculares e pela confiança. Lorna Torcedo-Carter, muito obrigada pela acolhida na sua família, pelos ensinamentos cristãos e por sempre ter um abraço carinhoso. Thank you very much for all your support!

Aos amigos que fiz durante minha estadia na Flórida, Adrian Zuñiga, Bruna Forcellini, Frederick Aguiar, Jack Roach, Justin Carter, Rodrigo Borba Onofre e Tyler

Jacoby pela amizade construída, pelas colaborações e por terem proporcionados dias mais animados em Balm. Aos queridos amigos que reencontrei na Flórida, Michelle Oliveira (Qja) e Leandro Córdova (Rambo), pela amizade, pela acolhida e pelos momentos que compartilhamos.

A todos os meus colegas e amigos epidemiologistas, Josicléia Arruda, Luiz Rafael Pinto, Meyriele de Camargo, Ricardo Feliciano e Kelly Pazolini pelos momentos de descontração, pelas conversas e pelo companheirismo. Em especial, agradeço André Gama e Bárbara Navarro pela amizade e pelos auxílios nos experimentos; e Antônio Nogueira Júnior e Guilherme Frare que me acompanham desde a iniciação científica.

Às minhas queridas amigas Juliana Baggio e Maria Cândida Gasparoto pelas conversas, incentivos, auxílios e sempre acompanharem as minhas dificuldades nos diversos experimentos.

Ao amigo Juan Molina pela amizade construída, pelo conhecimento compartilhado, por sempre me incentivar a pensar e analisar além do senso comum e pelo grande auxílio estatístico. Muchas gracias, Juanchi!

Aos alunos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, Dalilla Rezende, Rafaela Roma, Simone Brand e Vitor Moura pela amizade e pelos momentos de descontração. Em especial, Thiago Anchieta, pela amizade, pelas conversas e risadas.

Às alunas e estagiárias que colaboraram na execução do meu trabalho, Bárbara Sentelhas, Taísi Sorrini e Giovana de Barros. Muito obrigada pela paciência nas atividades rotineiras.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP.

Aos meus amigos, Adriano Gazzola (Inka), Aline Fermino (k-staña), Natália Trombeta (Korneta), Renato Barbosa (Xamex), Rogério Pazim (Pah) e Thiago Oliveira (Piraña) pelos reencontros, pelas conversas e momentos que dividimos. Em especial, Paula Panosso (Paça) e Renan Alves (Skia) que eu tive a felicidade em continuar compartilhando ótimos momentos diários com vocês na pós graduação.

Às minhas queridas amigas, Bruna Morábito, Mariana Garrido, Malila Soranzo e Cláudia Resende (Biba), que não impediram que a distância fosse uma dificuldade em nossa amizade e sempre estiveram presentes e me apoiando.

Aos meus pais que sempre me ajudaram a manter o sorriso no rosto.

Ao meu namorado, companheiro e melhor amigo, Fábio, que sempre esteve ao meu lado e estimulou o meu desenvolvimento científico e pessoal, possibilitando novos conhecimentos e, também, por toda a sua paciência, compreensão, auxílio nos experimentos e carinho.

A todos os familiares que respeitaram, compreenderam e apoiaram as minhas escolhas e sempre tiveram uma palavra de conforto.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a minha formação e o desenvolvimento do meu trabalho.

Mais uma vez, a todos os meus sinceros agradecimentos.

*"Nada te perturbe,
nada te espante,
Tudo passa,
Deus não muda,
a paciência tudo alcança;
Quem a Deus tem
Nada lhe falta:
Só Deus basta."*

Santa Teresa d'Ávila

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 Revisão Bibliográfica	23
2.1.1 Podridão parda do pessegueiro	23
2.1.2 Controle da podridão parda do pessegueiro	25
2.1.3 Azoxistrobina	27
2.1.4 Mecanismos de resistência à azoxistrobina	29
2.1.5 Estudos de adaptabilidade e habilidade competitiva	30
2.2 Material e Métodos	32
2.2.1 Escolha dos isolados.....	32
2.2.2 Estudo da adaptabilidade e estabilidade dos isolados resistentes.....	35
2.2.2.1 Caracterização dos isolados resistentes e sensíveis	35
2.2.2.2 Estabilidade dos isolados resistentes.....	38
2.2.2.3 Metodologias para avaliação da habilidade competitiva de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> resistentes à azoxistrobina	40
2.2.2.3.1 Inoculação em pêssegos <i>in natura</i> e em pêssegos enlatados	40
2.2.2.3.2 Avaliação do número de unidades formadoras de colônia e da porcentagem de germinação de conídios.....	41
2.2.2.3.3 Análise estatística das metodologias de avaliação da habilidade competitiva de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> resistentes à azoxistrobina	43
2.2.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento.....	43
2.3 Resultados	45
2.3.1 Escolha dos isolados.....	45
2.3.2 Adaptabilidade e estabilidade dos isolados resistentes	46
2.3.2.1 Caracterização dos isolados resistentes e sensíveis	46
2.3.2.2 Estabilidade dos isolados resistentes.....	49
2.3.2.3 Habilidade competitiva de isolados de <i>Monilinia fructicola</i> resistentes à azoxistrobina	52

2.3.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	54
2.4 Discussão	59
3 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS.....	79

RESUMO

Adaptabilidade de isolados de *Monilinia fructicola* com diferentes níveis de sensibilidade à azoxistrobina

O controle da podridão parda do pessegueiro (*Monilinia fructicola*) é realizado essencialmente por aplicações preventivas de fungicidas, em sua maioria sistêmicos com modo de ação específico. O uso contínuo desses fungicidas pode levar à seleção de indivíduos resistentes ao ingrediente ativo e, conseqüentemente, à perda da eficiência do controle nos pomares. A evolução da população de isolados resistentes ao longo do tempo, na ausência do fungicida, pode ser prevista com estudos de habilidade competitiva entre isolados resistentes e sensíveis. Portanto, a quantificação da adaptabilidade (*fitness*) e da estabilidade, necessárias para caracterizar os isolados encontrados em campo, auxiliarão nas estratégias antirresistência. Embora a importância da determinação da adaptabilidade de isolados resistentes seja reconhecida, há poucos métodos descritos para a análise da habilidade competitiva. Assim, esse trabalho verificou a adaptabilidade, a estabilidade e a habilidade competitiva de isolados de *M. fructicola* com diferentes níveis de sensibilidade à azoxistrobina em experimentos *in vitro* e em frutos de pêssegos (*in natura* e enlatado) utilizando metodologias de avaliação diversas. A caracterização dos isolados foi realizada *in vitro*, *in vivo* e molecularmente. Foram avaliados o diâmetro da colônia e a esporulação *in vitro*; o período de incubação e de latência, a incidência e a severidade da doença e a esporulação *in vivo* dos isolados separadamente. Os dados de esporulação *in vitro* foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e os dados de crescimento micelial ao teste de Tukey com 5% de probabilidade. Para a análise dos dados *in vivo*, utilizou-se a análise multivariada. Dez transferências em meio de cultura sem fungicida foram realizadas para o estudo da estabilidade de dois isolados resistentes (SP08435 e SP09839) e um sensível (PR09638). A esporulação, a porcentagem de germinação de conídios e o diâmetro da colônia dos isolados em meio de cultura com fungicida foram avaliados em quatro transferências (inicial, terceira, sexta e última transferência). A habilidade competitiva foi verificada pela evolução da porcentagem de indivíduos resistentes no tempo entre um isolado resistente (SP09839) e um sensível à azoxistrobina (PR09638). Modelos lineares ou modelos lineares generalizados (GLM) foram utilizados para descrever o progresso da proporção do isolado resistente ao longo do tempo. Os isolados resistentes exibiram esporulação *in vitro* e taxa de crescimento micelial semelhantes aos sensíveis, além de apresentarem-se no mesmo grupo de similaridade que os isolados sensíveis. Nenhuma mutação no *cyt b* foi associada à resistência de *M. fructicola* à azoxistrobina (G143A, G137R, e F129L) e em todos os isolados foi observado o íntron antes do códon 143. Mesmo após 10 transferências em meio de cultura sem fungicida, os isolados resistentes à azoxistrobina não reduziram sua sensibilidade nem sua capacidade de esporulação e crescimento fora do pêssego. Independentemente da metodologia utilizada para avaliar a habilidade competitiva, a resistência à azoxistrobina não correspondeu a um custo adaptativo para *M. fructicola*, pois a proporção do isolado resistente manteve-se inalterada ao longo das transferências. O uso de pêssego enlatado é recomendado na substituição de frutos *in natura* para experimentos de habilidade competitiva.

Palavras-chave: Podridão parda; Estrobilurina; Resistência a fungicida; *Prunus*

ABSTRACT

Fitness of *Monilinia fructicola* isolates with different levels of sensitivity to azoxystrobin

Control of brown rot in peaches (caused by *Monilinia fructicola*) is mainly by preventive applications of fungicides, mostly single-target site. Repeated use of these fungicides can, however, select for resistant pathogen populations, which may result in failure of disease control. The evolution of resistant isolates in a population over time can be predicted with competitive ability assays between sensitive and resistant isolates. Therefore, studies quantifying pathogen fitness and stability are necessary to characterize field isolates and improve anti-resistant strategies. However, there are limited reports concerning the methodology used in competitive ability assays. This study determined the fitness of *M. fructicola* isolates with different levels of sensitivity to azoxystrobin in trials *in vitro* and *in vivo* (*in natura* and canned peaches) with different monocyclic components. Isolates characterization were carried out *in vitro*, *in vivo* and molecularly. Mycelial growth rate and sporulation were estimated *in vitro*, and disease incidence, severity, lesion sporulation, incubation and latent period were evaluated in peach fruit for sensitive and resistant isolates. Sporulation *in vitro* data were analyzed by Kruskal-Wallis test and mycelial growth rate with the Tukey test at 5% probability. For the *in vivo* experiments, multivariate analysis were carried out. Ten consecutive transfers on non-amended media were conducted to determine the stability of isolates (two resistant and one sensitive). Sporulation, percent spore germination and colony diameter on azoxystrobin amended media were also evaluated four times (the first, the third, the sixth and the last transfer). Competitive ability was investigated by testing the percentage increase of resistant individuals five generations after inoculation with a mix of azoxystrobin sensitive and resistant isolates. The competitive ability of sensitive and resistant isolates were compared with different variables as colony-forming unit and spore germination. Linear or generalized linear models (GLM) were adjusted to compare the progress of resistant isolates over time. All resistant isolates had *in vitro* sporulation and mycelial growth rate similar to sensitive isolates. All isolates sequenced presented an intron close to codon 143 and did not have any of the point mutations commonly associated with resistance to QoI fungicides (G143A, G137R, and F129L). After 10 transfers in PDA, colony diameter of resistant isolates was not reduced in azoxystrobin-amended media with 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ nor was their sporulation *in vitro*. For all parameters used to measure competitive ability, no fitness cost was associated to *M. fructicola* isolates resistant to azoxystrobin. Canned peach is a viable option for studies aiming to determine fitness cost of resistant isolates.

Keywords: Brown rot; Strobilurin; *Prunus*; Fungicide resistance

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo da podridão parda do pessegueiro, representando as diferentes fontes de inóculo e órgãos suscetíveis à infecção no período de floração à frutificação (adaptado de RITCHIE, 2000).....24
- Figura 2 - Etapas da montagem do experimento para a determinação da resistência prática de isolados de *Monilinia fructicola*: A - desinfestação dos frutos em hipoclorito de sódio a 0,5 %, B - secagem dos frutos, C - inoculação com gota de 40 µL depositada no fruto na região demarcada e D - câmara úmida.....35
- Figura 3 - Esquema do ensaio realizado para verificar a estabilidade da resistência de isolados de *Monilinia fructicola* na ausência do fungicida azoxistrobina, em que estão representadas as placas de Petri utilizadas nas dez transferências consecutivas para avaliação do diâmetro da colônia (T0 a T10). Placas de coloração mais escura representam meio de cultura com 1 µg.mL⁻¹ i.a e 100 µg.mL⁻¹ de SHAM e indicam o momento em que se avaliou a esporulação, germinação e crescimento micelial em meio com fungicida (1 µg.mL⁻¹ i.a e 100 µg.mL⁻¹ de SHAM).....39
- Figura 4 - Esquema das transferências consecutivas (T1-T5) utilizadas para o estudo de habilidade competitiva dos isolados de *Monilinia fructicola*; iniciando-se com metade da população resistente (R1) e metade sensível (S1). 'Pêssego' representa frutos *in natura* ou enlatados. Placas do lado direito representam experimentos em que foi avaliada a germinação dos conídios em meio com e sem fungicida. Placas do lado esquerdo representam experimentos em que foi avaliado número de unidades formadoras (UFC) em meio com e sem fungicida.....42
- Figura 5 - Diâmetro médio da colônia dos isolados de *Monilinia fructicola* avaliados diariamente (média de duas medidas perpendiculares da colônia) até o 10º dia (média dos 2 experimentos). Barras representam o erro padrão dos dados. Linhas de tendência de estilos diferentes representam taxas diferentes de acordo com o teste t-Student.....47
- Figura 6 - Gráfico de correlações entre a média das variáveis analisadas nos dois experimentos para caracterização *ex vivo* dos isolados de *Monilinia fructicola*. Correlações positivas são representadas pela cor azul (ou

inclinação para direita) e as negativas pela rosa (ou inclinação para esquerda). Os valores dos coeficientes estão representados pela intensidade das cores (de acordo com o gradiente superior) e também pelo achatamento da elipse. As variáveis estudadas foram: esporulação (Esporulacao), incidência final (Incidencia), diâmetro da lesão (Diametro_lesao), períodos de latência (Latencia) e de incubação (Incubacao) no sétimo dia.....48

Figura 7 - Biplot (A) e dendograma correspondente (B) da média dos experimentos *ex vivo* para caracterização dos isolados de *Monilinia fructicola*. O componente 1 é composto pelas variáveis: esporulação ("Esporulacao"), período de incubação ("Incubacao"), período de latência ("Latencia") e diâmetro da lesão ("Diametro_lesao") no sétimo dia. O componente 2 é composto pelas variáveis: incidência ("Incidencia") e diâmetro da lesão ("Diametro_lesao") no sétimo dia. S1, S2, S3 e S4 representam os isolados sensíveis PR09638, SP05160, SP06210 e SP09885, respectivamente. R1 e R2 representam os isolados resistentes SP08345 e SP09839, respectivamente.....49

Figura 8 - Taxa de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* ao longo das 10 transferências dos isolados PR09638 (A), SP08345 (B) e SP09839 (C). As barras representam o erro padrão.....50

Figura 9 - Proporção de conídios germinados (A, B e C), número de conídios produzidos (D, E e F) das suspensões obtidas de cada transferência avaliada e diâmetro micelial dos isolados de *Monilinia fructicola* em meio de cultura com $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de azoxistrobina e SHAM (G, H e I) dos isolados PR09638 (A, D e G), SP08345 (B, E e H) e SP09839 (C, F e I). As barras representam o erro padrão.....51

Figura 10 - Proporção de unidades formadoras de colônia resistentes de *Monilinia fructicola* obtidas de pêssego *in natura* (A) e proporção de esporos germinados de *M. fructicola* obtidos de pêssego *in natura* (B) e pêssego enlatado (C). As barras representam o intervalo de confiança com 95 % de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. A linha pontilhada representa o valor inicial de referência, obtido inicialmente com a mistura do isolado resistente com o sensível.....53

- Figura 11 - Diâmetro da lesão (cm) da podridão parda em frutos *in natura* no dia da transferência: (A) dados referem-se aos experimentos cujo método de avaliação da proporção de isolados resistentes foi o número de unidade formadoras de colônia e (B) dados referem-se aos experimentos cujo método de avaliação da proporção de isolados resistentes foi a proporção de esporos germinados. As barras representam o intervalo de confiança com 95 % de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.....54
- Figura 12 - PCR do códon 143 com par de primer laxaaxon3-fwd e laxaaxon4-rev específicos para *Monilinia laxa*. Controle é somente água e um isolado de *M. laxa* do Brasil foi utilizado como controle positivo.....55
- Figura 13 - (A) PCR dos códons 137 e 143 e íntron (1166 pb) de isolados de *Monilinia fructicola* com par de primers cola2-fwd e colaaxon4-ver e (B) PCR do códon 129 de isolados de *M. fructicola* com par de primers cola0-fwd e cola1-rev. Controle é somente água.....56
- Figura 14 - (A) Sequência do códon 129 do gene do citocromo b (*cyt b*) de *Monilinia fructicola* obtida pelo par de primers cola0-fwd e cola1-rev. Texto destacado em cinza indica parte do íntron (566 pb), setas indicam a posição da sequência do primer (5' - 3'), texto negrito e sublinhado indica o códon associado à resistência parcial (F129) às estrobilurinas. (B) Sequências parciais do nucleotídeo do *cyt b* de isolados resistentes e sensíveis de isolados representativos. O códon 129 está sublinhada e em negrito.....57
- Figura 15 - (A) Sequência dos códons 137 (G137), 143 (G143) e do íntron do gene do citocromo b (*cyt b*) de *Monilinia fructicola*. Texto destacado em cinza indica o íntron (1166 pb), setas indicam a posição da sequência do primer (5' - 3'), texto negrito e sublinhado indica o códon associado à resistência parcial (G137) ou total (G143) às estrobilurinas. (B) Sequências parciais do nucleotídeo do *cyt b* de isolados resistentes e sensíveis de isolados representativos. Os códons 137 e 143 estão sublinhadas e em negrito e parte do íntron está destacado em cinza.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtos registrados no Brasil para controle de <i>Monilinia fructicola</i> em pêssego.....	27
Tabela 2 - Isolados de <i>Monilinia fructicola</i> , fenótipo da resistência, origem (estado e país coletado) e ano de isolamento.....	33
Tabela 3 - Sequência, temperatura de anelamento, tempo de extensão e região amplificada de cada primer utilizado para caracterização molecular de isolados de <i>Monilinia fructicola</i>	44
Tabela 4 - Valor médio de sólidos solúveis (°Brix), firmeza (kgf) e ângulo Hue, obtido no dia da inoculação de <i>Monilinia fructicola</i> , dos frutos para escolha dos isolados.....	45
Tabela 5 - Viabilidade do inóculo de <i>Monilinia fructicola</i> e incidência da doença em frutos sem e com fungicida azoxistrobina no experimento de escolha dos isolados.....	46
Tabela 6 - Taxa de crescimento micelial, número de conídios produzidos <i>in vitro</i> e concentração efetiva capaz de inibir 50 % da germinação (CE ₅₀) dos isolados de <i>Monilinia fructicola</i>	46
Tabela 7 - Valores médios de sólidos solúveis (°Brix), firmeza (kgf) e ângulo Hue no dia da inoculação dos experimentos <i>ex vivo</i> para caracterização dos isolados de <i>Monilinia fructicola</i>	47
Tabela 8 - Valor médio de sólidos solúveis (°Brix), firmeza (kgf) e ângulo Hue, obtido no dia da inoculação de <i>Monilinia fructicola</i> nos frutos, para cada transferência cujo método de avaliação da proporção de isolados resistentes foi o número de unidade formadoras de colônia ou conídios germinados.....	52

1 INTRODUÇÃO

A podridão parda é a principal doença do pessegueiro no Brasil (MEDEIROS; RASEIRA, 1998; MARTINS et al., 2005) tanto pela frequência com que ocorre, como pelos danos que ocasiona (BASSETO, 2006). *Monilinia fructicola* é o principal agente causal desta doença no Brasil e proporciona elevado prejuízo a produtores de pêssego, atacadistas e varejistas (LIMA et al., 2009). As práticas de controle cultural, físico, genético e biológico, utilizadas isoladamente ou em conjunto, não são suficientes para controlar a doença, assim o uso de agrotóxicos se torna o meio mais efetivo entre os produtores para controlar essa e outras doenças que ocorrem nos pomares de pêssego (RANGEL; MASCARO, 2007). O uso de fungicidas é essencial ao seu controle, pois em pomares sem aplicação de agrotóxicos, foram determinadas incidências de 64 % a 98 % de podridão parda nos frutos na pré-colheita e 100 % na pós-colheita (EMERY; MICHAILIDES; SCHERM, 2000; KESKE; AMORIM; MAY-DE-MIO, 2011).

O controle químico é baseado em aplicações preventivas com fungicidas em elevada frequência, quando as condições são favoráveis. Na região de Paranapanema (SP), em média, são realizadas de 10 a 15 aplicações de fungicidas no total do ciclo da cultura (MAY-DE-MIO¹, informação pessoal). Apesar de diversos ingredientes ativos estarem registrados para o controle da podridão parda, os únicos fungicidas sistêmicos registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o seu controle pertencem ao grupo dos triazóis (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS - AGROFIT, 2015). No entanto, o ingrediente ativo azoxistrobina, que é muito utilizado entre os produtores para o controle da ferrugem (*Tranzschelia discolor*), também atua na prevenção da podridão parda e está na lista de agrotóxicos permitidos na Produção Integrada de Pêssego (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA - INMETRO, 2003). Em São Paulo, inclusive, já foi observada, uma mudança nos valores de CE₅₀ (concentração efetiva capaz de inibir 50 % do crescimento ou germinação da população patogênica) de *M. fructicola* à azoxistrobina, aumentando de 0,05 µg.ml⁻¹ em 2002 para 0,44 µg.ml⁻¹ em 2008 (MAY-DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011), provavelmente em razão do uso

¹ MAY-DE-MIO, L.L. Mensagem recebida por <isaprimiano@hotmail.com> em 05 set. 2013.

intensivo desse produto no controle de ferrugem. Essa mudança nos níveis de sensibilidade do patógeno é preocupante, porque pode inviabilizar o uso desse fungicida no futuro (GHINI; KIMATI, 2000).

Estudos de adaptabilidade (*fitness*) dos isolados resistentes na ausência do fungicida são fundamentais para estimar o risco da resistência prática e propor modelos para prever o desenvolvimento da resistência (GHINI; KIMATI, 2000; LEADBEATER, 2012), pois caso isolados resistentes apresentarem alta adaptabilidade em relação aos sensíveis, aqueles permanecerão no ambiente, dificultando a eficiência do fungicida e estratégias antirresistência deverão ser adotadas com maior rigor (GHINI; KIMATI, 2000). Por outro lado, o manejo da doença será mais fácil quando isolados resistentes apresentarem baixa competitividade em relação à população selvagem, decorrente da baixa adaptabilidade, diminuindo a sua população na ausência do fungicida (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007; LEADBEATER, 2012).

A avaliação da adaptabilidade dos isolados resistentes pode ser feita por meio de metodologias diversas em ensaios *in vitro* ou *in vivo*, analisando os isolados sensíveis e resistentes separadamente ou em mistura (PRINGLE; TAYLOR, 2002; KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2011). Como não há um método definido para avaliar a habilidade competitiva *ex vivo* de isolados de *Monilinia fructicola* com diferentes níveis de sensibilidade à azoxistrobina, metodologias necessitam ser testadas e desenvolvidas. Deve-se, por exemplo, comparar a utilização de frutos enlatados com o uso de frutos *in natura* e também determinar a melhor variável (esporulação, crescimento micelial, germinação, período de latência, severidade) que represente a habilidade competitiva do patógeno (LIM et al., 2001). Assim, esse trabalho buscou verificar a adaptabilidade, estabilidade e habilidade competitiva de isolados de *M. fructicola* com diferentes níveis de sensibilidade a azoxistrobina em experimentos *in vitro* e em frutos de pêssegos (*in natura* e enlatado) utilizando métodos diversos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Podridão parda do pessegueiro

A podridão parda do pessegueiro possui como agentes causais *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey, *M. laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey e *M. fructigena* Honey (OGAWA; ZEHR; BIGGS, 1995). Além do pêssego, esses fungos colonizam outros frutos de caroço, tais como, ameixa, nectarina, cereja, entre outros. A espécie *M. laxa* já foi detectada em pêssegos no Brasil (SOUZA et al., 2008), mas *M. fructicola* é considerada o principal agente causal desta doença, pois ocorre em maior frequência e causa danos mais significativos. Incidências de até 100% de podridão parda nos frutos já foram determinadas (EMERY; MICHAILIDES; SCHERM, 2000; KESKE; AMORIM; MAY-DE-MIO, 2011), ocasionando prejuízo aos produtores e demonstrando a necessidade do seu controle (LIMA et al., 2009). Diferentemente de *M. laxa*, que predomina em flores, *M. fructicola* infecta e causa sintomas em flores, ramos e frutos em pré e pós-colheita (OGAWA; ENGLISH; WILSON, 1954; OGAWA; MANJI; SCHREADER, 1975; RITCHIE, 2000).

O ciclo da doença, representado na Figura 1, mostra os diferentes órgãos que o patógeno pode infectar. Em regiões temperadas, ocorre a infecção primária nas flores que necessita de períodos de molhamento acima de 4 horas e temperatura favorável entre 22 e 26 °C (LUO; MORGAN; MICHAILIDES, 2001). Na flor, a infecção ocorre após o contato entre os esporos com qualquer uma das partes que estiver suscetível, sejam estigmas, estames, pétalas ou sépalas. O tecido infectado se torna escuro e a descoloração pode se estender pelo resto da flor, tornando-a necrótica. A partir da flor, o fungo pode avançar pelo ramo, desenvolver cancos nos ramos e até anelá-los. Como consequência, podem ocorrer murchas de outras flores, desprendendo-as da planta ou mantendo-as fixas por longo período. As flores infectadas no período úmido produzirão inóculo para infectar novos tecidos (BYRDE; WILLETTS, 1977). As infecções nos frutos podem iniciar-se em qualquer fase pré ou pós-colheita. No entanto, os sintomas usualmente são observados em frutos em estádios mais avançados de maturação, pois elevadas concentrações de compostos fenólicos presentes nos frutos em estádios menos avançados de maturação podem

inibir a penetração do fungo no fruto. Com a maturação, as concentrações desses compostos são reduzidas naturalmente e o fungo penetra e coloniza o fruto (BOSTOCK et al., 1999). Os sintomas nos frutos iniciam-se em uma lesão pequena, superficial e circular, amarronzada, que gradualmente aumenta de tamanho. Posteriormente, a lesão fica recoberta de massa pulverulenta de esporos, conferindo o aspecto característico da doença (MARTINS et al., 2005). Frutos não colhidos podem desidratar e mumificar, permanecendo na planta ou no solo e tornando-se fonte de inóculo para a próxima safra (BYRDE; WILLETTS, 1977).

A suscetibilidade dos frutos à infecção varia com os estádios de desenvolvimento: suscetíveis do início do desenvolvimento até o endurecimento do endocarpo, resistentes do endurecimento do endocarpo até o desenvolvimento embrionário e novamente suscetíveis até o final do ciclo (LUO; MICHAILIDES, 2001; MAY-DE MIO et al., 2008). Apesar dos frutos em estádios menos avançados de maturação serem mais resistentes ao patógeno, ferimentos de origem diversa, por exemplo, pássaros ou insetos que raspam a epiderme, aumentam a eficiência de infecção do fungo nesses frutos (TATE; OGAWA, 1975; EMERY; MICHAILIDES; SCHERM, 2000; BOTTON; BAVARESCO; GARCIA, 2003).

Figura 1 – Ciclo da podridão parda do pessegueiro, representando as diferentes fontes de inóculo e órgãos suscetíveis à infecção no período de floração à frutificação (adaptado de RITCHIE, 2000)

2.1.2 Controle da podridão parda do pessegueiro

Para o controle dessa doença, os métodos cultural, físico e químico são recomendados, com o objetivo de eliminar as fontes de inóculo e evitar a infecção (BLEICHER, 1997). Como práticas culturais, há recomendações na pré e pós-colheita: na pré-colheita recomendam-se as práticas de poda de limpeza ou de outono no período de dormência da planta, retirando-se ramos infectados e frutos mumificados; poda verde no período de vegetação para aumentar a aeração e a luz dentro da planta, cobertura do solo, nutrição equilibrada da planta e raleio dos frutos; na pós-colheita recomendam-se evitar a manipulação simultânea de frutos infectados e sadios, eliminar frutos infectados, desinfestar os recipientes e os equipamentos utilizados na classificação e no armazenamento dos frutos (MEDEIROS; RASEIRA, 1998; EMBRAPA, 2003).

A refrigeração é considerada o método mais importante e eficiente do controle físico, com o objetivo de manter a qualidade dos frutos, pois atrasa sua senescência e o desenvolvimento das podridões. Apesar de ser vantajosa, é pouco utilizada pelos produtores do Estado de São Paulo e, caso não seja bem controlada, pode causar danos pelo frio (*chilling injury*), na forma de lanosidade (polpa seca) e escurecimento interno (EMBRAPA, 2003). O uso de sanificantes, como cloreto de benzalcônio, biomassa cítrica e ozônio no controle pós-colheita da podridão parda do pessegueiro nem sempre é eficiente. O cloreto de benzalcônio e a biomassa cítrica controlam a podridão parda de forma preventiva, mas nenhum produto ou o ozônio controlam a doença de forma curativa (ABREU et al., 2008). Em associação a temperaturas baixas, a exposição contínua dos frutos ao ozônio inibe o crescimento micelial e a esporulação de *Monilinia fructicola* (PALOU et al., 2002). Apesar de existirem estudos mostrando a eficácia da integração de atmosfera modificada ou controlada (1,5% de oxigênio e 5% de gás carbônico) com refrigeração no controle da doença, o método não vem sendo empregado, pois há necessidade de investir em material para embalagem e mão de obra (EMBRAPA, 2003). Além do uso de embalagens (sacos de polietileno, por exemplo), a técnica de atmosfera modificada pode ser implantada com o uso de ceras, pois elas alteram a atmosfera ao redor dos frutos. As ceras também apresentam efeito protetor, devido à película que se forma ao redor dos frutos, atuando como barreira física. Particularmente, a cera de

carnaúba reduz a incidência de podridão parda, devido ao seu controle físico e químico, impedindo a germinação dos esporos (GONÇALVES et al., 2010).

Há pesquisas relacionadas com controle genético, mas não existe disponível material comercial resistente a essa doença. Somente há materiais como fonte de resistência à podridão parda nos frutos (WAGNER JÚNIOR et al., 2008). Acredita-se que os mecanismos que conferem resistência podem ser diferentes entre flores e frutos e fatores ambientais podem interferir na característica de resistência nos frutos, dificultando a obtenção de um material resistente e com características comerciais desejáveis (WAGNER JÚNIOR et al., 2008; SANTOS; RASEIRA; ZANANDREA, 2012).

Com o empenho em diminuir o uso de agrotóxicos, decorrente das exigências do mercado consumidor, também há interesse em utilizar o controle biológico no manejo integrado da podridão parda do pessegueiro, mas há dificuldades, pois alguns agentes de biocontrole apresentam eficiência *in vitro*, mas não *in vivo*. O uso de agentes biológicos é dificultado, pois além de depender de um bom antagonista e de práticas adequadas ao manejo da planta, depende também das condições climáticas durante o ciclo produtivo da cultura submetido ao tratamento (SPERANDIO, 2012).

Apesar de diversas medidas de controle serem recomendadas, o controle químico é o meio mais efetivo, prático e usual entre os produtores para controlar essa doença (RANGEL; MASCARO, 2007). O uso de agrotóxicos é recomendado nas fases críticas da cultura (florescimento e pré-colheita), mas o monitoramento constante do pomar e a eliminação de focos de infecção se estendem por todo o ciclo em conjunto com o controle das pragas que ocasionam ferimentos nos frutos (MEDEIROS; RASEIRA, 1998). No período de dormência, recomenda-se o tratamento químico de inverno de natureza erradicante, realizado após as práticas culturais (por exemplo, poda de inverno), com produtos a base de cobre, como oxicloreto de cobre, óxido cuproso, ou produtos a base de enxofre (AGROFIT, 2015).

Os tratamentos realizados na floração dependem das condições de umidade, ou seja, em períodos secos recomenda-se uma aplicação em plena floração, mas em períodos chuvosos, devem-se realizar três aplicações: no início da floração, na floração e na queda das sépalas (MEDEIROS; RASEIRA, 1998). O uso de produtos registrados para o controle de *Monilinia fructicola* em pessegueiro (Tabela 1) e o respeito aos prazos de carência são fundamentais para a produção de frutos dentro

das normas da Produção Integrada de Frutas (PIF) (FONTES; OSORIO, 2003). Para a produção de pêssego no Brasil, há o programa de Produção Integrada de Pêssego (PIP) que visa diminuir o uso de agrotóxicos, minimizar perdas pré e pós-colheita, manejar o solo reduzindo impactos ambientais e oferecer frutas de qualidade que possam manter a competitividade com oferta de frutas certificadas e rastreadas (FACHINELLO et al., 2003). Esse programa vem sendo seguido por alguns produtores no Paraná, mas não em São Paulo.

Tabela 1 - Produtos registrados no Brasil para controle de *Monilinia fructicola* em pêssego

Grupo Químico	Ingrediente Ativo	Produtos Registrados (n°)
Fenilpiridinilamina	Fluazinam	5
Quinona	Ditianona	1
Ditiocarbamato	Mancozebe	3
Guanidina	Iminoctadina	1
Guanidina	Dodina	1
Dicarboximida	Captana	2
Dicarboximida	Iprodiona	2
Dicarboximida	Procimidona	2
Dicarboximida	Folpete	1
Cloroaromático	Diclorana	1
Inorgânico	Óxido cuproso	2
Inorgânico	Enxofre	4
Inorgânico	Oxicloreto de cobre	1
Análogo de triazol	Triforina	1
Triazol	Difenoconazol	1
Triazol	Fluquinconazol	1
Triazol	Tebuconazol	5

Fonte: AGROFIT (2015)

2.1.3 Azoxistrobina

A classe dos inibidores da quinona oxidase (Qol) engloba os grupos químicos que apresentam o mesmo modo de ação: estrobilurinas, famoxadona, fenamidona e pyribencarb (LEADBEATER, 2012). A azoxistrobina pertence ao grupo químico das estrobilurinas, juntamente com outras moléculas, como piraclostrobina,

trifloxistrobina e cresoxim-metílico e possui como modo de ação a inibição da respiração dos fungos, especificamente ligando-se ao sítio da quinona oxidase do citocromo b (complexo III) e inibindo o transporte de elétrons na mitocôndria (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010; LEADBEATER, 2012). A etapa de germinação dos esporos é o estágio de desenvolvimento do fungo com maior sensibilidade às estrobilurinas (OLIVER; HEWITT, 2014).

As estrobilurinas possuem importância no manejo integrado, devido ao seu modo de ação, longa duração de ação, amplo espectro de ação, alta fungitoxicidade inerente e grande tolerância ambiental (SAUTER; STEGLICH; ANKE, 1999). O uso desses produtos em mistura ou em alternância com outros fungicidas sistêmicos de diferentes modos de ação é indicado como estratégia antirresistência (LEADBEATER, 2012).

Esse grupo de fungicidas foi amplamente empregado no controle de doenças de cucurbitáceas no Japão (ISHII et al., 2001) e de macieiras na Europa (ZHENG; OLAYA; KOLLER, 2000). No entanto, logo após a introdução desses fungicidas nessas culturas, foram relatados casos de resistência (ZHENG; OLAYA; KOLLER, 2000; ISHII et al., 2001). Desde então, há relatos de resistência de campo a estrobilurinas em mais de 35 patógenos em diversas culturas e países, como em *Pyricularia grisea* e *Botrytis cinerea* nos Estados Unidos (KIM et al., 2003; FRAC, 2012; AMIRI et al., 2014), *Venturia inaequalis* na Suíça (FARBER; CHIN; LEADBITTER, 2002) e *Plasmopara viticola* na França e Itália (GENET; JAWORSKA; DEPARIS, 2006).

Atualmente, verifica-se no Brasil uma intensificação na utilização de estrobilurinas na cultura do pessegueiro. A preferência por azoxistrobina provavelmente deve-se à disponibilidade do produto no mercado e na região de produção e conhecimento dos produtores, pois esse ingrediente ativo é registrado para controle da ferrugem (*T. discolor*) e é amplamente disponível em revendas e agropecuárias. Provavelmente, como consequência do uso intensivo de estrobilurinas no Estado de São Paulo, já existe relato de elevação de CE₅₀ de isolados de *M. fructicola* à azoxistrobina (MAY-DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011).

2.1.4 Mecanismos de resistência à azoxistrobina

O risco de seleção de populações resistentes está relacionado com características do fungicida, como, por exemplo, modo de ação específico e alta persistência da atividade, e características do patógeno, como alta variabilidade genética, curto tempo de geração e alta adaptabilidade dos isolados resistentes (LEADBEATER, 2012). A resistência de patógenos a fungicidas é geneticamente governada, podendo ser mono ou poligênica. No caso das estrobilurinas, a maior parte dos relatos indica ser monogênica (SIEROTZKI; WULLSCHLEGER; GISI, 2000; GISI et al., 2002; BOLTON; RIVERA; SECOR, 2013). As mutações em um único ponto no gene do citocromo b (*cyt b*) são os mecanismos mais associados com a resistência às estrobilurinas. A mutação que resulta em maior fator de resistência (completa) corresponde à mudança de glicina para alanina no códon 143 (G143A). Essa mutação não produz efeito negativo na atividade enzimática e, conseqüentemente, na adaptabilidade dos isolados (GISI et al., 2002; LEADBEATER, 2012). Outras substituições, como a fenilalanina para leucina no códon 129 (F129L) e de glicina para arginina no códon 137 (G137R), são relatadas no *cyt b*, mas expressam moderada (parcial) resistência, de tal forma que os patógenos com este tipo de mutação são controlados com as doses de estrobilurina recomendadas (FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

Além das mutações há outros mecanismos associados à resistência as estrobilurinas, como via alternativa de respiração e efluxo do fungicida, entre outros que necessitam de mais estudos, principalmente em patógenos que possuem o íntron tipo I, imediatamente após o códon 143 no *cyt b*. Nesses patógenos, a substituição do nucleotídeo no códon 143 impede que ocorra o *splicing* do íntron. Como consequência, ocorre deficiência no processo de síntese de proteína, a qual é letal ao fungo e a resistência não se desenvolve (FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2008). Este íntron já foi relatado em diversos fungos, como basidiomicetos (GRASSO et al., 2006), *Phyllosticta spp.* (STAMMLER et al., 2013) e também em *Monilinia fructicola* (LUO et al., 2010; MIESSNER; STAMMLER, 2010).

2.1.5 Estudos de adaptabilidade e habilidade competitiva

Relatos de ocorrência de populações patogênicas resistentes a fungicida, de modo geral, limitam-se à quantificação do CE_{50} dos isolados resistentes e sua comparação com o CE_{50} dos isolados sensíveis (YOUNG et al., 2010; FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2014; HINCAPIE et al., 2014). No entanto, para estimar a possibilidade da manutenção de populações resistentes no campo e sua implicação no controle de doença, há necessidade de verificar a preservação, a adaptabilidade *in vitro* e *in vivo* e a habilidade competitiva dos isolados na ausência do fungicida. A preservação dos isolados é importante para a realização de estudos de resistência, no qual o número de transferências e o período de armazenamento devem ser considerados. Há relatos de instabilidade da resistência após armazenamento do patógeno. Por exemplo, isolados de *Monilinia fructicola* resistentes ao propiconazol apresentaram aumento na sensibilidade ao fungicida após transferências consecutivas *in vitro* e armazenamento em diferentes formas, como glicerol, papel filtro, óleo mineral e sílica gel em baixa ou ultrabaixa temperatura (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007; ZHU; BRYSON; SCHNABEL, 2012). Nesse caso, a resistência do isolado ao fungicida é uma característica que não se preserva ao longo do tempo de armazenamento. A adaptabilidade de um isolado resistente é sempre comparativa à de isolados selvagens e consiste na capacidade do patógeno se desenvolver (como por exemplo, capacidade de infecção e velocidade de colonização dos tecidos do hospedeiro), reproduzir (por exemplo, capacidade de esporulação) e sobreviver no ambiente, na ausência do fungicida (GHINI; KIMATI, 2000). Caso os isolados resistentes possuam uma menor adaptabilidade que os sensíveis, a estabilidade da resistência e sua seleção em uma população serão reduzidas (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007; LEADBEATER, 2012), facilitando o manejo da doença com estratégias antirresistência. Por outro lado, se isolados resistentes apresentarem alta adaptabilidade em relação aos sensíveis, o uso do fungicida é ameaçado e diferentes estratégias antirresistência devem ser adotadas. Isolados de *M. fructicola* resistentes a propiconazol apresentaram aumento da sensibilidade ao fungicida, após transferências consecutivas *in vitro*, apesar de terem demonstrado a mesma adaptabilidade dos isolados sensíveis (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007); enquanto que isolados resistentes de *Magnaporthe grisea* e de *Didymella bryoniae* à azoxistrobina apresentaram resistência estável

durante quatro ciclos consecutivos da doença, na ausência do fungicida (AVILA-ADAME; KOLLER, 2003a; FINGER; STEVENSON; JI, 2013). Os estudos *in vivo* são importantes, pois há casos em que os isolados resistentes e sensíveis apresentam a mesma adaptabilidade *in vitro*, mas exibem diferenças *in vivo*, como isolados resistentes de *Penicillium expansum* a tiabendazol que apresentaram maior severidade de infecção nos frutos do que os sensíveis, apesar de possuírem o mesmo crescimento *in vitro* (BARALDI et al., 2003).

Outras informações sobre adaptabilidade podem ser fornecidas com testes de competição entre as linhagens resistentes e sensíveis, pois isolados que apresentam maior taxa de crescimento ou maior reprodução não necessariamente serão mais competitivos em relação aos outros (ZHAN; McDONALD, 2013). Em muitos casos, os isolados resistentes a um determinado agrotóxico são incapazes de competir com isolados sensíveis se houver redução ou ausência das aplicações do produto, ou seja, diminuir a pressão de seleção como estratégia antirresistência (OLIVER; HEWITT, 2014). A menor habilidade competitiva do fungo resistente, na ausência do fungicida, já foi verificada em misturas de isolados resistentes com sensíveis de *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* a triadimefon e em diferentes misturas entre um isolado resistente e um isolado sensível de *M. fructicola* à dicarboximida, sugerindo uma desvantagem associada com a resistência (ALMUGHRABI; GRAY, 1995; TAEHEON et al., 2001).

A adaptabilidade de isolados resistentes em relação a sensíveis pode ser avaliada por meio de métodos aplicados *in vitro* ou *in vivo* em cada isolado separadamente. Um conjunto de diferentes variáveis pode ser utilizado para medir a adaptabilidade, como, por exemplo, a taxa do crescimento micelial, a esporulação, a germinação, a sensibilidade osmótica, o período de latência, a incidência e o diâmetro da lesão (BARALDI et al., 2003; LUO; SCHNABEL, 2008a; KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2011). Outra forma de avaliar a adaptabilidade entre esses isolados é verificando a competição entre eles, ou seja, misturando-os em proporções conhecidas e avaliando o comportamento resultante ao longo do tempo (PRINGLE; TAYLOR, 2002; MA; UDDIN, 2009; KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2011). Os estudos de habilidade competitiva entre isolados resistentes e sensíveis ao longo do tempo, em diferentes gerações do patógeno, devem ser realizados em condições com a menor heterogeneidade possível, por exemplo, ambiente com temperatura e umidade

controladas, idade do inóculo semelhante e uso do mesmo cultivar. A mudança do cultivar entre uma geração e outra pode influenciar o resultado da competição entre os isolados (ZHAN; McDONALD, 2013). Ao utilizar o mesmo cultivar, o estado fisiológico da planta ou do fruto também pode influenciar no resultado, assim, uma alternativa é ao invés de utilizar o fruto *in natura*, realizar o experimento no fruto processado, por exemplo em pêssego enlatado (LIM et al., 2001; COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007; PARIAUD et al., 2009). Do ponto de vista prático, o uso de frutos processados é vantajoso, pois permite que experimentos sejam conduzidos em qualquer época do ano, uma vez que a maioria das culturas frutíferas tem sua safra limitada a apenas alguns meses.

Apesar dos experimentos de habilidade competitiva fornecerem informações que auxiliarão em estratégias antirresistência, os métodos de avaliação são limitados a um curto período de tempo e, de modo geral, obtidos em ambiente controlado. A competição em condições de campo, apesar de relevante, é pouco utilizada. Há poucos estudos de análise espaço-temporal e de persistência na safra e na entressafra dos isolados resistentes e há necessidade de se desenvolverem avaliações mais precisas (ELMER; GAUNT; FRAMPTON, 1998; ZHAN; McDONALD, 2013).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Escolha dos isolados

Oito isolados de *Monilinia fructicola*, oriundos da coleção da Universidade Federal do Paraná (UFPR) classificados em sensíveis e resistentes à azoxistrobina, foram selecionados para este estudo (Tabela 2). O critério de diferenciação estabelecido pela UFPR foi sua capacidade de germinação em meio de cultura ágar-água (AA) com $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de azoxistrobina (MAY-DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011). Foram considerados resistentes os isolados que apresentaram níveis de germinação iguais ou superiores a 50 %.

Tabela 2 - Isolados de *Monilinia fructicola*, fenótipo da resistência, origem (estado e país coletado) e ano de isolamento

Isolado	Fenótipo da resistência¹	Origem (estado, país)	Ano de isolamento
SP05160	sensível	São Paulo, BR	2005
SP06210	sensível	São Paulo, BR	2006
PR09638	sensível	Paraná, BR	2009
PR1131	sensível	Paraná, BR	2011
SP08345	resistente	São Paulo, BR	2008
SP09885	resistente	São Paulo, BR	2009
SP09839	resistente	São Paulo, BR	2009
SP09834	resistente	São Paulo, BR	2009

¹ "Resistente" são isolados que apresentaram níveis de germinação iguais ou superiores a 50% em meio de cultura ágar-água (AA) com 1 µg.ml⁻¹ de azoxistrobina e 100 µl.ml⁻¹ de SHAM

Para os oito isolados selecionados, determinou-se a resistência prática, que representa a falha no controle da doença em condições de campo (GHINI; KIMATI, 2000). Assim, sob condições assépticas no Laboratório de Epidemiologia e Pós-Colheita do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), os isolados foram inoculados em frutos de pêssego maduros tratados e não tratados com azoxistrobina. Os frutos foram desinfestados, por meio de imersão em uma solução de 0,5% de hipoclorito de sódio por 1 minuto e, posteriormente, foram imersos três vezes em água destilada e dispostos em ambiente para secar a fim de remover o excesso de água na superfície (Figura 2A e 2B). Após a secagem dos frutos, estes foram imersos por 1 minuto em água ou solução de fungicida Amistar[®] na dose de 10 g de azoxistrobina por 100L de água. Essa dose corresponde à dose recomendada na PIP (INMETRO, 2003).

Cor, firmeza e teor de sólidos solúveis foram avaliados no dia da inoculação em 10 frutos (repetições) para caracterizar o estágio de maturação dos mesmos. Para análise da cor e firmeza, foi utilizada a média de duas leituras realizadas em cada fruto (faces opostas), enquanto que para análise do teor de sólidos solúveis (° Brix) somente uma leitura foi realizada por fruto, proveniente da trituração do mesmo. A leitura da cor da casca resultou em três parâmetros (L*, a* e b*) determinados por colorímetro portátil Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta) que foram convertidos

em ângulo Hue (ângulo de cor) (ZHANG et al., 2008). A leitura da firmeza foi obtida nas regiões equatoriais sem a presença da casca com o penetrômetro PTR-100 (Instrutherm) de ponteira de 7,9 mm. Foi utilizado o refratômetro digital Pocket PAL-1 (Atago) para determinar o teor de sólidos solúveis.

A inoculação nos frutos ocorreu 24 h após a aplicação dos tratamentos, na qual suspensões de conídios dos isolados foram ajustadas, com auxílio de hemocitômetro, para a concentração de 2×10^5 conídios.mL⁻¹ em água esterilizada. Uma gota de 40 µL foi depositada por fruto na região equatorial, sendo feito um círculo com caneta para identificar o local da inoculação (Figura 2C). Após a inoculação, os frutos foram mantidos em câmara úmida por 24 horas, com o auxílio de um umidificador de ar (Figura 2D) e o experimento foi conduzido a 22°C com fotoperíodo de 12 h. A incidência (número de frutos doentes) foi avaliada no 7º dia após a inoculação. Foram utilizados 10 frutos por tratamento, no qual cada fruto foi considerado uma repetição.

Juntamente com os experimentos, foi realizado o teste de viabilidade da germinação dos conídios em placas de poliestireno. Nove alíquotas de 40 µL do inóculo foram depositadas em três placas de poliestireno, totalizando três gotas de 40 µL por placa. As placas foram mantidas em umidade relativa 100%, dentro de caixa tipo gerbox contendo papel filtro umedecido com água destilada, e os gerboxes armazenados em câmaras de crescimento (B.O.D.) a 22°C, no escuro. Avaliou-se a porcentagem da germinação dos conídios em cada placa, por meio da contagem de 100 conídios por gota, utilizando microscópio óptico (aumento de 400 x). Foram considerados germinados os conídios que apresentaram tubo germinativo de comprimento pelo menos 1,5 vezes o comprimento do conídio. A média da porcentagem de germinação das três gotas representou uma repetição e o delineamento foi inteiramente casualizado. O experimento foi repetido uma vez.

Figura 2 - Etapas da montagem do experimento para a determinação da resistência prática de isolados de *Monilinia fructicola*: A - desinfestação dos frutos em hipoclorito de sódio a 0,5 %, B - secagem dos frutos, C - inoculação com gota de 40 μL depositada no fruto na região demarcada e D - câmara úmida

2.2.2 Estudo da adaptabilidade e estabilidade dos isolados resistentes

2.2.2.1 Caracterização dos isolados resistentes e sensíveis

Dos oito isolados originalmente testados, dois foram descartados por baixa virulência. Determinou-se a CE_{50} dos seis isolados remanescentes por meio da germinação de conídios no meio de cultura ágar-água (AA). As suspensões de cada isolado foram obtidas de colônias monospóricas crescidas em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por dez dias a 22°C , no escuro e ajustadas para a concentração de 10^5 conídios. mL^{-1} em água esterilizada. O experimento foi realizado de forma semelhante ao teste de viabilidade da germinação dos conídios em placa de poliestireno descrito em 2.2.1. Neste caso, ao invés das gotas serem depositadas diretamente no poliestireno, estas foram depositadas em meio de cultura contendo as seguintes concentrações da azoxistrobina: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em todos os meios de cultura foi adicionado 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido salicilhidroxâmico (SHAM). O SHAM (Sigma-Aldrich) e o ingrediente ativo azoxistrobina foram adicionados ao meio ágar-água autoclavado e resfriado a 45°C .

O SHAM foi dissolvido em metanol e sua concentração foi ajustada para 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a fim de suprimir o uso da via alternativa de respiração fúngica (via AOX). Nesta concentração, ele não interfere diretamente na germinação de conídios ou crescimento micelial de *Monilinia fructicola* (SCHNABEL; DAÍ; PARADKAR, 2003). As placas foram incubadas em B.O.D. a 22°C no escuro por 18 horas. Após esse período, a germinação foi paralisada com lactoglicerol.

Os dados da sensibilidade ao fungicida (CE_{50}) foram analisados no programa R versão 3.2.1 (R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2014) e o modelo foi ajustado para cada isolado por meio do modelo de regressão logística com função de ligação PROBIT. Para cada experimento de CE_{50} foi calculada a inibição da germinação (Eq. 1). O valor de CE_{50} para cada isolado foi resultado da média dos valores de CE_{50} de cada experimento.

$$\text{IG} = 1 - \left(\frac{\text{G}_{ji}}{\text{G}_{\text{max}}} \right) \quad (1)$$

em que: **IG** é a proporção da inibição da germinação; **G_{ji}** é a proporção da germinação na j-ésima dose do fungicida (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 ou 3,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e na i-ésima repetição (1, 2 ou 3) e **G_{max}** é a proporção da germinação máxima observada do isolado na ausência do fungicida.

Para a caracterização dos isolados, dois isolados resistentes foram comparados com quatro isolados sensíveis *in vitro* e *ex vivo*. Para os experimentos *in vitro*, discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram obtidos de colônias monospóricas (crescidas em meio batata-dextrose-ágar por 10 dias a 22°C, no escuro) de cada isolado de *Monilinia fructicola* e repicados para o centro de 10 placas de poliestireno contendo BDA. As placas foram incubadas por 10 dias em B.O.D. a 22°C no escuro e foram dispostas de forma inteiramente casualizada. A avaliação foi realizada por meio da média de duas medidas perpendiculares do tamanho da colônia, obtidas diariamente. Ao término da avaliação, estimou-se a esporulação e discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados a 1 cm do centro da placa e colocados em tubos com 5 mL de água esterilizada com 1% de tween. Os tubos foram agitados por 30 s em vortex e 2 gotas de lactoglicerol por tubo foram adicionadas para paralisar o desenvolvimento do fungo. A concentração dos conídios foi estimada pela média de três contagens em hemocitômetro. Este

experimento foi realizado duas vezes. A taxa do crescimento micelial foi determinada por meio de regressão linear simples entre o diâmetro da colônia e o tempo, com dados agrupados dos dois experimentos, realizada no programa Excel®. Os coeficientes das regressões de cada isolado foram comparados pelo teste t. No programa R versão 3.2.1 (R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2014), os dados de esporulação foram analisados de forma não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis, pois não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$, segundo teste de Shapiro-Wilk).

Para as avaliações *ex vivo*, frutos de pêssego previamente desinfestados, como descrito anteriormente (item 2.2.1), foram inoculados com 40 μL de uma suspensão com concentração de 2×10^5 conídios. mL^{-1} em água esterilizada, depositada por fruto na região equatorial e mantidos a 22°C, em câmara úmida por 24 horas. Em todos os experimentos *ex vivo* foi realizado o teste de viabilidade da germinação dos conídios e as análises físico-químicas (cor, firmeza e teor de sólidos solúveis), como descritos em 2.2.1. Avaliou-se o período de incubação (período de tempo entre a inoculação até o aparecimento do sintoma em 50% dos frutos), o período de latência (período de tempo entre a inoculação até a esporulação das lesões em 50% dos frutos), a incidência da doença (proporção de frutos doentes), a severidade da doença (diâmetro da lesão) e a esporulação.

A incidência e a severidade da doença foram avaliadas diariamente por 7 a 15 dias, ou até o período de latência, e a esporulação foi quantificada da mesma forma descrita no ensaio *in vitro*. Foram utilizadas 10 repetições por isolado e cada fruto foi considerado como uma repetição com delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi repetido.

Devido à multiplicidade das variáveis estudadas *ex vivo* para caracterização dos isolados e às múltiplas interações que ocorrem entre elas, os dados foram analisados por meio de técnicas multivariadas no programa R versão 3.2.1 (R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2014). As variáveis utilizadas foram esporulação, incidência final da doença, tamanho da lesão no sétimo dia e períodos de latência e de incubação. Primeiramente e devido a diferente escala das variáveis, os dados foram padronizados (Eq. 2).

$$z_i = \frac{(x_i - m_i)^2}{\sigma} \quad (2)$$

em que: $\mathbf{z}$ representa as observações padronizadas da i -ésima variável; $\mathbf{x}_i$ são dados original da i -ésima variável; $\mathbf{m}_i$ é a média da i -ésima variável e σ é o desvio padrão da i -ésima variável.

Estimou-se a correlação de Pearson entre as variáveis padronizadas com o objetivo de verificar a possibilidade do uso de técnicas multivariadas, por exemplo a análise de componentes principais (MURDOCH; CHOW, 2013). Em seguida, verificou-se a consistência dos dados pela análise da variância acumulada e se 80% das informações do banco original estavam contidas nos dois primeiros componentes principais obtidos. Para visualizarmos graficamente a análise de componentes principais, realizou-se o biplot dos dois primeiros componentes, em que o ângulo entre os vetores das variáveis representa a correlação entre elas, sendo: 0° a correlação máxima positiva; 180° a correlação máxima negativa; ângulo reto (90° ou 270°) a ausência de correlação; ângulos agudos representam diferentes níveis de correlação positiva; e ângulo obtuso, diferentes níveis de correlação negativa. Após a análise de agrupamento, utilizando o método de distâncias de Ward com o auxílio do pacote "cluster" (MAECHLER et al., 2015), realizou-se a construção dos dendogramas que formam agrupamento entre os isolados de maior similaridade.

2.2.2.2 Estabilidade dos isolados resistentes

Dois isolados de *Monilinia fructicola* resistentes à azoxistrobina (SP09839 e SP08345) foram avaliados quanto à estabilidade da sua resistência. Um isolado sensível (PR09638) também foi avaliado para verificar se a eventual ocorrência de redução da germinação, esporulação ou do crescimento micelial é ou não uma característica da espécie. Os isolados foram obtidos de colônias monospóricas crescidas em meio batata-dextrose-água (BDA) por dez dias a 22°C , no escuro. Discos de micélio dos isolados resistentes de 5 mm de diâmetro foram repicados para o centro das placas de Petri contendo BDA acrescido de $1\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ do ingrediente ativo azoxistrobina e $100\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido salicílico (SHAM) dissolvido em metanol, de acordo com metodologia descrita em 2.2.2.1. No 15º dia, a colônia foi transferida para meio BDA sem fungicida e esse procedimento foi denominado transferência zero (T0). Para o isolado sensível, discos de 5 mm de

diâmetro foram retirados a 1 cm do centro das placas e repicados para BDA sem azoxistrobina. Todos os isolados foram, a partir daí, repicados para BDA sem azoxistrobina. As placas foram incubadas por 7 dias a 22°C e no escuro. Esse procedimento foi realizado em 10 transferências consecutivas. Em todas as transferências, avaliou-se, diariamente, o diâmetro da colônia, obtido por meio da média de duas medidas perpendiculares. Em quatro transferências (inicial - T0, terceira - T3, sexta - T6 e última transferência - T10), avaliou-se a esporulação, a porcentagem de germinação de conídios dos isolados e o diâmetro de colônia dos isolados em meio de cultura com $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ i.a e SHAM (Figura 3). Dez placas para cada tratamento foram utilizadas e cada placa foi considerada como uma repetição. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. O experimento foi repetido.

Figura 3 - Esquema do ensaio realizado para verificar a estabilidade da resistência de isolados de *Monilinia fructicola* na ausência do fungicida azoxistrobina, em que estão representadas as placas de Petri utilizadas nas dez transferências consecutivas para avaliação do diâmetro da colônia (T0 a T10). Placas de coloração mais escura representam meio de cultura com $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ i.a e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de SHAM e indicam o momento em que se avaliou a esporulação, germinação e crescimento micelial em meio com fungicida ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ i.a e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de SHAM)

A esporulação foi avaliada como descrito em 2.2.2.1, mas antes das gotas de lactoglicerol serem adicionadas, três alíquotas de 40 μL da suspensão de conídios foram retiradas e depositadas em placas de poliestireno, para avaliar a porcentagem de germinação dos conídios, como descrito em 2.2.1.

Foi ajustado um modelo fatorial duplo no programa R versão 3.2.1 (R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2014) para analisar os dados dos experimentos de estabilidade. Para a análise dos dados da taxa de crescimento micelial no meio sem fungicida, germinação, esporulação e avaliação do diâmetro da

colônia no meio com fungicida os fatores foram "Isolados" ("PR09638", "SP08345" e "SP09839") e "Transferências" (0, 3, 6 e 10). Todos os experimentos foram realizados duas vezes e cada experimento foi considerado como bloco. A normalidade dos resíduos foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância e a homogeneidade da variância foi conferida por meio de diagnóstico gráfico do resíduo do modelo. Em caso do não cumprimento de ambos os pressupostos dos modelos lineares, foram feitas transformações das variáveis originais de acordo com a potência ótima sugerida pelo método Box-Cox. Os dados de esporulação foram transformados para raiz cúbica de seus valores, os dados de diâmetro micelial para $\log(x+0,5)$ e para os dados de germinação foi aplicado a transformação logit (proporção 0:1) (Eq. 3).

$$\text{Logit}(p_{ji}) = \log(p_{ji}/1-p_{ji}) = \log(p_{ji}) - \log(1-p_{ji}) \quad (3)$$

em que: p_{ji} é a proporção da germinação na j -ésima transferência e na i -ésima repetição.

2.2.2.3 Metodologias para avaliação da habilidade competitiva de isolados de *Monilinia fructicola* resistentes à azoxistrobina

Um isolado resistente (R1: SP09839) e um isolado sensível (S1: PR09638) foram escolhidos dentre os seis isolados caracterizados *in vitro* e *ex vivo* (ver 2.2.2.1) para testar diferentes métodos para avaliação da habilidade competitiva entre estes isolados na ausência do fungicida. Foram comparados dois substratos - pêssegos *in natura* e pêssegos enlatados - e dois métodos de avaliação *in vitro* - unidades formadoras de colônia e germinação de conídios - em meios de cultura BDA acrescido de SHAM e BDA com azoxistrobina e SHAM.

2.2.2.3.1 Inoculação em pêssegos *in natura* e em pêssegos enlatados

Para a desinfestação dos pêssegos *in natura*, os frutos foram imersos em uma solução de 0,5% de hipoclorito de sódio por 1 minuto e, posteriormente, imersos três vezes em água destilada, como descrito anteriormente (item 2.2.1). Em seguida, os

frutos foram dispostos em ambiente para secar a fim de remover o excesso de água na superfície. Para os experimentos com pêssego enlatado, foi removida a calda e realizada uma tríplice lavagem com água destilada.

Cor, firmeza e teor de sólidos solúveis foram avaliados nos pêssegos *in natura* no dia de cada inoculação em 10 frutos (repetições) para caracterizar seu estágio de maturação, como descrito em 2.2.1.

Cada suspensão dos isolados foi ajustada na concentração de 10^5 conídios. mL^{-1} em água esterilizada e misturada para ter a proporção de 50% de isolados resistentes e 50% de sensíveis. Gotas de 40 μL da suspensão misturada foram depositadas na região equatorial em frutos previamente desinfestados ou em metades de pêssegos enlatados e mantidos a 22°C, em câmara úmida por 24 horas. Nos frutos de pêssego *in natura* foi realizado um ferimento com agulha no local de deposição do inóculo, logo após a inoculação.

A severidade (diâmetro da lesão) foi avaliada e consistiu na média de duas medidas perpendiculares da lesão. Foram utilizadas seis repetições e cada repetição era composta de seis frutos ou duas metades de pêssego enlatado.

Ao término da avaliação, discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados a 1 cm do centro da lesão de todos os frutos inoculados e colocados em tubos com 5 mL de água esterilizada. Uma suspensão de 10^5 conídios. mL^{-1} obtida pela mistura de suspensões de cada repetição foi utilizada para inocular outros 36 frutos de pêssego ou 12 metades de pêssego enlatado. A cada sete dias foi realizada uma transferência, totalizando cinco transferências (Figura 4). Os frutos e as metades de pêssego enlatado foram incubados a 22°C com fotoperíodo de 12 h.

2.2.2.3.2 Avaliação do número de unidades formadoras de colônia e da porcentagem de germinação de conídios

Para os experimentos em que se avaliou o número de unidades formadoras de colônia (UFC), foram ajustadas, em água esterilizada com o auxílio de hemocítmetro, suspensões de cada repetição de 1×10^3 conídios. mL^{-1} e 100 μL foram distribuídos com alça de Drigalski em meio BDA com o corante rosa de bengala e SHAM sem e com fungicida (1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ingrediente ativo). O número de unidades formadoras de colônias foi contado após 3 dias.

Para os experimentos em que se avaliou a germinação dos conídios, de cada repetição, ajustou-se somente suspensão de 1×10^5 conídios.mL⁻¹ e depois as suspensões foram misturadas para inocular os frutos ou as metades de pêssego enlatado. Alíquotas de 40 µL da suspensão de conídios foram depositadas em placas com meio BDA e SHAM com e sem fungicida, totalizando 3 gotas de 40 µL por repetição. As placas foram armazenadas em B.O.D. a 22°C, no escuro por 18 horas. Avaliou-se a porcentagem da germinação dos conídios em cada placa, por meio da contagem de 100 conídios por gota, utilizando microscópio óptico. Foram considerados germinados os conídios que apresentaram tubo germinativo de comprimento 1,5 vezes o comprimento do conídio.

As diferenças nas unidades formadoras de colônias ou conídios germinados entre os meios sem e com azoxistrobina foram utilizadas para determinar a porcentagem de indivíduos resistentes após cada transferência e verificar a evolução da porcentagem de indivíduos resistentes no tempo. Em todos os meios de cultura foram adicionados 100 µg.mL⁻¹ de ácido salicilhidroxâmico (SHAM).

Figura 4 - Esquema das transferências consecutivas (T1-T5) utilizadas para o estudo de habilidade competitiva dos isolados de *Monilinia fructicola*; iniciando-se com metade da população resistente (R1) e metade sensível (S1). 'Pêssego' representa frutos *in natura* ou enlatados. Placas do lado direito representam experimentos em que foi avaliada a germinação dos conídios em meio com e sem fungicida. Placas do lado esquerdo representam experimentos em que foi avaliado número de unidades formadoras (UFC) em meio com e sem fungicida

2.2.2.3.3 Análise estatística das metodologias de avaliação da habilidade competitiva de isolados de *Monilinia fructicola* resistentes à azoxistrobina

No experimento em que se avaliou a proporção de número de unidades formadoras de colônia (UFC) resistentes, a significância do efeito das transferências foi estimada pela análise de deviance (modelo linear generalizado - GLM - com distribuição quasi-binomial), pois, mesmo após transformações ideais, os dados não apresentaram homogeneidade de variância. As médias foram comparadas pelo método de contrastes Tukey com uso do pacote "Multcomp" (HOTHORN; BRETZ; WESTFALL, 2008) no programa R versão 3.2.1 (R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2014). Cada experimento foi considerado como um bloco. Para a variável do número de unidades formadoras de colônia (UFC), foi obtido um valor inicial de referência, calculando a proporção de UFC em meio com fungicida em relação às UFC observadas em meio BDA.

Para testar a significância das transferências sob a proporção de conídios germinados, realizou-se análise de variância. Nos dados provenientes do experimento com frutos *in natura* como substrato foi aplicado a transformação logit (Eq. 3). Não houve necessidade de transformar os dados de conídios germinados provenientes do substrato pêssego enlatado, pois apresentaram os pressupostos de homogeneidade de variância e normalidade dos resíduos. Cada experimento foi considerado como um bloco e com os modelos lineares foi realizada a comparação múltipla de médias de Tukey com 5% de significância.

2.2.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Seis isolados caracterizados em 2.2.2.1, dez isolados resistentes do Estado de São Paulo coletados na safra 2012/2013 (4A, 5A, 8A, 3B, 4B, 13B, 32B, 33B, 42B e 10C) e três isolados (SP09839, SP08345 e PR09638) da oitava transferência (T8) do estudo da estabilidade (ver 2.2.2.2) foram analisados para verificar potenciais mutações nos códons 143, 137 e 129 do *cyt b*. O DNA foi extraído de culturas com 10 dias de idade utilizando o protocolo CTAB modificado (DOYLE; DOYLE, 1987) ou o kit de extração da ProMega, de acordo com recomendações do fabricante. Todos os ácidos nucleicos foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop 1000. A

caracterização molecular foi desenvolvida no Centro de Pesquisa e Educação da Costa do Golfo (Gulf Coast Research and Education Center) da Universidade da Flórida, sob orientação da profa. Dra. Natália Peres.

Reações de polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em volumes de 50 µl contendo 35,1 µl de água, 5 µl de 10x buffer, 1,5 µl de 50 mM MgCl₂, 1 µl de dNTP, 2,5 µl de cada primer, 0,4 µl de Taq (5 U.µl⁻¹) e 2 µl de DNA ou água (controle) com condições de 95 °C por 2 min, seguidos de 29 ciclos de 95 °C por 30 s, 52 ou 55 °C por 30 s, 68 °C por 1,5 ou 2,5 min, e extensão final de 5 min a 68 °C (Tabela 3 contém lista da sequência de primers, com respectivas temperaturas de anelamento, tempo de extensão e região alvo). Produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5 % e alíquotas de 5 µl de cada amostra foram misturadas com 1 µl de gelRedTM diluído no buffer. Experimentos iniciais com diferentes diluições (1:1; 1:10; 1:50 e 1:100) do gelRedTM no buffer foram realizados para verificar se esse produto estava interferindo na imagem final das bandas.

Primers também foram utilizados para identificação das espécies de *Monilinia*. Primers cola2-fwd, colaexon3-fwd e colaexon4-rev são específicos para *M. fructicola*, enquanto primers laxaexon3-fwd e laxaexon4-rev são para *M. laxa* (HILY *et al.*, 2011).

Tabela 3 - Sequência, temperatura de anelamento, tempo de extensão e região amplificada de cada primer utilizado para caracterização molecular de isolados de *Monilinia fructicola*

Nome do primer	Sequência 5' a 3'	Temperatura de anelamento	Tempo de extensão (minutos)	Região amplificada	Referência
cola0-fwd	AGAGCACCTAGAACATTAGTT	52 °C	1,5	codon 129	Este estudo
cola1-rev	AACCAAAGCTTGAACCCGCT	52 °C	1,5		
cola2-fwd	CGCGACAGGCTGGGTCACTGA	55 °C	2,5	codon 137 e 143 + intron	Este estudo
colaexon3-fwd	TTTACCTTACGGTCAAATGAGCCT	55 °C	2,5		
colaexon4-ver	AACTCAACAATATCACCTCCAATTCAT	55 °C	2,5	codon 137 e 143 + intron	Hily et al., 2011
laxaexon3-fwd	TTACCTTACGGTCAAATGTGCTA	55 °C	2,5		
laxaexon4-ver	CAACAATATCTGTCCAATTCATGGT	55 °C	2,5		

Foi realizada uma limpeza enzimática (ExoSAP-ITTM) em todos os produtos da PCR. Cinco microlitros de cada amostra de PCR foram misturados com 2 µl de exoSAP-IT[®] e esta mistura foi incubada a 37 °C por 15 min e, em seguida a 80 °C por 15 min. Após este período de incubação, 15 µl de água foram adicionados, totalizando 22 µl. Antes do envio para o sequenciamento (Genewiz, South Plainfield,

NJ), cada amostra foi dividida em 10 µl para o primer forward e 10 µl para o primer reverse.

As sequências reversas foram revertidas utilizando o "Reverse Complement" (http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/rev_comp.html). Todas as sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando o "Clustal Omega" (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). As sequências consensus foram definidas e comparadas com sequências do citocromo b de *M. fructicola* disponíveis no GenBank, utilizando o programa BioEdit versão 7.2.5.

2.3 Resultados

2.3.1 Escolha dos isolados

Os frutos utilizados nos experimentos destinados à escolha dos isolados de *M. fructicola*, apresentaram firmeza inferior a 3 kgf e coloração, medida pelo ângulo Hue, próximo de 60°, que representa a tonalidade alaranjada (Tabela 4). Isso indica que os frutos estavam no ponto de maturação. Não houve diferença na maturação dos frutos utilizados nos 2 experimentos (Tabela 4).

Tabela 4 - Valor médio de sólidos solúveis (°Brix), firmeza (kgf) e ângulo Hue, obtido no dia da inoculação de *Monilinia fructicola*, dos frutos para escolha dos isolados

	Sólidos solúveis (°Brix) ¹	Firmeza (kgf) ¹	ângulo Hue ¹
experimento 1	12,11 ± 0,96	2,87 ± 0,72	60,14 ± 6,95
experimento 2	13,36 ± 0,52	1,90 ± 0,54	70,00 ± 4,92

¹ Média ± erro padrão; não foram observadas diferenças significativas entre as médias na mesma coluna ao nível de 5 % de probabilidade

Apesar de todos os isolados apresentarem germinação acima de 50 %, o isolado PR1131 não apresentou sintomas nos frutos e o isolado SP09834 apresentou incidência de apenas 20 % em frutos sem fungicida (Tabela 5). Esses isolados foram descartados, devido à baixa virulência. Os isolados escolhidos para os experimentos de caracterização foram SP05160, SP06210, PR09638, SP09885, SP09839 e SP08345.

Tabela 5 - Viabilidade do inóculo de *Monilinia fructicola* e incidência da doença em frutos sem e com fungicida azoxistrobina no experimento de escolha dos isolados

Isolado	Conídios germinados (%)	Incidência nos frutos (%)	
		Sem fungicida	Com fungicida
PR1131	81,8	0	0
SP05160	82,3	30	0
SP06210	75,0	80	0
PR09638	96,8	80	0
SP09834	62,8	20	0
SP09885	*	70	80
SP09839	56,8	30	0
SP08345	77,7	40	10

* utilizou-se suspensão de micélio para a inoculação

2.3.2 Adaptabilidade e estabilidade dos isolados resistentes

2.3.2.1 Caracterização dos isolados resistentes e sensíveis

Apesar do isolado SP09885 ter apresentado maior incidência da doença nos frutos com fungicida (80 %) (Tabela 5), o CE_{50} foi menor que $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (Tabela 6 e Anexo A). Essa diferença, provavelmente, deve-se à fase de atuação do fungicida, pois a germinação dos esporos é a etapa com maior sensibilidade à estrobilurina e a inoculação dos frutos desse isolado foi realizada com suspensão de micélio, devido à baixa capacidade de esporulação desse isolado. Este mesmo isolado apresentou a menor taxa de crescimento micelial em meio de cultura ($0,27 \text{ cm.dia}^{-1}$) e a menor produção de esporos *in vitro* entre os isolados (Tabela 6).

Tabela 6 - Taxa de crescimento micelial, número de conídios produzidos *in vitro* e concentração efetiva capaz de inibir 50 % da germinação (CE_{50}) dos isolados de *Monilinia fructicola*

Isolado	Taxa de crescimento micelial (cm.dia^{-1}) ¹	Número de conídios produzidos ($\times 10^5$ conídios. mL^{-1}) ²	CE_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
SP05160	0,90 a	0,044 a	0,74
PR09638	0,86 a	0,019 ab	0,52
SP06210	0,84 a	0,025 ab	0,67
SP09839	0,80 a	0,053 a	1,47
SP08345	0,60 b	0,057 a	1,57
SP09885	0,27 c	0,004 b	0,54

¹ Médias com a mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste T-Student ($\alpha = 0,05$)

² Medianas com a mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$)

Os isolados sensíveis SP05160, PR09638 e SP06210 apresentaram taxas de crescimento micelial iguais às do isolado resistente SP09839 (Figura 5 e Tabela 6).

Figura 5 - Diâmetro médio da colônia dos isolados de *Monilinia fructicola* avaliados diariamente (média de duas medidas perpendiculares da colônia) até o 10º dia (média dos 2 experimentos). Barras representam o erro padrão dos dados. Linhas de tendência de estilos diferentes representam taxas diferentes de acordo com o teste t-Student

Os frutos utilizados para experimentos *ex vivo* para caracterização dos isolados também apresentaram coloração próxima da tonalidade alaranjada (60°) (Tabela 7). Não houve diferença na maturação dos frutos utilizados nos 2 experimentos (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios de sólidos solúveis (°Brix), firmeza (kgf) e ângulo Hue no dia da inoculação dos experimentos *ex vivo* para caracterização dos isolados de *Monilinia fructicola*

	Sólidos solúveis (°Brix) ¹	Firmeza (kgf) ¹	ângulo Hue ¹
experimento 1	10,96 ± 0,42	1,96 ± 0,54	76,47 ± 3,03
experimento 2	11,81 ± 0,65	1,53 ± 0,48	69,84 ± 4,92

¹ Média ± erro padrão; não foram observadas diferenças entre as médias na mesma coluna ao nível de 5% de probabilidade

Houve alta correlação entre as variáveis padronizadas, de acordo com representação gráfica (Figura 6) e, em razão disso, foi realizada a análise de componentes principais.

Figura 6 - Gráfico de correlações entre a média das variáveis analisadas nos dois experimentos para caracterização *ex vivo* dos isolados de *Monilinia fructicola*. Correlações positivas são representadas pela cor azul (ou inclinação para direita) e as negativas pela rosa (ou inclinação para esquerda). Os valores dos coeficientes estão representados pela intensidade das cores (de acordo com o gradiente superior) e também pelo achatamento da elipse. As variáveis estudadas foram: esporulação (Esporulacao), incidência final (Incidencia), diâmetro da lesão (Diametro_lesao), períodos de latência (Latencia) e de incubação (Incubacao) no sétimo dia

A variância acumulada dos dois primeiros componentes foi de 97,64 %, tornando o biplot como um bom resumo da informação total contida no banco de dados original (Figura 7A). Com as distâncias euclidianas entre os isolados obtidas no biplot, foi construído o dendograma que permitiu visualizar a similaridade multivariada entre eles (Figura 7B).

Figura 7 - Biplot (A) e dendrograma correspondente (B) da média dos experimentos *ex vivo* para caracterização dos isolados de *Monilinia fructicola*. O componente 1 é composto pelas variáveis: esporulação ("Esporulacao"), período de incubação ("Incubacao"), período de latência ("Latencia") e diâmetro da lesão ("Diametro_lesao") no sétimo dia. O componente 2 é composto pelas variáveis: incidência ("Incidencia") e diâmetro da lesão ("Diametro_lesao") no sétimo dia. S1, S2, S3 e S4 representam os isolados sensíveis PR09638, SP05160, SP06210 e SP09885, respectivamente. R1 e R2 representam os isolados resistentes SP08345 e SP09839, respectivamente

A linha de corte na distância 3 permitiu estabelecer dois grupos de proximidade nos experimentos (Figura 7B). O isolado SP09885 (S4) diferenciou-se dos outros isolados, apresentando a maior distância. Os isolados sensíveis PR09638 (S1), SP05160 (S2) e SP06210 (S3) compartilharam grupo com os isolados resistentes SP08345 (R1) e SP09839 (R2).

2.3.2.2 Estabilidade dos isolados resistentes

As características iniciais (T0) dos isolados utilizados neste estudo foram semelhantes àsquelas descritas na caracterização dos isolados (item 2.3.2.1), em que o isolado sensível (PR09638) apresentou taxa de crescimento micelial superior aos isolados resistentes (Figura 8) e a esporulação não diferiu entre os isolados (Figura 9D, 9E e 9F e Anexo B).

De modo geral, os isolados apresentaram comportamento semelhante entre as transferências em todas as variáveis analisadas (esporulação, germinação, diâmetro micelial no meio de cultura com fungicida e taxa de crescimento micelial no meio de

cultura sem fungicida) e não foi observada tendência de aumento ou redução em nenhuma delas, com exceção para a germinação (Figura 8 e 9A, 9B e 9C).

Figura 8 - Taxa de crescimento micelial de *Monilinia fructicola* ao longo das 10 transferências dos isolados PR09638 (A), SP08345 (B) e SP09839 (C). As barras representam o erro padrão

Para todos os isolados, observou-se que até a sexta transferência (T6), a germinação foi semelhante, mas apresentou uma redução da sexta para a décima transferência (T10) para os três isolados. Essa redução, embora estatisticamente significativa, não representa queda importante na habilidade dos isolados pois, numericamente, houve diminuição de no máximo 20 %. A germinação mínima manteve-se em 51 % (Anexo B). Como essa redução foi observada nos 3 isolados (Figura 8), é possível que tenha ocorrido interferência ambiental, como influência de queda de energia ou oscilação na temperatura na B.O.D..

Figura 9 - Proporção de conídios germinados (A, B e C), número de conídios produzidos (D, E e F) das suspensões obtidas de cada transferência avaliada e diâmetro micelial dos isolados de *Monilinia fructicola* em meio de cultura com $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de azoxistrobina e SHAM (G, H e I) dos isolados PR09638 (A, D e G), SP08345 (B, E e H) e SP09839 (C, F e I). As barras representam o erro padrão

2.3.2.3 Habilidade competitiva de isolados de *Monilinia fructicola* resistentes à azoxistrobina

Os frutos utilizados nos experimentos de habilidade competitiva dos isolados de *M. fructicola* apresentaram variação ao longo das transferências, tanto nos experimentos em que se avaliou o número de unidades formadoras de colônia, quanto nos que se avaliou conídios germinados (Tabela 8). De modo geral, os frutos estavam no ponto de maturação, apresentando tonalidade próxima da alaranjada (60°). No entanto, apesar dos cuidados na escolha dos frutos utilizados em cada experimento, as variáveis mostram a variação entre as transferências (Tabela 8).

Tabela 8 - Valor médio de sólidos solúveis (°Brix), firmeza (kgf) e ângulo Hue, obtido no dia da inoculação de *Monilinia fructicola* nos frutos, para cada transferência cujo método de avaliação da proporção de isolados resistentes foi o número de unidade formadoras de colônia ou conídios germinados

Metodologia ¹	Transferência ²	Sólidos solúveis (°Brix) ³	Firmeza (kgf) ³	Ângulo Hue ³
Unidades formadoras de colônia	R1xS1	13,5 ± 0,22 a	1,6 ± 0,23 b	67,6 ± 1,91 a
	T1	13,7 ± 0,26 a	1,5 ± 0,15 b	68,2 ± 1,90 a
	T2	10,1 ± 0,33 d	2,8 ± 0,34 a	67,3 ± 1,91 a
	T3	11,7 ± 0,57 bc	3,1 ± 0,35 a	60,7 ± 2,50 ab
	T4	11,9 ± 0,43 b	1,4 ± 0,24 b	63,6 ± 19,2 ab
	T5	10,5 ± 0,55 cd	2,2 ± 0,18 ab	56,3 ± 2,44 b
Conídios germinados	R1xS1	11,99 ± 0,73 a	2,67 ± 0,34 a	53,17 ± 4,45 ab
	T1	11,27 ± 0,46 ac	2,21 ± 0,21 ab	63,21 ± 2,58 ab
	T2	11,61 ± 0,30 ab	2,06 ± 0,42 ab	65,72 ± 2,83 a
	T3	10,11 ± 0,27 bc	1,30 ± 0,15 b	59,08 ± 5,09 ab
	T4	9,86 ± 0,45 c	2,23 ± 0,41 ab	51,07 ± 4,39 b
	T5	9,83 ± 0,49 c	1,56 ± 0,29 ab	54,58 ± 4,15 ab

¹ Metodologia de avaliação da proporção de isolados resistentes;

² R1 x S1 representa a mistura inicial do isolado resistente (R1) com o sensível (S1), T1, T2, T3, T4 e T5 representam as cinco transferências consecutivas;

³ Média ± erro padrão; médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

O isolado resistente apresentou habilidade competitiva semelhante à do isolado sensível, mantendo sua proporção igual ao longo das transferências, independentemente do método utilizado.

O valor de referência da proporção do isolado resistente na suspensão original foi maior que o esperado no experimento em que se avaliou o número de unidades

formadoras de colônia (Figura 10A). Isso não ocorreu nos demais experimentos. A avaliação de conídios germinados apresentou proporção inicial de conídios resistentes à azoxistrobina próximo ao esperado (50 %) tanto em frutos *in natura* (Figura 10B), como em pêssego enlatado utilizado como substrato (Figura 10C). Os experimentos desenvolvidos em pêssego enlatado foram semelhantes aos em frutos *in natura*, no qual a porcentagem inicial de conídios resistentes foi de 52 % e 57 %, respectivamente, e a final de 66 %.

Figura 10 - Proporção de unidades formadoras de colônia resistentes de *Monilinia fructicola* obtidas de pêssego *in natura* (A) e proporção de esporos germinados de *M. fructicola* obtidos de pêssego *in natura* (B) e pêssego enlatado (C). As barras representam o intervalo de confiança com 95 % de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. A linha pontilhada representa o valor inicial de referência, obtido inicialmente com a mistura do isolado resistente com o sensível

A proporção observada do isolado resistente ao longo das transferências não influenciou na severidade da doença. Notou-se pequena variação e o diâmetro da lesão na última transferência foi igual ao da primeira em todos os experimentos (Figura 11).

Figura 11 - Diâmetro da lesão (cm) da podridão parda em frutos *in natura* no dia da transferência: (A) dados referem-se aos experimentos cujo método de avaliação da proporção de isolados resistentes foi o número de unidade formadoras de colônia e (B) dados referem-se aos experimentos cujo método de avaliação da proporção de isolados resistentes foi a proporção de esporos germinados. As barras representam o intervalo de confiança com 95 % de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade

2.3.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Nenhum dos isolados estudados amplificou com o par de primers laxaaxon3-fwd e laxaaxon4-ver que são específicos para a espécie *Monilinia laxa* (Figura 12). Utilizando o par de primers colaaxon3-fwd e colaaxon4-ver, um fragmento de 1155 pb (excluindo região dos primers) foi amplificado dos isolados, confirmando-se que todos os isolados são *M. fructicola*.

Figura 12 - PCR do códon 143 com par de primer laxaexon3-fwd e laxaexon4-rev específicos para *Monilinia laxa*. Controle é somente água e um isolado de *M. laxa* do Brasil foi utilizado como controle positivo

Somente 1144 pb do íntron foi amplificado e o códon 143 do *cyt b* não foi observada, por isso foi desenhado o primer cola2-fwd e utilizado em par com colaexon4-rev para amplificar os códons 137 e 143 e o íntron de 1166 pb (fragmentos de 1305 a 1316 pb) (Figura 13A). Além desse primer, foi desenhado o par de primers cola0-fwd e cola1-rev baseado nas sequências depositadas no genBank para amplificar o códon 129 (fragmento de 608 pb).

Figura 13 - (A) PCR dos códons 137 e 143 e íntron (1166 pb) de isolados de *Monilinia fructicola* com par de primers cola2-fwd e colaaxon4-ver e (B) PCR do códon 129 de isolados de *M. fructicola* com par de primers cola0-fwd e cola1-rev. Controle é somente água

Todos os isolados de *M. fructicola* apresentaram sequenciamento idêntico (Figura 13). Nenhum isolado apresentou mutação nos códons 129, 137 e 143 e verificou-se a presença do íntron do grupo I localizado logo após o códon 143 (Figuras 14 e 15). Mesmo após oito transferências em meio BDA, não houve alteração nas sequências.

(A)

cola0-fwd →

AGAGCACCTAGAACATTAGTTTGAACAATAGGTGTAGTTATATTCATATTAATGATAGTTAC

F129

AGCT**TTC**CTGGGTTTGTCAAATAGCCCAAAATGATTTAAATTCAACCATAACAAGAACAGCA
 ATGTAAACAAATTCAACTCTTATTATACTAGACCTGGTATTTTACAAGTGTAATAAATCAA
 ATATAATAGGTAGAAGACACTTTTCTGTAACAACCTCCGCGTAGGTTAATTAGTGAAGAGTTA
 ACGAAATTCATATCCGAAAAAACCTTAATCCGGTTTTTCATATACGAAGATTTATCAGATAAA
 GCTGTAAATCTAGAGTTTTGAAGGATACTCGGGGTCTTAGTGTTATTTATTTAATTTTAAAC
 AAAGTGACTCTGGATTATTATATAGGATCAGCTTCAACTGGTAGATTCCATGCGAGATTTTC
 TAATCATTTATTCCATTTTCATGGTAGTAAAGTAGTTAAAAATGCAGTAAAGAAACATGGTAT
 ATCTTGTTTTGCCTTTATAATTTTAGAGTTGTTTCCTGAGATAGTAAACAAAGAAAATAATAA
 AAAATTATTAGATTTGGAAGACTTTTACTTAAATCTTTATTACCAAACATAACATATTAAC

← **cola1-rev**

GAAGCGGGTTCAAGCTTTGGTT

(B)

Isolados resistentes

SP08345 TTACAGCT**TTC**CT
 SP09839 TTACAGCT**TTC**CT
 4A TTACAGCT**TTC**CT
 3B TTACAGCT**TTC**CT
 10C TTACAGCT**TTC**CT

Isolados sensíveis

SP05160 TTACAGCT**TTC**CT
 SP06210 TTACAGCT**TTC**CT
 PR09638 TTACAGCT**TTC**CT
 SP09885 TTACAGCT**TTC**CT

Figura 14 - (A) Sequência do códon 129 do gene do citocromo b (*cyt b*) de *Monilinia fructicola* obtida pelo par de primer cola0-fwd e cola1-rev. Texto destacado em cinza indica parte do íntron (566 pb), setas indicam a posição da sequência do primer (5' - 3'), texto negrito e sublinhado indica o códon associado à resistência parcial (F129) às estrobilurinas. (B) Sequências parciais do nucleotídeo do *cyt b* de isolados resistentes e sensíveis de isolados representativos. O códon 129 está sublinhada e em negrito

A organização íntron-exon analisada foi a mesma que as sequências do *cyt b* presentes no genBank, demonstrando 100 % de identidade: números de acesso: GU933643 (MIESSNER; STAMMLER, 2010), GQ304941 (LUO et al., 2010) e GU952815 (VILLANI; COX, 2009). As sequências dos isolados brasileiros SP05160 e 4A estão disponíveis no GenBank com números de acesso: KM610206 e KM610207, respectivamente.

(A)

cola2-fwd →
 CGCGACAGGCTGGGTCACTGACGGGTGTCTGAAATGATACTTAATGCACAGTCGAAGTATT
 TAGTTATAGAATATGACTAATAGAATATACGAATTCAAAGTTATTCTAGCTTTTTATAAATGTC

colaexon3-fwd →
 TTTTAATTTATATTAAGTATATTTGTACGTTTTACCTTAC**GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**AT
 TATTTTCGTGCCTCACATGCAATGCTTTATGATATGGATGTCTAGTACTCTTTCTATTTCGCATT
 TTTTCTTTCTAGCATTTTTCTAATCAACGTATATCTTGGTCCTAACTCTTGACGACAAGGTAA
 ACTAGCTAATCGTATTCCCTGCTAATATTCGAATTGGACCACACAATCATGATATTCTAAGTAT
 CTTAACTGGTACTTTACTGGGCGATGCTCATGCAGAACGGCGTCGTTCTGGTAATGGTTCT
 CGAATCAGTTTTTCACAGGAATCTTCTCGTGGAGAATATCTACACTACTTGCATGGTCTAAT
 TGCTAAGCTAGGTTATTGCAATCCCGCTGTTCCAGTTATTCAAACCTCGACTAGTTGCTGGA
 GGGAAGATACGATATACTTTACGGTTTTCACACTTATACTTACACAAGTTTGAACCTTTATACG
 AGACTTGTGATATGATAGTAAAGGTACAAAGGTTGTACCTAACACTATTGCTGATTTCTTA
 CACCACCTGCTCTAGCTATTTGAATTATGGATGATGGTGGTCGAGTAGGATATGGACTAAA
 GTTAGCTACAAATTCATTTACATTTGCGGATACTACTCGTCTAGTACAAATCTTGCAATAATCT
 TTATGGAATTAAGGCTACTGTTCAATCAGCAGGTGTATCTAATCAGTATGTTATTTATGTTTG
 ATCAGAGTCTATGCCACGACTACGAGAATTGGTGCGACCGTACATGGTTTCATCTATGCTT
 TATAAACTTGGAGAATAGGGGTACTACTATATTATTCATACATAGAAATTGTATAGTCTCTTG
 CTTACCTATGGTTAGCTTTAAGAGGCAACACTGATGAAAACGGTCAAAGACATTATCTCTTG
 TCCAGACCGTCGGCTAACTATAAGACGCGCCTGACTTCTGCGGCGTAGCCAGCCAGGCCGA
 GTGGTAATTAATAATTTACCACTAAGACACTTATTAGTTGATCGCTACAGACTGCTCCATCGG
 TGGGTCGATAAACATCGGCTTAATGTACAGTCGAGGAACCTTTAGCAAACACTGCTAACAC
 AAGGCACTGTGATGCTTTAAATGGCAATATGCATACTGCATATTCATAAGTGTACAGGATTA
 TATGTTCCGAGATTATCACTAATGTGGACGATATATAATTGAGATCCTGGCAACTGTTATTA

colaexon4-rev ←
 CGAACCTTATGAGTGCTATACCATGAATTGGAGGTGATATTGTTGAGT

(B)

Isolados resistentes

SP08345 **GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**ATTATT
 SP09839 **GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**ATTATT
 4A **GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**ATTATT
 3B **GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**ATTATT
 10C **GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**ATTATT

Isolados sensíveis

SP05160 **GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**ATTATT
 SP06210 **GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**ATTATT
 PR09638 **GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**ATTATT
 SP09885 **GGT**CAAATGAGCCTATGA**GGT**ATTATT

Figura 15 - (A) Sequência dos códons 137 (G137), 143 (G143) e do íntron do gene do citocromo b (*cyt b*) de *Monilinia fructicola*. Texto destacado em cinza indica o íntron (1166 pb), setas indicam a posição da sequência do primer (5' - 3'), texto negrito e sublinhado indica o códon associado a resistência parcial (G137) ou total (G143) a estrobilurinas. (B) Sequências parciais do nucleotídeo do *cyt b* de isolados resistentes e sensíveis de isolados representativos. Os códons 137 e 143 estão sublinhados e em negrito e parte do íntron está destacado em cinza

2.4 Discussão

Na década de 90, diversos ingredientes ativos com modo de ação específico foram patenteados e produtos com essas moléculas foram registrados e comercializados para diferentes culturas agrícolas. Um desses registros é do ingrediente ativo azoxistrobina que, em 2009, apresentou o maior volume de vendas (em milhões de dólares) entre as estrobilurinas (OLIVER; HEWITT, 2014). Em 2014, a patente da azoxistrobina expirou e há perspectiva do aumento do número de produtos genéricos que serão disponíveis no mercado. Com a maior oferta desse fungicida para os produtores, acredita-se que ocorra redução nos preços desses produtos e, paralelamente, o aumento da utilização desse ingrediente ativo para o controle das doenças. Dentro desse contexto, com o aumento do uso da azoxistrobina e da maior pressão de seleção, isolados resistentes poderão ocorrer com maior frequência, como já vem sendo observado o aumento na sensibilidade dos isolados de *M. fructicola* à azoxistrobina (MAY-DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011). A verificação de aumento nos valores da concentração efetiva de azoxistrobina capaz de inibir 50 % da germinação de conídios de *M. fructicola* (CE₅₀) reforça a necessidade de quantificar a adaptabilidade, a estabilidade da resistência e a habilidade competitiva desses isolados. Esses experimentos são um pré-requisito para estabelecer estratégias antirresistência, pois, apesar da seleção de isolados resistentes em uma população ser um processo evolucionário, o mecanismo de resistência do fungo pode ou não ocasionar um custo adaptativo para o patógeno.

A resistência de fungos à azoxistrobina pode ser do tipo qualitativa ou quantitativa. A do tipo qualitativa, confere resistência completa e geralmente é relacionada com mutações no *cyt b*, e a do tipo quantitativa apresenta mudança na sensibilidade dos isolados ao fungicida e pode não conferir a condição de resistência prática às estrobilurinas (KOLLER et al., 2004). A resistência qualitativa pode ser precedida pela quantitativa, como observado em isolados de *Venturia inaequalis* resistentes à trifloxistrobina e ao cresoxim-metílico (KOLLER et al., 2004). A mutação no códon 143 (G143A) do *cyt b* é o mecanismo de resistência mais associado à total falta de controle da doença no campo de vários fungos fitopatogênicos pelas estrobilurinas, como em *Magnaporthe oryzae* (KIM et al., 2003; CASTROAGUDIN et al., 2015). Os isolados de *M. fructicola* deste trabalho não apresentaram a resistência qualitativa, mas sim a mesma organização íntron-exon

que foi descrita em trabalhos anteriores com isolados de *M. fructicola* dos Estados Unidos, China, Austrália e Nova Zelândia (LUO et al., 2010; MIESSNER; STAMMLER, 2010; HILY et al., 2011). Todos os isolados de *M. fructicola*, avaliados até o momento, possuem o íntron do tipo I após o códon 143, confirmando a grande homogeneidade intra específica (LUO et al., 2010; MIESSNER; STAMMLER, 2010; HILY et al., 2011). Além do agente causal da podridão parda, o íntron já foi relatado em basidiomicetos (GRASSO et al., 2006), *Botrytis cinerea* (BANNO et al., 2009) e *Phyllosticta* spp. (STAMMLER et al., 2013; HINCAPIE et al., 2014). Isolados de *Botrytis cinerea* podem ou não apresentar o íntron após o códon 143 (BANNO et al., 2009), nos quais houve a introdução do íntron e perderam a capacidade de desenvolver resistência à azoxistrobina baseada na mutação do G143A (YIN et al., 2012). Supostamente, a introdução do íntron nas espécies de *Monilinia* (YIN et al., 2012) ocorreu com eventos independentes e a consequência dessa introdução é a dificuldade da perpetuação da mutação no códon 143 e, como consequência, a resistência total às estrobilurinas.

O impacto da presença do íntron depois do códon 143 na ocorrência da resistência prática no campo ainda é desconhecido. No entanto, é possível verificar a ocorrência da resistência prática em laboratório, por exemplo, com experimentos em frutos destacados. Os resultados desses experimentos são diretamente relacionados com as informações obtidas nos experimentos *in vitro* de CE₅₀. Frutos com ferimento e tratados com azoxistrobina inoculados com isolados resistentes de *M. fructicola* a esse fungicida apresentaram sintomas de podridão parda, enquanto que aqueles inoculados com isolados sensíveis não apresentaram frutos doentes (AMIRI; BRANNEN; SCHNABEL, 2010; CHEN et al., 2014). Os isolados resistentes do presente trabalho não apresentaram elevada incidência nos frutos tratados com azoxistrobina, provavelmente pelo fato do experimento ter sido realizado em frutos sem ferimento.

Na área da fitopatologia, a maioria dos trabalhos de adaptabilidade que comparam diferentes variáveis analisadas dos isolados sensíveis com os resistentes, como esporulação, diâmetro da colônia, germinação de conídios, utiliza técnicas de análise univariada (BARALDI et al., 2003; BARDAS; MYRESIOTIS; KARAOGLANIDIS, 2008; CHEN et al., 2014). Essa análise é de fácil interpretação e conclusão quando poucas variáveis são analisadas, como constatada nos experimentos do presente trabalho para caracterização dos isolados *in vitro*. A

produção de conídios e a taxa de crescimento micelial *in vitro* foram semelhantes entre os isolados de *M. fructicola* sensíveis e resistentes à azoxistrobina. O mesmo foi observado em isolados de *Alternaria alternata* resistentes à azoxistrobina (KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2011) e em isolados de *M. fructicola* resistentes ao propiconazol (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007). Quando muitas variáveis são analisadas, aumenta-se a dificuldade em se obter um único resultado, pois o custo adaptativo da resistência pode estar relacionado a diferentes componentes monocíclicos. Por exemplo, isolados resistentes de *Penicillium expansum* ao tiabendazol não foram diferentes dos isolados sensíveis nos experimentos *in vitro*, mas a severidade da doença nos frutos inoculados com isolados resistentes foi maior que a dos sensíveis (BARALDI et al., 2003). Dentro desse contexto, a análise multivariada permite complementar a caracterização fenotípica e realizar associações e agrupamentos entre os isolados com diferentes variáveis analisadas. Uma das técnicas da análise multivariada é a análise de componentes principais que tem como objetivo examinar as correlações entre as variáveis, avaliar a importância de cada uma delas, resumir o grande conjunto dessas variáveis em outro menor e de sentido biológico e agrupar os indivíduos de acordo com o grau de similaridade (LIBERATO, 1995). Essa técnica multivariada é amplamente utilizada na área de melhoramento vegetal (CORREIA et al., 2014; SILVA et al., 2014; VIVAS et al., 2015), enquanto que na área de resistência de fungos a fungicidas ainda são raros os trabalhos (POMERANTZ et al., 2014). No presente estudo, em que múltiplas variáveis foram analisadas nos experimentos *ex vivo*, a abordagem multivariada é melhor que a univariada, simplificando os dados e agrupando os isolados com diferentes fenótipos de resistência. Observando os gráficos de correlações e biplot podemos confirmar correlações já esperadas biologicamente, em que os períodos de incubação e de latência correlacionam-se negativamente com o número de conídios produzidos e com o diâmetro da lesão. O dendograma do experimento *ex vivo* mostrou que os isolados resistentes podem ser agrupados com os isolados sensíveis, não apresentando diferenças no conjunto das variáveis analisadas integralmente.

Quando a resistência às estrobilurinas é governada por mutações no *cyt b*, não é esperada uma desvantagem adaptativa nos isolados resistentes. Na maioria dos casos, o rearranjo no genoma mitocondrial de fungos resistentes às estrobilurinas, por causa da mutação, não afeta os processos metabólicos (GISI et al., 2002). Isso

foi observado em isolados de *Botrytis cinerea* resistentes a piraclostrobina (KIM; XIAO, 2011) e em isolados de *Venturia inaequalis* resistentes à trifloxistrobina (FREDERICK et al., 2014), nos quais a resistência manteve-se estável após sucessivas transferências dos fungos em meio de cultura sem fungicida. O comportamento da estabilidade da resistência à azoxistrobina em isolados sem a mutação no *cyt b* foi pouco explorado e o mecanismo responsável pela resistência a essa estrobilurina pode ou não ser influenciado ou silenciado pelas consecutivas transferências. Neste trabalho, foi observado que, até a décima transferência, não houve alteração na sensibilidade dos isolados de *M. fructicola* resistentes à azoxistrobina. Essa conclusão difere da observada para isolados de *M. fructicola* resistentes ao ingrediente ativo propiconazol (grupo químico dos triazóis), nos quais apresentaram aumento na sensibilidade ao fungicida, após transferências consecutivas *in vitro*, apesar de não apresentarem diferenças na germinação, esporulação e crescimento micelial (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007; ZHU; BRYSON; SCHNABEL, 2012). Os triazóis atuam na via bioquímica de produção de esterol, como inibidores da enzima esterol 14 α -desmetilase, e cada ingrediente ativo pode ter um potencial de ligação diferente com essa enzima, além de outros mecanismos de resistência serem associados aos triazóis (SCHNABEL; DAI, 2004; LUO; SCHNABEL, 2008b). Para os isolados de *M. fructicola*, a resistência ao propiconazol não foi relacionada com mutações no sítio de ação, mas sim com a superexpressão do gene que codifica essa enzima devido ao elemento 'Mona' próximo a esse gene (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007; LUO; SCHNABEL, 2008b). Aparentemente, essa superexpressão gera um custo adaptativo ao patógeno, se o fungo for resistente somente ao propiconazol. Novos estudos relatam que se os isolados de *M. fructicola* forem resistentes ao propiconazol e à boscalida (dupla resistência), não há redução na sensibilidade aos fungicidas e as resistências se mantêm ao longo das transferências (CHEN et al., 2013). Esses isolados com dupla resistência, apresentaram o elemento 'Mona' e não foi observada mutação que confere resistência à boscalida. A influência da resistência à boscalida na estabilidade ao longo das transferências não foi explorada nos experimentos.

Os experimentos de habilidade competitiva entre isolados resistentes e sensíveis são importantes, pois os fungos fitopatogênicos podem apresentar estabilidade da resistência na ausência do fungicida quando estudados isoladamente, mas não serem competitivos quando misturados com isolados

sensíveis, como visto em isolados de *Botrytis cinerea* resistentes à piraclostrobina (KIM; XIAO, 2011). Com os avanços das técnicas moleculares, há a tendência dos experimentos de habilidade competitiva serem avaliados por PCR quantitativo, detectando e quantificando a mutação responsável pela resistência (KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2011; MICHALECKA et al., 2011; FINGER et al., 2014). Apesar dessa tendência, para alguns fitopatógenos não é possível o uso dessa técnica, pois até o momento não há conhecimento de diferenças moleculares entre os isolados resistentes e sensíveis. Assim, experimentos considerados como trabalhosos e demorados quando comparados com os moleculares são a única alternativa.

A variável analisada e o substrato para o desenvolvimento dos experimentos para avaliar a habilidade competitiva de isolados resistentes de *M. fructicola* à azoxistrobina devem ser aperfeiçoados para aumentar a eficiência desses experimentos. A variável analisada, como número de unidades formadoras de colônia (UFC), conídios germinados ou crescimento micelial, deve ser escolhida de acordo com o processo metabólico do fungo que apresenta maior sensibilidade ao fungicida. Para o caso das estrobilurinas, as variáveis mais indicadas são UFC e conídios germinados, pois a etapa de germinação dos conídios é o estágio mais sensível (STENERSEN, 2004; OLIVER; HEWITT, 2014). A avaliação de UFC apresenta contratempos. Neste trabalho, por exemplo, a proporção inicial de isolados resistentes não foi próxima à esperada (50 %), dificultando a análise e as conclusões. Esse fato pode ser devido à influência da via alternativa de respiração no crescimento micelial, como será discutido posteriormente. Além disso, para avaliar UFC há necessidade de um elevado número de placas, em razão da variação entre as repetições, tornando-a inadequada para esse tipo de experimento. O substrato deve ser preferencialmente frutos *in natura*, mas a utilização de pêssego enlatado como substrato possibilita a realização de experimentos na entressafra do pêssego, além de padronizar e eliminar a influência da qualidade dos frutos em todas as transferências. O trabalho com pêssego *in natura* restringe a realização dos experimentos à sua época de produção que, no Brasil, concentra-se no período de agosto a fevereiro. Adicionalmente, o período de colheita de cada cultivar é ainda mais restrito, de um a dois meses. Assim, um máximo de 60 dias está disponível para que os experimentos possam ser repetidos com a mesma cultivar. Além da safra reduzida e pelo fato de se utilizar pêssegos de produtores comerciais, há

diversos fatores que são de difícil controle, influenciam nas análises do experimento e, conseqüentemente, atrasam o andamento do projeto. O uso de produtos pré ou pós-colheita, realizado rotineiramente pelos produtores, pode inibir o desenvolvimento do patógeno e influenciar o resultado do experimento. Diversas variáveis climáticas, como falta ou excesso de chuva e granizo, resultam em frutos de pior qualidade e menor oferta de frutos, além de desregular a oferta dos cultivares de pêssego. A antecipação do período ideal da colheita juntamente com o armazenamento em câmaras frias podem causar desidratação dos frutos, diminuindo a sua qualidade.

Neste trabalho utilizou-se uma dupla de isolados de *M. fructicola* na proporção de 50 % de isolados resistentes com sensíveis e em todas os métodos analisados, o isolado resistente apresentou habilidade competitiva semelhante à do isolado sensível. Com a definição da metodologia, será desejável a realização de experimentos com diferentes duplas de isolados resistentes e sensíveis e com diferentes proporções desses isolados, pois a competição pode ser isolado-dependente, como observado para isolados de *Botrytis cinerea* resistentes à anilopirimidina (BARDAS; MYRESIOTIS; KARAOGLANIDIS, 2008) e *Alternaria alternata* resistentes à azoxistrobina (KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2011). Experimentos com condições não ideais ao fungo também necessitam ser realizados, pois isolados resistentes podem apresentar vantagens adaptativas na presença do fungicida em condições adversas. Isolados de *M. fructicola* com baixa resistência ao benomil e ausência de mutação no gene da β - tubulina (códon 198) foram sensíveis ao frio, não apresentando crescimento em meio de cultura com fungicida em baixa temperatura (15 °C), mas em alta temperatura (30 °C) apresentaram crescimento no meio de cultura com fungicida. Os isolados de *M. fructicola* com alta resistência ao benomil e a mutação no códon 198 foram sensíveis à alta temperatura (MA; YOSHIMURA; MICHAILIDES, 2003).

Apesar da presença do íntron após o códon 143 implicar em um baixo risco para o desenvolvimento da resistência total nos isolados resistentes de *M. fructicola* à azoxistrobina, estratégias antirresistência não deverão ser descartadas. Tais precauções deverão minimizar problemas futuros no controle da doença, visto que está ocorrendo mudança na sensibilidade do fungo ao fungicida (MORALES et al,

em fase de elaboração²). Outros mecanismos devem ser estudados para melhor compreensão da evolução da resistência de *M. fructicola* à azoxistrobina, como a via alternativa de respiração (via AOX). Há hipótese de que os compostos antioxidantes das plantas liberados durante o processo de infecção silenciam os genes responsáveis por essa via, mas não deve ser desconsiderada como um provável mecanismo de resistência (MA; MICHAILIDES, 2005; FERNANDEZ-ORTUÑO et al., 2008). Apesar da via AOX produzir pouca energia, ela auxilia o fungo a continuar se desenvolvendo dentro do hospedeiro (AVILA-ADAME; KOLLER, 2002, 2003b). Para *Moniliophthora perniciosa*, a via AOX é fundamental para o desenvolvimento biotrófico do patógeno, regula a transição para seu estágio necrotrófico e confere resistência do fungo à azoxistrobina em todos os estágios miceliais (THOMAZELLA et al., 2012). Para *Magnaporthe grisea*, já foi constatado que a via AOX auxilia no desenvolvimento micelial dos isolados resistentes em plantas tratadas com azoxistrobina (AVILA-ADAME; KOLLER, 2002). Em isolados de *M. fructicola*, constatou-se que essa via alternativa de respiração é induzida de forma limitada, auxiliando o crescimento micelial dos isolados em meio de cultura quando somente com azoxistrobina, mas sua importância *in vivo* é desconhecida (SCHNABEL; DAÍ; PARADKAR, 2003).

² MORALES, R.G.F.; PEREIRA, W.V.; AMORIM, L.; MAY-DE-MIO, L.L. (Universidade Federal do Paraná). **Sensibilidade de população de isolados *Monilinia fructicola* de 2002 a 2011 ao fungicida azoxistrobina no Brasil relacionado a eficiência do produto no controle da doença.**

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que a resistência à azoxistrobina é uma característica estável e não implica em custo adaptativo para isolados de *Monilinia fructicola*. Os isolados resistentes de *M. fructicola* mostraram competitividade similar aos sensíveis, portanto, podem permanecer na população na ausência do fungicida. Isso reforça a necessidade de estratégias antirresistência.

Recomenda-se que experimentos de habilidade competitiva sejam realizados com pêssegos enlatados em substituição aos frutos *in natura*, permitindo a continuidade dos experimentos na entressafra do pêssego. Também se recomenda nesses experimentos, que a variável utilizada para medir a população de isolados resistentes seja a proporção de conídios germinados, uma vez que é possível inibir a via alternativa de respiração nessa fase.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F.M.; LOURENÇO, S.A.; BASSETTO, E.; GONÇALVES, F.P.; MARTINS, M.C; AMORIM, L. Efeito de sanificantes no controle pós-colheita da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pêssegos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 83-85, 2008.
- AGROFIT. - SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. 2015. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 mar. 2015.
- ALMUGHRABI, K.I.; GRAY, A.B. Competition between triadimefon-sensitive and triadimefon-resistant isolates of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 7, p. 709-712, July 1995.
- AMIRI, A.; BRANNEN, P.M.; SCHNABEL, G. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 6, p. 737-743, June 2010.
- AMIRI, A.; ZUNIGA, A.I.; MERTELY, J.; PERES, N.A. First report on resistance to pyraclostrobin, thiophanate-methyl, fenhexamid and boscalid in *Botrytis cinerea* from eucalyptus seedlings in Florida greenhouses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 6, p. 1, June 2014.
- AVILA-ADAME, C.; KOLLER, W. Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 5, p. 493-500, May 2002.
- AVILA-ADAME, C.; KOLLER, W. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. **Current Genetics**, Berlin, v. 42, n. 6, p. 332-338, Mar. 2003a.
- _____. Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to Qo-inhibiting fungicides. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 59, n. 3, p. 303-309, Mar. 2003b.
- BANNO, S.; YAMASHITA, K.; FUKUMORI, F.; OKADA, K.; UEKUSA, H.; TAKAGAKI, M.; KIMURA, M.; FUJIMURA, M. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome b gene. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 120-129, Feb. 2009.
- BARALDI, E.; MARI, M.; CHIERICI, E.; PONDRELLI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G.C. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 362-370, June 2003.
- BARDAS, G.A.; MYRESIOTIS, C.K.; KARAOGLANIDIS, G.S. Stability and fitness of anilopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 4, p. 443-450, Apr. 2008.

BASSETO, E. **Quantificação de danos ao longo da cadeia produtiva de pêssego e avaliação de métodos alternativos de controle de doenças pós-colheita**. 2006. 126 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

BLEICHER, J. Doenças de rosáceas de caroço. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1997. cap. 59, p.621-627.

BOLTON, M.D.; RIVERA, V.; SECOR, G. Identification of the G143A mutation associated with Qol resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan, United States. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 69, n. 1, p. 35-39, Jan. 2013.

BOSTOCK, R.M.; WILCOX, S.M.; WANG, G.; ADASKAVEG, J.E. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 54, n. 1/2, p. 37-50, Jan./Feb. 1999.

BOTTON, M.; BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S. Ocorrência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) danificando pêssegos na Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 503-505, jul./set. 2003.

BYRDE, R.J.W.; WILLETTS, H.J. **The brown rot fungi of fruit: their biology and control**. New York: Pergamum Press, 1977. 171 p.

CASTROAGUDIN, V.L.; CERESINI, P.C.; DE OLIVEIRA, S.C.; REGES, J.T.A.; MACIEL, J.L.N.; BONATO, A.L.V.; DORIGAN, A.F.; MCDONALD, B.A. Resistance to Qol fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, n. 3, p. 284-294, Mar. 2015.

CHEN, F.; LIU, X.; CHEN, S.; SCHNABEL, E.; SCHNABEL, G. Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both propiconazole and boscalid. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 5, p. 645-651, May 2013.

CHEN, S.N.; SHANG, Y.; WANG, Y.; SCHNABEL, G.; LIN, Y.; YIN, L F.; LUO, C.X. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from peach farms in china to four fungicides and characterization of isolates resistant to carbendazim and azoxystrobin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 11, p. 1555-1560, Nov. 2014.

CORREIA, K.C.; SILVA, E.K.C.; CAMARA, M.P.S.; SALES JUNIOR, R.; MIZUBUTI, E.S.G.; ARMENGOL, J.; GARCIA-JIMENEZ, J.; MICHEREFF, SAMI J. Fitness components of *Monosporascus cannonballus* isolates from northeastern Brazilian melon fields. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 217-223, May/June 2014.

COX, K.D.; BRYSON, P.K.; SCHNABEL, G. Instability of propiconazole resistance and fitness in *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 4, p. 448-453, Apr. 2007.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

ELMER, P.A.G.; GAUNT, R.E.; FRAMPTON, C.M. Spatial and temporal characteristics of dicarboximide-resistant strains of *Monilinia fructicola* and brown rot incidence in stone fruit. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 530-536, Aug. 1998.

EMBRAPA. **Sistema de produção de pêssego de mesa na região da Serra Gaúcha**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessegueo/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/>>. Acesso em: 06 ago. 2013.

EMERY, K.M.; MICHAILIDES, T.J.; SCHERM, H. Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 8, p. 853-857, Aug. 2000.

FACHINELLO, J.C.; TIBOLA, C.S.; VICENZI, M.; PARISOTTO, E.; PICOLOTTO, L.; MATTOS, M.L.T. Produção integrada de pêssegos: três anos de experiência na região de Pelotas - RS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 256-258, ago. 2003.

FARBER, R.B.K.; CHIN, K.M.; LEADBITTER, N. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 58, n. 3, p. 261-267, Mar. 2002.

FERNANDEZ-ORTUÑO, D.; GRABKE, A.; BRYSON, P.K.; AMIRI, A.; PERES, N.A.; SCHNABEL, G. Fungicide Resistance Profiles in *Botrytis cinerea* from southern state strawberry fields. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 6, p. 825-833, June 2014.

FERNANDEZ-ORTUÑO, D.; TORES, J.A.; DE VICENTE, A.; PEREZ-GARCIA, A. Mechanisms of resistance to Qol fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, Barcelona, v. 11, n. 1, p. 1-9, Mar. 2008.

FERNANDEZ-ORTUÑO, D.; TORES, J.A.; DE VICENTE, A.; PEREZ-GARCIA, A. The Qol fungicides, the rise and fall of a successful class of agricultural fungicides. In: CARISSE, O. (Ed.). **Fungicides**. Rijeka: InTech Publ., 2013. chap. 10, p. 203-220.

FINGER, M.J.; STEVENSON, K.L.; JI, P. Stability of azoxystrobin resistance and fitness of fungicide-sensitive and resistant field isolates of *Didymella bryoniae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 6, p. 43-44, June 2013.

FINGER, M.J.; PARKUNAN, V.; JI, P.; STEVENSON, K.L. Allele-specific PCR for the detection of azoxystrobin resistance in *Didymella bryoniae*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 12, p. 1681-1684, Dec. 2014.

FONTES, J.F.; OSORIO, V.A. **Pêssego: fitossanidade**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. 53 p.

FREDERICK, Z.A.; VILLANI, S.M.; COOLEY, D.R.; BIGGS, A.R.; RAES, J.J.; COX, K.D. Prevalence and stability of qualitative Qol resistance in populations of *Venturia inaequalis* in the northeastern united states. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 8, p. 1122-1130, Aug. 2014.

FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. **List of pathogens with field resistance towards Qol fungicides**. 2012. Disponível em: <[http://www.frac.info/work/Species%20with%20Qol-resistance%20\(Status%20Dec.%202012\)l.pdf](http://www.frac.info/work/Species%20with%20Qol-resistance%20(Status%20Dec.%202012)l.pdf)>. Acesso em: 14 jul. 2013.

GENET, J.L.; JAWORSKA, G.; DEPARIS, F. Effect of dose rate and mixtures of fungicides on selection for Qol resistance in populations of *Plasmopara viticola*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 62, n. 2, p. 188-194, Fev. 2006.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GISI, U.; SIEROTZKI, H.; COOK, A.; MCCAFFERY, A. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 58, n. 9, p. 859-867, Sept. 2002.

GONÇALVES, F.P.; MARTINS, M.C.; SILVA, G.J.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Postharvest control of brown rot and *Rhizopus* rot in plums and nectarines using carnauba wax. **Postharvest Biology and Technology**. Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 211-217. Dez 2010.

GRASSO, V.; SIEROTZKI, H.; GARIBALDI, A.; GISI, U. Characterization of the cytochrome b gene fragment of *Puccinia* species responsible for the binding site of Qol fungicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 84, n. 2, p. 72-82, Feb. 2006.

HILY, J.M.; SINGER, S.D.; VILLANI, S.M.; COX, K.D. Characterization of the cytochrome b (cyt b) gene from *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruit and its significance in the development of Qol resistance. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 67, n. 4, p. 385-396, Apr. 2011.

HINCAPIE, M.; WANG, N.Y.; PERES, N.A.; DEWDNEY, M.M. Baseline sensitivity of *Guignardia citricarpa* isolates from Florida to azoxystrobin and pyraclostrobin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 6, p. 780-789, June 2014.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous inference in general parametric models. **Biometrical Journal**, Berlim, v. 50, n. 3, p. 346-363, June 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA.

Produção integrada de pêssego – PIP: grade de agroquímicos. 2003. Disponível em:

<<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/pessegueo/gradeAgroquimicos.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2013.

ISHII, H.; FRAAIJE, B.A.; SUGIYAMA, T.; NOGUCHI, K.; NISHIMURA, K.; TAKEDA, T.; AMANO, T.; HOLLOMON, D.W. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew.

Phytopathology, Saint Paul, v. 91, n. 12, p. 1166-1171, Dec. 2001.

KARAOGLANIDIS, G.S.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J. Competitive ability and fitness of *Alternaria alternata* isolates resistant to QoI fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 2, p. 178-182, Feb. 2011.

KESKE, C.; AMORIM, L.; MAY-DE-MIO, L.L. Peach brown rot incidence related to pathogen infection at different stages of fruit development in an organic peach production system. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 7, p. 802-806, July 2011.

KIM, Y.K.; XIAO, C.L. Stability and fitness of pyraclostrobin- and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 11, p. 1385-1391, Nov. 2011.

KIM, Y.S.; DIXON, E.W.; VINCELLI, P.; FARMAN, M.L. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 7, p. 891-900, July 2003.

KOLLER, W.; PARKER, D.M.; TURECHEK, W.W.; AVILA-ADAME, C.; CRONSHAW, K. A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 5, p. 537-544, May 2004.

LEADBEATER, A. Resistance risk to QoI fungicides and anti-resistance strategies. In: THIND, T.S. (Ed.). **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. Oxfordshire: CABI, 2012. chap. 12, p.141-154.

LIBERATO, J.R. **Aplicação de técnica de análise multivariada em fitopatologia**. 1995. 144 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

LIM, T.H.; YI, J.C.; CHANG, T.H.; BYEONGJIN, C. Fitness of dicarboximide-resistant and sensitive *Monilinia fructicola* isolated from peach in Korea. **The Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 17, n. 4, p. 205-209, May 2001.

LIMA, L.M.; CAIXETA FILHO, J.V.; KASSOUF, A.L.; AMORIM, L. Valoração de atributos de qualidade em pêssegos comercializados no estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 465-484, jun. 2009.

LUO, C.X.; SCHNABEL, G. Adaptation to fungicides in *Monilinia fructicola* isolates with different fungicide resistance phenotypes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 2, p. 230-238, Feb. 2008a.

_____. The cytochrome p450 lanosterol 14 alpha-demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 2, p. 359-366, Jan. 2008b.

LUO, C.X.; HU, M.J.; JIN, X.; YIN, L.F.; BRYSON, P.K.; SCHNABEL, G. An intron in the cytochrome b gene of *Monilinia fructicola* mitigates the risk of resistance development to Qol fungicides. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 66, n. 12, p. 1308-1315, Dec. 2010.

LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J. Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 9, p. 864-872, Sept. 2001.

LUO, Y.; MORGAN, D.P.; MICHAILIDES, T.J. Risk analysis of brown rot blossom blight of prune caused by *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 8, p. 759-768, Aug. 2001.

MA, B.; UDDIN, W. Fitness and competitive ability of an Azoxystrobin-resistant g143a mutant of *Magnaporthe oryzae* from perennial ryegrass. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 10, p. 1044-1049, Oct. 2009.

MA, Z.H.; MICHAILIDES, T.J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, n. 10, p. 853-863, Oct. 2005.

MA, Z.H.; YOSHIMURA, M.A.; MICHAILIDES, T.J. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7145-7152, Dec. 2003.

MAECHLER, M.; ROUSSEEUW, P.; STRUYF, A.; HUBERT, M.; HORNIK, K. **The cluster package**: cluster analysis basics and extensions; R package version 2.0.1. 2015. 79 p. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/>>. Acesso em: 09 fev. 2015.

MARTINS, M.C.; BETTI, J.A.; LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE, R.P.; AMORIM, L. Doenças das rosáceas de caroço. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, cap. 62, p. 545-557.

MAY-DE MIO, L.L.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-Methyl and implications for disease management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 7, p. 821-827, July 2011.

MAY-DE MIO, L.L.; MOREIRA, L.M.; MONTEIRO, L.B.; JUSTINIANO JÚNIOR, P.R. Infecção de *Monilinia fructicola* no período da floração e incidência de podridão parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 227-234, jun. 2008.

MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1998. 350 p.

MICHALECKA, M.; MALINOWSKI, T.; BRONIAREK-NIEMIEC, A.; BIELENIN, A. Real-time PCR assay with SNP-specific primers for the detection of a G143A mutation level in *Venturia inaequalis* field populations. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 7/8, p. 569-578, Aug. 2011.

MEISSNER, S.; STAMMLER, G. *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 117, n. 4, p. 162-167, Aug. 2010.

MURDOCH, D.; CHOW, E.D. **The ellipse package**: functions for drawing ellipses and ellipse-like confidence regions; R package version 0.3-8. 2015. 15 p. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/>>. Acesso em: 09 fev. 2015.

OGAWA, J.M.; ENGLISH, W.H.; WILSON, E.E. Survey for brown rot of stone fruits in California. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 38, n. 4, p. 254-257, Apr. 1954.

OGAWA, J.M.; MANJI, B.T.; SCHREADER, W.R. *Monilinia* life cycle on sweet cherries and its control by overhead sprinkler fungicide applications. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 59, n. 11, p. 876-880, Nov. 1975.

OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIGGS, A.R. Brown rot. In: OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIRD, G.W.; RITCHIE, D.F.; URIU, K.; UYEMOTO, J.K. (Ed.). **Compendium of stone fruit diseases**. St. Paul: APS Press, 1995. p. 7-10.

OLIVER, R.; HEWITT, H.G. **Fungicides in crop protection**. 2nd ed. Oxfordshire: CABI Publ.; CAB International, 2014. 200 p.

PALOU, L.; CRISOSTO, C.H.; SMILANICK, J.L.; ADASKAVEG, J.E.; ZOFFOLI, J.P. Effects of continuous 0,3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 39-48, Jan. 2002.

PARIAUD, B.; RAVIGNE, V.; HALKETT, F.; GOYEAU, H.; CARLIER, J.; LANNOU, C. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 409-424, Jun. 2009.

POMERANTZ, A.; COHEN, Y.; SHUFAN, E.; BEN-NAIM, Y.; MORDECHAI, S.; SALMAN, A.; HULEIHEL, M. Characterization of *Phytophthora infestans* resistance to mefenoxam using FTIR spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology**, Lausanne, v. 141, p. 308-314, Dec. 2014.

PRINGLE, A.; TAYLOR, J.W. The fitness of filamentous fungi. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 10, n. 10, p. 474-481, Oct. 2002.

R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Core Team, 2014.

RANGEL, A.; MASCARO, F.D.A. **Cultura de pêssago e nectarina: guia de identificação e monitoramento de pragas, doenças e inimigos naturais**. Campinas: CATI, 2007. 61 p.

RITCHIE, D.F. **Brown rot of stone fruits: the plant health instructor**. 2000. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/BrownRotStoneFruits.aspx>>. Acesso em: 04 jul. 2013.

SANTOS, J.D.; RASEIRA, M.C.B.; ZANANDREA, I. Resistance to brown rot in peach plants. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 2, p. 219-225, abr./jun. 2012.

SAUTER, H.; STEGLICH, W.; ANKE, T. Strobilurins: evolution of a new class of active substances. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 38, n. 10, p. 1329-1349, May 1999.

SCHNABEL, G.; DAI, Q. Heterologous expression of the P450 sterol 14 alpha-demethylase gene from *Monilinia fructicola* reduces sensitivity to some but not all DMI fungicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 78, n. 1, p. 31-38, Jan. 2004.

SCHNABEL, G.; DAI, Q.; PARADKAR, M.R. Cloning and expression analysis of the ATP-binding cassette transporter gene MFABC1 and the alternative oxidase gene MfAOX1 from *Monilinia fructicola*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 59, n. 10, p. 1143-1151, Oct. 2003.

SIEROTZKI, H.; WULLSCHLEGER, J.; GISI, U. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 68, n. 2, p. 107-112, Oct. 2000.

SILVA, J.O.C.; CREMASCO, J.P.G.; MATIAS, R.G.P.; SILVA, D.F.P. da; SALAZAR, A.H.; BRUCKNER, C.H. Genetic divergence among peach populations based on the characteristics of plant and fruit. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1770-1775, out. 2014.

SOUZA, D.C.; FAZZA, A.C.; CAMARGO, L.A.; MIO, L.M.; ANGELI, S.S.; AMORIM, L. First report of *Monilinia laxa* causing brown rot on peaches in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 6, p. S148-S149, June 2008.

SPERANDIO, E.M. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado**. 2012. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

STAMMLER, G.; SCHUTTE, G.C.; SPEAKMAN, J.; MIESSNER, S.; CROUS, P.W. *Phyllosticta* species on citrus: risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences. **Crop Protection**, Guildford, v. 48, p. 6-12, June 2013.

STENERSEN, J. **Chemical pesticides mode of action and toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 296 p.

TAEHEON, L.; JAECHOON, Y.; TAEHYUN, C.; BYEONGJIN, C. Fitness of dicarboximide-resistant and sensitive *Monilinia fructicola* isolated from peach in Korea. **Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 17, n. 4, p. 205–209, May 2001.

TATE, K.G.; OGAWA, J.M. Nitidulid beetles as vectors of *Monilinia fructicola* in California stone fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, n. 9, p. 977-983, Mar. 1975.

THOMAZELLA, D.P.T.; TEIXEIRA, P.J.P.L.; OLIVEIRA, H.C.; SAVIANI, E.E.; RINCONES, J.; TONI, I.M.; REIS, O.; GARCIA, O.; MEINHARDT, L.W.; SALGADO, I.; PEREIRA, G.A.G. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist**, London, v. 194, n. 4, p. 1025-1034, June 2012.

VILLANI, S.M.; COX, K.D. Molecular characterization and fungicide sensitivity profiling of *Monilinia laxa* from a cherry orchard in western NY. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 6, p. S135-S135, June 2009.

VIVAS, M.; SILVEIRA, S.F.; PIO-VIANA, A.; AMARAL-JUNIOR, A.T.; FERREGUETTI, G.A.; PEREIRA, M.G. Resistance to multiple foliar diseases in papaya genotypes in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 71, p. 138-143, May 2015.

WAGNER JÚNIOR, A.; RASEIRA, M.C.B.; PIEROBOM, C.R.; SILVA, J.B.; FRANZON, R.C. Avaliação de diferentes genótipos de pessegueiro quanto à reação à *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey em frutos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 2, p. 83-88, mar./abr. 2008.

YIN, L.F.; HU, M.J.; WANG, F.; KUANG, H.; ZHANG, Y.; SCHNABEL, G.; LI, G.Q.; LUO, C.X. Frequent gain and loss of introns in fungal cytochrome b genes. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. e49096, Nov. 2012.

YOUNG, J.R.; TOMASO-PETERSON, M.; TREDWAY, L.P.; DE LA CERDA, K. Occurrence and molecular identification of azoxystrobin-resistant *Colletotrichum cereale* isolates from golf course putting greens in the Southern United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 6, p. 751-757, June 2010.

ZHAN, J.; McDONALD, B.A. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 131-153, Jun. 2013.

ZHANG, Y.; HU, X.S.; CHEN, F.; WU, J.H.; LIAO, X.J.; WANG, Z.F. Stability and colour characteristics of PEF-treated cyanidin-3-glucoside during storage. **Food Chemistry**, Oxford, v. 106, n. 2, p. 669-676, Jan. 2008.

ZHENG, D.S.; OLAYA, G.; KOLLER, W. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. **Current Genetics**, Berlin, v. 38, n. 3, p. 148-155, Oct .2000.

ZHU, F.; BRYSON, P.K.; SCHNABEL, G. Influence of storage approaches on instability of propiconazole resistance in *Monilinia fructicola*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, n. 7, p. 1003-1009, July 2012.

ANEXOS

Anexo A - Regressão de cada isolado de *Monilinia fructicola* utilizado para estudo da caracterização com valor médio da concentração efetiva capaz de inibir 50 % da germinação (CE_{50}) dos dois experimentos. Círculos cheios e linha contínua representam o experimento 1 e círculos vazios e linha pontilhada representam o experimento 2

Anexo B - Valores de esporulação ($\times 10^4$ conídios.mL⁻¹), germinação (%), diâmetro no meio com fungicida (cm) e taxa de crescimento micelial (cm.dia⁻¹) no meio sem fungicida dos isolados resistentes (SP08345 e SP09839) e sensível (PR09839) de *Monilinia fruticola* nas respectivas transferências que foi realizada a avaliação de cada variável

	Transferência	Isolados		
		PR09638	SP08345	SP09839
Esporulação ($\times 10^4$ conídios. mL ⁻¹) ¹	T0	2,86 aA	2,29 aA	2,26 aA
	T3	1,61 bAB	1,84 aA	1,07 bB
	T6	0,63 cB	1,03 bAB	1,13 bA
	T10	2,19 abA	2,17 aA	1,75 abA
Germinação (%) ²	T0	66,3 aB	81,2 aA	71,5 aB
	T3	71,7 aA	67,9 bcA	73,7 aA
	T6	72,5 aA	77,7 abA	77,7 aA
	T10	51,4 bA	57,3 cA	51 bA
Diâmetro (cm) no meio com fungicida ³	T0	0	0,64 aA	0,59 aA
	T3	0	0,60 aA	0,63 aA
	T6	0	0,80 aA	0,84 aA
	T10	0	0,63 aA	0,69 aA
Taxa de crescimento micelial (cm.dia ⁻¹) no meio sem fungicida	T0	0,92 dA	0,48 abcC	0,62 abcB
	T1	1,13 aA	0,42 bcC	0,54 abcB
	T2	1,12 abA	0,46 abcB	0,53 abcB
	T3	1,06 abcA	0,43 bcB	0,50 cB
	T4	0,97 A	0,4 cC	0,56 abcB
	T5	1,13 aA	0,47 abcC	0,6 abcB
	T6	1,09 abcA	0,55 abC	0,65 aB
	T7	1,00 bcdA	0,5 abcB	0,53 abcB
	T8	1,09 abcA	0,56 aB	0,63 abB
	T9	1,07 abcA	0,39 cC	0,52 bcB
	T10	0,99 bcdA	0,50 abcB	0,51 bcB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. ¹ Valores transformados para raiz cúbica. ² Valores transformados para logit. ³ Valores transformados para o Log₁₀ (x + 0,5)