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

**Podridão floral dos citros: definição do limiar de ação para controle
químico e monitoramento da sensibilidade de isolados a
tebuconazol e trifloxistrobina**

André Bueno Gama

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

**Piracicaba
2017**

André Bueno Gama
Engenheiro Agrônomo

**Podridão floral dos citros: definição do limiar de ação para
controle químico e monitoramento da sensibilidade de isolados
a tebuconazol e trifloxistrobina**

Orientadora:
Profa. Dra. **LILIAN AMORIM**

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

Piracicaba
2017

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

Gama, André Bueno

Podridão floral dos citros: definição do limiar de ação para controle químico e monitoramento da sensibilidade de isolados a tebuconazol e trifloxistrobina / André Bueno Gama. - - Piracicaba, 2017.

99 p.

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

1. Sistema de alerta 2. Sistema de previsão 3. EC50 4. DMI 5. QoI I.
Título

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por ser pai, mãe, amiga, batalhadora e trabalhadora, colocando a mim e a meu irmão como prioridades em sua vida

A meu irmão pela amizade, conselhos e companheirismo de vida.

A meu pai, pelo companheirismo e pelos valores a mim transferidos no breve (porém incrível) tempo de convivência

Dedico,

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me ajudar a ter paciência e foco na caminhada, além de ter colocado em meus caminhos tantas pessoas a quem devo agradecer.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico pela bolsa de mestrado de março a junho de 2015.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de mestrado de 2015 a 2017 (projeto Fapesp 2015/06007-2), e pela oportunidade de realização do estágio de pesquisa no exterior (BEPE – projeto 2015/19564-7).

À Professora Dra. Lilian Amorim pelo ótimo convívio, pela paciência e excelente orientação que recebi nos últimos 5 anos, por ter despertado em mim o interesse pela fitopatologia.

À minha família, Renata Helena Bueno Sátolo, Alexandre Sátolo, Maria de Lourdes da Gama, Lázaro da Gama, Maria Helena (Lelena) Rodrigues da Gama Cordeiro, Celso Cordeiro Junior, Maria Cristina Rodrigues da Gama Alves, Thiago Alves e aos meus avôs e avós, Antônio Pedrazza da Gama, Gentil Teixeira Bueno, Maria Marly de Almeida Bueno e Thereza Rodrigues de Castro da Gama pelo amor incondicional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP pelo auxílio e sugestões na execução deste trabalho.

A Silvia de Afonseca Lourenço e Luiz Antônio Ortiz pelo companheirismo, profunda amizade, pela disponibilidade de sempre em ajudar tanto em assuntos profissionais quanto pessoais, sempre com bom-humor e competência.

Ao Dr. Geraldo José da Silva Junior pelos valiosos ensinamentos e por se preocupar em elucidar todas as minhas dúvidas com a execução deste projeto, além de me fazer refletir sobre os problemas da citricultura.

À Profa. Dra. Natalia Aparecida Peres Lauretti, pela oportunidade de trabalhar no Gulf Coast Research and Education Center e pelas valiosas discussões acerca deste e de outros projetos.

À Profa. Dra. Maria Cândida Gasparoto, pela amizade e por me apoiar e incentivar na área de Fitopatologia.

À Dra. Maísa Ciampi Guillardí, Renata Brito e Renata Rebellato Linhares pela disponibilidade, orientação e ajuda nos trabalhos de análises moleculares.

A Bruna Momesso pelo incomparável profissionalismo e solicitude nos experimentos de laboratório.

A Gleison de Oliveira Santos, William Aparecido Dias e M.Sc. Marcelo Scapin pelo excelente trabalho em campo e companheirismo na execução deste projeto.

Aos amigos do GCREC, Nan-Yi Wang, Leandro Córdova, Michelle Oliveira, Rodrigo Borba Onofre, Bruna Forcelini, Elias Zuchelli, Erick Roldan, Adrian Zuñiga, Lorna Torcedo Carter, Teresa Seijo, Robert Martin e Bryan Hammons pela ajuda nos experimentos realizados na University of Florida

A Carolina Suguinoshita Rebello pelo grande profissionalismo, amizade e disponibilidade.

Aos “jovens” companheiros de laboratório e salinha, Dr. Antonio Fernandes Nogueira Junior, Bárbara Navarro (Istrú), Meyrielle Pires de Camargo, Renan Fernandes, Kelly Pazolini, Dra. Juliana Baggio, Luiz Rafael Pinto, Ricardo Feliciano, Isabela Vescove Primiano, Juan Edwards Molina e Josi Huffner Arruda pela forte amizade nos últimos anos, boa convivência e momentos de descontração.

Aos meus irmãos da República 10 Alqueires, especialmente a meus colegas Luiz Guilherme Mezzena Gobato (Rabicó), Giovani Penazzi (Xipa), Gabriel Pedroso (Quardpa), Saulo Augusto Quassi de Castro (Pótão), Fernando Silveira (ππr-aña), Victor Sanches (Mobilet), Felipe Carrara de Brito (/dara), Rafael Vicentini Popin (μni-céri) e Diego de Moura (Agap) pelos anos de amizade e crescimento pessoal.

EPÍGRAFE

*“Your beliefs become your thoughts,
Your thoughts become your words,
Your words become your actions,
Your actions become your habits,
Your habits become your values,
Your values become your destiny.”*
Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	11
Referências.....	14
2. DEFINIÇÃO DO LIMIAR DE AÇÃO PARA CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS	21
Resumo	21
Abstract.....	22
2.1. Introdução	22
2.2. Material e Métodos	25
2.2.1. Definição do limiar de ação para aplicação de fungicidas	25
2.2.2. Análise estatística	28
2.2.2.1. Comparação dos tratamentos utilizando modelos lineares generalizados.....	28
2.2.2.2. Análise econômica e comparação do número de aplicações de fungicidas entre tratamentos.....	28
2.3. Resultados.....	29
2.3.1. Safra de 2015	30
2.3.2. Safra 2016	36
2.4. Discussão	43
2.5. Conclusão.....	46
Referências.....	47
Anexos.....	53
3. MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DOS COMPLEXOS <i>Colletotrichum acutatum</i> E <i>C. gloeosporioides</i> A TEBUCONAZOL E TRIFLOXISTROBINA	61
Resumo	61
Abstract.....	62
3.1. Introdução	62
3.2. Material e métodos	65
3.2.1. Coleta e caracterização de isolados	65

3.2.2. Determinação da concentração efetiva de tebuconazol e trifloxistrobina para inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i>	67
3.2.3. Determinação da concentração efetiva (CE ₅₀) de trifloxistrobina para inibição da germinação de conídios de <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i> e relação com o método de inibição do crescimento micelial.....	70
3.2.4. Caracterização molecular de regiões do genoma relacionadas à resistência a Qols e DMIs em isolados do complexo <i>Colletotrichum acutatum</i>	70
3.3. Resultados	72
3.3.1. Coleta e caracterização molecular de isolados	72
3.3.2. Determinação da concentração efetiva de tebuconazol e trifloxistrobina para inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i>	73
3.3.3. Determinação da concentração efetiva (CE ₅₀) de trifloxistrobina para inibição da germinação de conídios de <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>C. gloeosporioides</i> e relação com o método de inibição do crescimento micelial.....	75
3.3.4. Caracterização molecular de regiões do genoma relacionadas à resistência a Qols e DMIs em isolados do complexo <i>Colletotrichum acutatum</i>	78
3.4. Discussão.....	81
3.5. Conclusão	86
Referências	86
Anexos	95

RESUMO

Podridão floral dos citros: definição do limiar de ação para controle químico e monitoramento da sensibilidade de isolados a tebuconazol e trifloxistrobina

A citricultura brasileira se destaca no mercado global de citros, apresentando altos valores de produção e produtividade. Dentre as diversas doenças que afetam a cultura, a podridão floral dos citros (PFC) vem ganhando destaque com o deslocamento de áreas produtoras para regiões mais favoráveis à ocorrência desta doença. A PFC, causada por espécies dos complexos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, é especialmente problemática em anos de temperaturas amenas e alta umidade. Os citricultores realizam pulverizações preventivas para o controle da PFC todos os anos, embora condições climáticas favoráveis à doença ocorram apenas ocasionalmente. Além do impacto econômico, as frequentes pulverizações com fungicidas aumentam a pressão de seleção sobre isolados resistentes, o que pode interferir na eficiência do controle químico. A utilização de sistemas de previsão de epidemias pode evitar que pulverizações desnecessárias de fungicidas sejam realizadas caso não haja condições favoráveis à ocorrência da doença. Para o desenvolvimento destes sistemas, é imprescindível determinar um limiar de ação para a aplicação de fungicidas nos pomares. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivos: (i) estabelecer um limiar de ação para a aplicação de fungicidas com base na germinação de conídios de *C. acutatum* que permita o controle a doença igualmente ou de forma mais eficiente do que o sistema de pulverização adotado pelos citricultores do sudoeste paulista; (ii) caracterizar a sensibilidade de isolados dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* à trifloxistrobina e ao tebuconazol *in vitro* e molecularmente, para identificar possíveis mudanças de sensibilidade das espécies a estes fungicidas. Para a definição do limiar de ação, tratamentos baseados em índices de risco foram comparados ao tratamento testemunha e ao calendário fixo de aplicações, usualmente adotado pelos produtores. A aplicação de fungicidas quando limiar de 15% de germinação de conídios era atingido, foi eficiente em controlar a doença e reduzir o número de aplicações de fungicidas. Nos ensaios de sensibilidade a fungicidas dois métodos foram utilizados para a determinação da CE₅₀: o da diluição em gradiente espiral para trifloxistrobina e tebuconazol e o da inibição da germinação de conídios para a trifloxistrobina. Foram utilizados isolados coletados entre 1999 e 2016. A CE₅₀ média da coleção de isolados de acordo com o método da diluição em gradiente espiral variou de 0,158 a 0,297 µg/ml e 0,1 a 0,182 µg/ml para trifloxistrobina e tebuconazol, respectivamente. Para a trifloxistrobina, de acordo com o método da inibição da germinação, a CE₅₀ média foi de 0,002 µg/ml. Não foram verificadas características moleculares nem valores de CE₅₀ atrelados à mudança de sensibilidade dos isolados.

Palavras-chave: *Colletotrichum acutatum*; Sistema de previsão; Sistema de alerta; DMI; QoI

ABSTRACT

Postbloom fruit drop: definition of the action threshold for chemical control and survey of isolates sensitivity to tebuconazole and trifloxystrobin

Brazilian citrus industry represents a significant share in the global citrus market. Amongst several diseases that affect the crop, postbloom fruit drop (PFD) has been gaining prominence in Sao Paulo with the displacement of citrus areas to regions in which weather conditions are more favorable to the occurrence of this disease. PFD, caused by species of the complexes *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*, is especially problematic in years of mild temperatures and high humidity. Citrus growers spray the orchards preventively for PFD control every year, although favorable climatic conditions do not occur regularly. In addition to the economic impact, this practice increases the selection pressure of fungicide resistant isolates, and may decrease the efficiency of chemical control in a long term. The use of disease forecasting systems is able to prevent unnecessary fungicide sprays. For the development of such systems, it is essential to determine an action threshold for the application of fungicides in the orchards. The objectives of this work were: (i) to establish an action threshold for fungicide sprays based on the germination of *C. acutatum* conidia; (ii) to characterize the sensitivity of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* isolates to trifloxystrobin and tebuconazole in vitro and molecularly. Regarding the definition of the action threshold, treatments based on risk indices were compared to the control treatments and calendar based sprays, usually adopted by growers. The 15% conidia germination threshold was efficient in controlling the disease and reducing the number of fungicide applications. In the fungicide sensitivity tests, two methods were used to determine the EC₅₀, the spiral gradient dilution for trifloxystrobin and tebuconazole, and the method of conidial germination inhibition for trifloxystrobin. Isolates collected between 1999 and 2016 were used. The mean EC₅₀ of the isolate collection determined by the spiral gradient dilution method ranged from 0.158 to 0.297 µg/ml and from 0.1 to 0.182 µg/ml for trifloxystrobin and tebuconazole, respectively. Mean EC₅₀ of trifloxystrobin estimated by the conidial germination inhibition method was 0.002 µg/ml. No mutations or EC₅₀ values indicated shifts of fungicide sensitivity on the isolates.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*; Disease warning system; Disease forecast system; DMI; QoI

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta expressiva importância no mercado mundial de citros, com altos valores absolutos de produção e produtividade. Em 2013, o País produziu 19.734.725 t de citros. Ainda que menor do que a produção da safra de 2011 (22.017.646 t), a produtividade por área neste período aumentou, passando de 23,88 t/ha para 24,58 t/ha, um aumento de aproximadamente 3% (Faostat, n.d.). Aumentos de produtividade somente são possíveis com melhorias no manejo da cultura, reduzindo a interferência negativa de fatores bióticos e abióticos que prejudicam a expressão do potencial genético das plantas.

A citricultura paulista vem apresentando forte migração das regiões norte e nordeste para o sudoeste do estado, pela menor ocorrência de doenças importantes, como cancro, clorose variegada dos citros e huanglongbing, valor baixo de terras e condições climáticas que excluem a necessidade de irrigação (Neves et al., 2010). Contudo, as condições climáticas dessa região durante o período da florada, nos meses de inverno, favorecem a ocorrência de epidemias explosivas da podridão floral dos citros (PFC), podendo causar até 80% de perdas de produção quando não são tomadas medidas adequadas de controle (Goes et al., 2008). A podridão floral dos citros é, portanto, um dos fatores bióticos que reduzem a produtividade dos pomares. A doença é causada por *Colletotrichum acutatum* (Timmer, 1999) e *C. gloeosporioides* (Lima et al., 2011; McGovern et al., 2012) e já foi relatada em diversos países do continente americano como México, Estados Unidos, Argentina e Brasil (Brown et al., 1996).

O inóculo sobrevive na forma de apressórios nas folhas das plantas de citros e de plantas daninhas (Frare et al., 2016) por meio de infecções quiescentes, que em condições favoráveis (alta umidade e presença de flores) produzem conídios e micélio, sem produção de acérvulos (Zulfiqar et al., 1996). Os conídios formados a partir dos apressórios servem de inóculo primário para infecções em cada safra (Timmer & Brown, 2000). Estas estruturas do patógeno são disseminadas principalmente por respingos de água, atingindo as pétalas, onde ocorre a infecção (Laranjeira et al., 2005).

Os sintomas são observados principalmente nas flores, que após serem infectadas apresentam pétalas ou botões florais com manchas de cor marrom

alaranjada (Timmer & Zitko, 1996) e tornam-se salmão-rosa pela formação de acérvulos do fungo (Feichtenberger et al., 1997). Os frutos, no início do desenvolvimento, tornam-se cloróticos e caem, deixando disco basal, cálice e pedúnculo no ramo reprodutivo da planta (Laranjeira et al., 2005). O nome popular dessa doença, “estrelinha”, vem dos cálices retidos que podem permanecer ali fixados por mais de um ano (Futch et al., 1989). Quando a doença ocorre em elevada intensidade, a produção é altamente reduzida e grande número de cálices retidos é observado (Roberto & Borges, 2001).

Para contornar esse problema, os citricultores do sudoeste paulista vêm realizando controle preventivo da doença por meio de pulverizações baseadas na fenologia do período de florescimento (Peres et al., 2004). Contudo, a PFC somente é problemática quando a florada das plantas coincide com épocas de chuvas prolongadas (Silva-Junior et al., 2014), condição que não necessariamente ocorre todos os anos. Por esse motivo, muitas vezes o controle é realizado sem que haja condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, o que resulta em custo desnecessário aos produtores, consumidores e possivelmente ao meio ambiente (Fry, 1982).

Uma das maneiras de potencializar a eficiência da aplicação de fungicidas é o uso de sistemas de previsão/alerta de doenças de plantas. Tais sistemas visam prever surtos ou aumentos na intensidade de doença, baseados tanto em fatores pregressos quanto futuros (Madden & Ellis, 1988). Um modelo matemático de previsão de epidemias de podridão floral dos citros foi originalmente desenvolvido na Flórida na década de 90 (Timmer & Zitko, 1993), utilizando como variáveis preditoras da doença a sua incidência (número de flores sintomáticas) e a quantidade acumulada de chuvas. Posteriormente esse modelo foi refinado com a adição da variável molhamento foliar a fim de torná-lo mais preciso (Timmer & Zitko, 1995; 1996). Um sistema de recomendação denominado Postbloom Fruit Drop-Fungicide Application Decision (PFD-FAD) foi desenvolvido mais recentemente e novas variáveis foram incluídas ao modelo inicialmente proposto por Timmer & Zitko (1993), como a quantidade e o estágio predominante de flores e o histórico da doença no pomar (Peres et al., 2002a). A avaliação experimental do PFD-FAD em pomares brasileiros mostrou que seu uso resulta em menor número de aplicações de fungicidas, sem que haja diminuição na produção de frutos em relação ao controle preventivo baseado em calendário (Peres, et al. 2002b; Peres et al., 2004).

Apesar de estar disponível na língua portuguesa (<http://pfd.ifas.ufl.edu/default.asp?lng=prt>), o PFD-FAD não vem sendo utilizado pela maioria dos produtores do sudoeste paulista por exigir que diversas variáveis sejam quantificadas ou estimadas no pomar, como o estágio predominante da florada, a quantidade de árvores com outras doenças, a quantidade de flores com sintomas de PFC e o histórico de incidência dessa doença na área.

Para que um sistema de alerta mais simples e automatizado seja disponibilizado aos produtores do sudoeste paulista, é fundamental que se determine o limiar de ação para controle da doença, ou seja, a determinação da “severidade de doença na qual medidas de controle necessitam ser tomadas para impedir que o limiar de dano econômico seja excedido” (Zadoks & Schein, 1979). Para este fim, neste estudo, a variável severidade da definição de Zadoks & Schein (1979) foi substituída pela germinação de conídios de *C. acutatum*, conforme utilizado na elaboração de sistemas de previsão das antracnoses da mangueira (Fitzell & Peak, 1984; Arauz, 2000) e do morangueiro (Mackenzie & Peres, 2012), também causadas por *C. acutatum*.

Além dos problemas já descritos anteriormente, a aplicação exacerbada de fungicidas aumenta a pressão de seleção de isolados resistentes dos fungos, fazendo com que a eficiência do produto seja prejudicada e, muitas vezes, que haja a necessidade de substituição do defensivo por outros de diferentes modos de ação. Esse problema vem sendo agravado pela substituição dos fungicidas de amplo espectro de ação por produtos de modo de ação mais específico (Brent, 1995). Uma ou múltiplas mutações podem ser responsáveis pelo aparecimento de isolados resistentes do fungo (Ma & Michailides, 2005). Inicialmente, indivíduos resistentes constituem pequena parte da população do patógeno. Tal proporção de isolados resistentes tende a crescer à medida que sua dominância é estabelecida pela eliminação dos indivíduos sensíveis pelo uso de fungicidas (Ma & Michailides, 2005).

Para amenizar esse problema algumas medidas podem ser adotadas, como: restringir a aplicação do fungicida apenas a períodos críticos baseando-se, por exemplo, em sistemas de previsão; usar misturas de fungicidas específicos com outros, de preferência inespecíficos; realizar monitoramento para detectar a presença de linhagens resistentes do patógeno (Dekker, 1982). Há aproximadamente quatro anos, o controle da PFC no sudoeste paulista vem sendo realizado com a pulverização de uma mistura de trifloxistrobina (QoI) e tebuconazol

(DMI). Inibidores de Qo, inibem a transferência de elétrons no mitocôndrio dos fungos se ligando ao sítio Qo do citocromo bc₁ e interferindo na síntese de ATP (Xiao et al., 2003). Já os DMIs inibem a síntese do ergosterol, composto essencial à formação de membranas fúngicas, se ligando à enzima 14 α -demetilase (Cools & Fraaije, 2012).

Normalmente a resistência de fungos aos Qols está relacionada à mutação pontual em três códons do gene do citocromo b (*Cytb*): mudança do aminoácido glicina para alanina na posição 143 (Gisi et al., 2002), de fenilalanina para leucina no códon 129 (Barlett et al., 2002), ou de glicina para arginina na posição 137 (Gisi et al., 2002). A resistência a Qol pode também ocorrer pela utilização de via alternativa de respiração por esses fungos (Joseph-Horne & Hollomon, 2000). Apesar da resistência de fungos fitopatogênicos aos DMIs ser relativamente rara, já foram relatados casos de indivíduos resistentes, em *Mycosphaerella graminicola*, por exemplo (Mavroeidi & Shaw, 2006). Existem quatro mecanismos que podem levar à ocorrência de isolados com diferentes níveis de resistência aos DMIs: a alteração da enzima CYP51 por mutação, a superexpressão do gene *CYP51*, o efluxo ativo melhorado dos DMIs e a modificação da biossíntese de esteróis (Cools & Fraaije, 2012). Até o momento, não há estudos que avaliem a sensibilidade de isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* patogênicos a citros a Qols ou a DMIs e tampouco, se houver resistência, quais modificações no genoma desses isolados conferem a eles tal característica.

Os objetivos principais deste trabalho foram: (i) estabelecer um limiar de ação para a aplicação de fungicidas com base na germinação de conídios de *C. acutatum* que controle a doença igualmente ou de forma mais eficiente do que o sistema de pulverização adotado atualmente pelos citricultores do sudoeste paulista; (ii) caracterizar a sensibilidade de isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* à trifloxistrobina e ao tebuconazol; (iii) analisar molecularmente os isolados a fim de identificar a quais complexos de espécies eles pertencem e detectar possíveis mutações relacionadas à resistência do fungo a esses fungicidas.

Referências

Arauz, L.F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. Plant disease 84:600-61.

Barlett, D.W.; Clough, J.M.; Godwin, J.R.; Hall, A.A.; Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest management Sci.* 58: 649-662. In: Ma, Z.; Michailides, T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24:853-863.

Brent, K.J. 1995. *Fungicide Resistance in Crop Pathogens: how can it be Managed*. Global Crop Protection Federation, Brussels.

Brown, A.E.; Screenivasaprasad, S.; Timmer, L.W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86:523-527.

Cools, H.J.; Fraaije, B.A. 2012. Chap. 5: Resistance to Azole Fungicides in *Mycosphaerella graminicola*. In: Thind, T.S. *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management*. CAB International.

Dekker, J. 1982. Countermeasures for avoiding fungicide resistance. In: Dekker, J.; Georgopoulos, G. *Fungicide Resistance in Crop Protection*. P. 177-186.

Faostat. Citrusfruit production quantities by country. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2015.

Feichtenberger, E.; Müller, G.W.; Guirado, N. 1997. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. *Manual de Fitopatologia Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres. 1997. P. 246-279.

Fitzell, R.D.; Peak, C.M. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: Inoculum sources, spore production and dispersal. *Annals of Applied Biology*. 104:53-59.

Frare, G.F., Couto, H.T.Z., Ciampi-Guillardi, M., Amorim, L. 2016. The causal agent of citrus postbloom fruit drop, *Colletotrichum acutatum*, can survive on weeds. Australasian Plant Pathol. (2016) 45: 339-346.

Fry, W.E. 1988. Principles of plant disease management. 1982. Academic press. London. In: Kranz, J.; Rotem, J. Experimental techniques in Plant Disease Epidemiology. Springer-Verlag. 1988. P. 191-206.

Futch, S.H.; Hebb, J.W.; Sonoda, R.M. 1989. Effect of removal of persistent calyxes from Navel Orange Trees affected by Postbloom Fruit Drop. Florida State Horticultural Society. 102:4-5. 1989.

Gisi, U.; Sierotzki, H.; Cook, A.; McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistant to Qo inhibitor fungicides. Pest Management Science 58:859-867. In: Chen, Y.; Jin, L.; Zhou, M. 2009. Effect of Azoxystrobin on Oxygen Consumption and cyt b Gene Expression of *Colletotrichum capsici* from Chilli Fruits. Agricultural Sciences in China 8(5): 628-631.

Goes, A.; Garrido, R.B.O.; Reis, R.F., Baldassari, R.B., Soares, M.A. 2008. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. Crop Protection 27:71-76.

Joseph-Horne, T.; Hollomon, D.W. 2000. Functional diversity within the mitochondrial electron transport chain of plant pathogenic fungi. Pest Management Science 56:24-30. In: Chen, Y.; Jin, L.; Zhou, M. 2009. Effect of Azoxystrobin on Oxygen Consumption and cyt b Gene Expression of *Colletotrichum capsici* from Chilli Fruits. Agricultural Sciences in China 8(5): 628-631.

Laranjeira, F.F.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Aguilar-Vildoso, C.I.; Coletta Filho, H.D. 2005. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Mattos Junior, D.; Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Junior, J. Citros. São Paulo: Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005. P. 511-558.

Lima, W.G.; Spósito, M.B.; Amorim, L.; Gonçalves, F.P.; Filho, P.A.M. 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agente of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*. 131:157-165.

Ma, Z.; Michailides, T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24:853-863.

Mackenzie, S.J.; Peres, N.A. 2012. Use of leaf wetness and temperature to time fungicide applications to control anthracnose fruit rot of strawberry in Florida. *Plant Disease* 96:529-536.

Madden, L.V.; Ellis, M.A. 1988. How to Develop Plant Disease Forecasters. 1988. In: Kranz, J.; Rotem, J. *Experimental techniques in Plant Disease Epidemiology*. Springer-Verlag. 1988. P. 191-206.

McGovern, R.J., Seijo, T.E., Hendricks, K., Roberst, P.D. 2012. New report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing potbloom fruit drop on citrus in Bermuda. *Canadian Journal of Plant Pathology* 34:187-194.

Neves, M.F.; Trombin, V.G.; Milan, P.; Lopes, F.F.; Cressoni, F.; Kalaki, R. 2010. O retrato da citricultura brasileira. São Paulo. CitrusBR. 137p.

Peres, N.A.R.; Kim, S.; Beck, H.W.; Souza, N.L.; Timmer, L.W. 2002a. A fungicide application decision (FAD) support system for postbloom fruit drop of citrus (PFD). Online. *Plant Health Progress* doi 10.1094/PHP-2002-0731-01-RV.

Peres, N.A.R.; Souza, N.L.; Furtado, E.L.; Timmer, L.W. 2004. Evaluation of systems for timing of fungicide sprays for control of Postbloom fruit drop of citrus in Brazil. *Plant Disease*. 88:731-735.

Peres, N.A.R.; Souza, N.L.; Zitko, S.E.; Timmer, L.W. 2002b. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 86:620-624.

Roberto, S.R.; Borges, A.V. 2001. Efeito do Estágio de Desenvolvimento das Flores e da Aplicação de Fungicidas no Controle da Podridão Floral dos Citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23:306-309. 2001.

Silva-Junior, G.J.; Spósito, M.B.; Marin, D.R.; Amorim, L. 2014. Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus Postbloom fruit drop. *Crop Protection*. 59:51-56.

Timmer, L.W. 1999. Diseases of Fruit and Foliage. In: Timmer, L.W.; Duncan, L.W. *Citrus Health Management*. The American Phytopathological Society. Minnesota. 1999. P. 107-115.

Timmer, L.W.; Brown, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: Silva-Junior, G.J. *Podridão Floral dos Citros: dinâmicas temporal e especial, sensibilidade de Colletotrichum acutatum a fungicidas e controle da doença*. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. 2011.

Timmer, L.W.; Zitko, S.E. 1993. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. *Plant Disease* 77:501-504.

Timmer, L.W.; Zitko, S.E. 1995. Early season indicators of postbloom fruit drop of citrus and the relationship of disease incidence and fruit production. *Plant Disease* 79:1017-1020.

Timmer, L.W.; Zitko, S.E. 1996. Evaluation of a model for prediction of postbloom fruit drop of citrus. *Plant Disease* 80:38-383.

Xiao, K.; Engstrom, G.; Rajagukguk, S.; Yu, C.A.; Yu, L.; Durham, B.; Millet, F. 2003. Effect of famoxadone on photoinduced electron transfer between the Iron-Sulfur center and cytochrome c1 in the cytochrome bc1 complex. *The journal of Biological Chemistry*, 278:11419-11426.

Zadoks, J.C.; Schein, R.D. 1979. *Epidemiology and plant disease management*. Oxford University Press, New York. In: Bergamin Filho, A.; Amorim, L. 1996.

Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico. São Paulo, Agronômica Ceres.

Zulfiqar, M.; Brlansky, R.H.; Timmer, L.W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia*, v.88, p.121-128. 1996.

2. DEFINIÇÃO DO LIMIAR DE AÇÃO PARA CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS

Resumo

Recentemente, o cultivo de citros tem-se deslocado do norte e nordeste para o sudoeste do estado de São Paulo. As condições climáticas desta região favorecem a ocorrência da podridão floral dos citros (PFC), causada por espécies dos complexos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*. Embora o clima da região sudoeste seja favorável à PFC, as condições ambientais para o desenvolvimento de epidemias são relativamente esporádicas, ocorrendo a cada quatro anos, em média. Apesar disto, os produtores de citros realizam, todos os anos, pulverizações com fungicidas baseadas na fenologia da cultura para a prevenção da doença. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um limiar de ação para controle da PFC para ser implementado em um sistema de previsão e alerta da doença. Os índices de risco foram calculados através de um modelo de germinação de conídios de *C. acutatum* obtido em ensaios *in vitro*. Os limiares de 10, 15, 20 e 25% de germinação de conídios foram testados em três áreas experimentais, nos anos de 2015 e 2016. Os tratamentos baseados nos limiares foram comparados aos tratamentos testemunha, sem pulverizações, e calendário fixo de pulverizações. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Cada bloco foi composto por cinco tratamentos, e cada tratamento continha três linhas de 10 plantas cada, totalizando 30 plantas por parcela. Em todos os anos e áreas experimentais, a adoção do tratamento do limiar de 15% de germinação foi eficiente em proporcionar controle efetivo da doença e reduzir o número de aplicações de fungicida. A economia nos custos de aplicações foi de 33,3 a 71,4% no limiar de 15% em relação ao controle estabelecido pelo calendário fixo. Com base nos dados deste trabalho recomenda-se que o limiar de ação para controle da PFC seja de 15% de germinação de conídios de *C. acutatum*.

Palavras-chave: *Colletotrichum acutatum*; Sistema de previsão; Sistema de alerta

Abstract

Recently, citrus orchards have moved from the North and Northeast to the Southwest of the State of São Paulo. Weather conditions on this region are favorable for the occurrence of postbloom fruit drop (PFD), caused by species of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* complexes. Although this region is more favorable to PFD outbreaks, such suitable conditions for the disease epidemics occur sporadically. Despite this, citrus growers spray fungicides every year based on crop phenology to prevent disease. The objective of this work was to establish an action threshold for PFD control to be implemented in a disease warning and forecast system. Risk indexes were calculated using a model of *C. acutatum* conidia germination obtained through *in vitro* assays. Thresholds of 10, 15, 20 and 25% of conidia germination were tested in three experimental areas, in 2015 and 2016. The treatments based on the thresholds were compared to the control treatments and calendar-based sprays. The experiments were carried out in a randomized complete block design with four replications. Each block consisted of five treatments, and each treatment contained three rows of 10 plants each, 30 plants per plot in total. For both years and experimental areas, the adoption of the 15% germination threshold treatment was efficient in providing effective disease control and reducing the number of fungicide sprays. The reduction in spray costs when the 15% threshold was adopted varied from 33.3 to 71.4% when compared to the calendar-based system. According to the data obtained on this study, it is recommended that the action threshold for PFD control for a disease warning system is 15% of conidia germination of *C. acutatum*.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*; Disease forecast system; Disease warning system

2.1. Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores de citros no mundo, devido a sua produção em larga escala e alta produtividade (Faostat, nd). Aumentos no rendimento da cultura só são possíveis com melhorias no manejo dos pomares, a fim de reduzir a interferência negativa de fatores bióticos e abióticos que possam afetar a expressão do potencial genético das plantas. No Brasil, a produção de citros é especialmente importante no estado de São Paulo. Recentemente, o cultivo de citros tem-se deslocado do norte e nordeste para o sudoeste do estado de São Paulo, principalmente devido aos preços mais baixos das terras, bem como a menor ocorrência de importantes doenças da cultura como a clorose variegada dos citros (CVC), cancro, e huanglongbing (HLB) (Neves et al., 2007; 2010). Ademais, as condições climáticas desta região abrandam a importância da adoção de sistemas de irrigação (Neves et al., 2010). Contudo, tais condições climáticas favorecem a ocorrência de outra doença na região sudoeste do estado, a podridão floral dos

citros (PFC), causada por espécies dos complexos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*. Para que esta doença seja importante, eventos frequentes de chuvas devem ocorrer concomitantemente à florada das plantas de citros. Se tais condições ocorrerem, epidemias explosivas da podridão floral dos citros podem atingir os pomares. Há relatos na literatura de epidemias de PFC que causaram perdas de produção na ordem de 80% (Goes et al., 2008) a 100% (Timmer & Zitko, 1996) caso medidas adequadas de controle não forem tomadas. Em 2009, nesta região, apesar das pulverizações de fungicidas realizadas pelos produtores, houve significativa redução da produção pela alta favorabilidade climática à ocorrência da doença (Silva-Junior, 2011). A podridão floral dos citros é, portanto, importante pela crescente relevância da região sudoeste do estado de São Paulo na citricultura brasileira.

Embora o clima da região sudoeste seja mais favorável à PFC, condições climáticas como as de 2009 ocorrem esporadicamente. Apesar disto, os produtores de citros realizam pulverizações com fungicidas baseadas na fenologia da cultura para a prevenção da doença, a fim de evitar perdas relevantes de produção. Os produtos registrados para a podridão floral dos citros no Brasil possuem os ingredientes ativos carbendazim, tebuconazol + trifloxistrobina e fluxapiroxade + piraclostrobina (Agrofit, 2016). Usualmente, o controle químico preventivo é eficiente em manter a doença a níveis aceitáveis (Timmer, 1993), mas este tipo de sistema de pulverização implica em elevados custos. O uso contínuo de fungicidas unisítios registrados para o controle da PFC pode acarretar pressão de seleção de indivíduos resistentes, o que pode aumentar a proporção destes isolados na população e prejudicar o controle eficiente da doença (Hollomon & Brent, 2009).

Uma das maneiras de potencializar a eficiência da aplicação de fungicidas é o uso de sistemas de previsão e alerta de doenças de plantas. Tais sistemas visam prever surtos ou aumentos na intensidade de doença, baseados tanto em fatores pregressos quanto futuros (Madden & Ellis, 1988). Sistemas de previsão de epidemias se tornam uma opção cada vez mais relevante em sistemas agrícolas modernos. Na literatura, há relatos de sistemas eficientes em reduzir o número de aplicações de agrotóxicos para controle de numerosas doenças fúngicas tanto em culturas anuais quanto perenes. Dignos de nota são os sistemas para a crespeira do pessegueiro (Giosuè et al., 2000), antracnose e mofo cinzento do morangueiro (MacKenzie & Peres, 2012) e dos citros para controle da PFC (Peres et al., 2004).

O sistema desenvolvido para controle da PFC foi denominado Postbloom fruit Drop-fungicide application decision (PFD-FAD). Este sistema baseia-se em nas seguintes variáveis para calcular o risco da doença: quantidade e estágio predominante das flores, a ocorrência da doença em safras anteriores, variedade copa utilizada, número de floradas por ano, número de árvores doentes, sintomas de PFC em floradas anteriores, chuvas nos últimos 5 dias, duração do molhamento foliar, eventos de chuva, risco de doença e última aplicação de fungicida (Peres et al, 2002a). A avaliação experimental do PFD-FAD em pomares brasileiros mostrou que seu uso resulta em menor número de aplicações de fungicidas, sem que ocorra a diminuição na produção de fruta, em relação às pulverizações preventivas baseadas em calendário (Peres et al., 2002b; Peres et al, 2004). Apesar de estar disponível na língua portuguesa (<http://pfd.ifas.ufl.edu/default.asp?lng=prt>), o PFD-FAD não vem sendo utilizado pela maioria dos produtores do sudoeste paulista por exigir a quantificação ou a estimativa de um grande número de variáveis. Produtores de morango na Flórida, em contrapartida, vêm utilizando rotineiramente o Strawberry Advisory System para a tomada de decisão de pulverizações para controle da antracnose e da podridão de frutos causada por *Botrytis* sp. Este sistema apresenta interface simples e automatizada, cujo uso não implica na necessidade de que o produtor disponibilize muitas informações sobre sua propriedade para o cálculo de risco da doença (Pavan et al., 2011).

Considerando a importância da PFC na região sudoeste paulista, a ocorrência esporádica de epidemias explosivas e os riscos de seleção de isolados resistentes aos fungicidas, a implementação de um sistema de previsão para o controle dessa doença é altamente desejável. Com esse objetivo, um sistema de alerta da PFC está sendo desenvolvido na mesma plataforma do Strawberry Advisory System, com o objetivo de reduzir o número de pulverizações de fungicidas para controle da PFC em pomares brasileiros. O sistema é baseado em um modelo estimado através de experimentos conduzidos *in vitro*, em que a porcentagem de germinação de conídios de *C. acutatum* foi avaliada sob diferentes condições de temperatura e períodos de molhamento (Lima et al., 2011). O modelo estima a porcentagem de germinação de conídios de *C. acutatum* sob diferentes temperaturas, de 5 a 45°C, e períodos de molhamento contínuos distintos, de 12 a 72 horas. A equação resultante correlacionou-se com a incidência da PFC de experimentos *in vivo* (Gonçalves & Amorim, 2013). Por meio dessa equação é

possível estabelecer um limiar de ação para o controle da PFC a ser incorporado no sistema de previsão. Por definição, o limiar de ação é definido como um nível no qual medidas de controle devem ser tomadas para que os danos ocasionados pela doença não atinjam o limiar de dano econômico (Stern, 1973). O limiar de dano econômico, por sua vez, considera a menor densidade populacional que causa dano econômico (Pedigo et al., 1986), conceito que pode ser adaptado à fitopatologia pela menor incidência de doença que acarreta dano econômico. Neste caso, além de perdas de produção é necessário que se considere os custos inerentes às aplicações de fungicida.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um limiar de ação para controle da PFC para ser implementado no sistema de previsão e alerta da doença. O limiar de ação foi baseado no índice de germinação de conídios de *C. acutatum* e testado por meio da comparação da eficácia de controle da doença em plantas pulverizadas de acordo com calendário fixo ou com base no sistema de previsão.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Definição do limiar de ação para aplicação de fungicidas

Para a escolha do limiar de germinação de conídios que melhor represente o limiar de ação a ser implementado no sistema de previsão da PFC, foram conduzidos experimentos em pomares de laranja doce em dois anos safra (2015 e 2016). As áreas experimentais foram instaladas em três fazendas do sudoeste paulista, nos municípios de Santa Cruz do Rio Pardo (22°79'94" S e 49°36'11" O), Taquarituba (23°37'01" S e 49°13'35" O) e Iaras (29°52'35" S e 48°58'05" O) com histórico de ocorrência da podridão floral dos citros. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro repetições, com parcelas de 10 plantas. Uma estação meteorológica modelo iMETOS IMT200 (Metos Pess Instruments®) foi instalada em cada área experimental. O modelo de germinação de conídios de *C. acutatum* (Lima et al., 2011) está representado na equação 1.

$$y(t) = 100 * \left[\left(\frac{t - 6,31}{18,99} \right)^{1,12} * 1,234 \right] * \left[\left(\frac{40,69 - t}{15,39} \right)^{1,12} \right] * \left[-0,02 * 10^{(-0,02 * DPM)} \right] \quad (\text{eq.1})$$

Em que:

y = porcentagem de germinação de conídios,

t = temperatura média (°C) durante o período de molhamento,

DPM = duração do período de molhamento (horas)

Períodos de molhamento separados por menos de quatro horas foram agregados em um único período (Fitzell & Peak, 1984)

Índices de germinação foram calculados diariamente com base nas informações obtidas nas estações meteorológicas automáticas presentes nas fazendas. O período de molhamento foliar foi calculado com base no modelo da depressão da temperatura de ponto de orvalho (DPD), que leva em consideração a diferença entre a temperatura do ar e a temperatura do ponto de orvalho (referência do DPD). Com base nos dados de cada estação meteorológica, a decisão de pulverização foi baseada nos valores de germinação calculados para o dia pela equação 1. Três limiares de ação foram testados em condições de campo: 15 (G15), 20 (G20) e 25% (G25) em 2015 e 10 (G10), 15 (G15) e 20% (G20) em 2016 (Tabela 1).

No tratamento calendário fixo, as pulverizações foram realizadas a cada 6-11 dias, sendo iniciadas quando a maioria dos botões florais estava no estágio R2 (botões verdes e fechados) e encerradas no estágio R7 (queda de pétalas) (Peres et al., 2002a; Silva-Junior et al., 2014). O tratamento testemunha não recebeu aplicações de fungicidas durante o florescimento.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos com pulverizações baseadas em diferentes limiares de germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* durante o florescimento.

Tratamentos	Momento das pulverizações - 2015	Momento das pulverizações - 2016
Limiar 1	Aplicação de fungicidas quando a germinação atingir 15%	Aplicação de fungicidas quando a germinação atingir 10%
Limiar 2	Aplicação de fungicidas quando a germinação atingir 20%	Aplicação de fungicidas quando a germinação atingir 15%
Limiar 3	Aplicação de fungicidas quando a germinação atingir 25%	Aplicação de fungicidas quando a germinação atingir 20%
Calendário fixo	Pulverização a cada 6 a 11 dias, dependendo da área	Pulverização a cada 6 a 12 dias, dependendo da área
Testemunha	Sem pulverização de fungicidas no florescimento	Sem pulverização de fungicidas no florescimento

As aplicações foram realizadas com o fungicida trifloxistrobina + tebuconazol (Nativo, 10% de trifloxistrobina + 20% de tebuconazol, Bayer CropScience). Trifloxistrobina pertence ao grupo dos fungicidas inibidores de quinona, ou fungicidas QoI, e o fungicida tebuconazol pertence ao grupo dos inibidores da demetilação, ou DMI (FRAC, 2016). A dose do fungicida foi ajustada conforme o volume da copa das plantas da área, sendo padronizada em 2,8 + 5,6 mg de ingrediente ativo por m³ de copa. O volume de calda adotado nas três áreas variou de 30 a 50 mL de calda/m³ de copa, conforme recomendação para o controle da doença (Silva-Junior et al., 2014). Para o cálculo do volume da copa das plantas foram consideradas as médias de altura da planta, profundidade de copa e distância entre plantas na linha de plantio de 10 plantas por talhão em cada município.

Todas as pulverizações foram realizadas de maneira curativa, ou seja, após as condições específicas de cada tratamento terem sido atingidas pelo cálculo horário dos índices de germinação. Por este motivo, não foram utilizados fungicidas protetores, preconizando-se a utilização da mistura trifloxistrobina e tebuconazol por sua capacidade de agir curativamente e suas propriedades sistêmicas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com quatro repetições. Cada bloco foi composto por cinco tratamentos, e cada tratamento continha três linhas de 10 plantas cada, totalizando 30 plantas por parcela. Entre os blocos foi mantida uma bordadura de uma rua inteira de plantas.

As avaliações nas três áreas foram realizadas nos dias 31 de agosto e 2 de setembro em 2015, no estádio R6 (flor aberta). Em 2016, as avaliações ocorreram em 9 e 12 de setembro. A incidência da doença foi obtida pela proporção de flores doentes num total de 200 flores – 100 flores em duas plantas centrais da linha do meio de cada parcela, escolhidas ao acaso. Nas mesmas plantas, 10 ramos foram marcados em cada árvore, totalizando 20 ramos por parcela. Estes ramos foram utilizados para a avaliação do número de cálices retidos e frutos fixados por ramo.

2.2.2. Análise estatística

2.2.2.1. Comparação dos tratamentos utilizando modelos lineares generalizados

Como a variável incidência (proporção) segue distribuição binomial e as variáveis cálices retidos e frutos fixados (contagem) seguem distribuição de Poisson, o teste de significância dos tratamentos foi feito com modelos lineares generalizados (GLM). Uma breve justificativa para o uso do GLM está no Anexo I.

Contrastes do tipo “Tukey” foram realizados entre todos os tratamentos após análise da deviance, que é uma espécie de análise da variância dos modelos lineares generalizados (Resende & Biele, 2002). Para isto, a função lsmeans do pacote LSMEANS presente no programa R Software (v. 3.3.3.) foi utilizada.

2.2.2.2. Análise econômica e comparação do número de aplicações de fungicidas entre tratamentos

O cálculo dos custos de aplicação dos fungicidas por hectare foi feito por meio das seguintes variáveis: densidade de plantas/ha, espaçamentos entre linhas e na linha de plantio, volume de copa médio das plantas em cada área, velocidade de aplicação dos pulverizadores, volume de calda aplicado (L/ha), tempo de reabastecimento do tanque do pulverizador (horas), horas trabalhadas por dia pelos funcionários encarregados das pulverizações, valor da hora máquina, hora homem e hora total de trabalho, dose e preço do fungicida (Nativo, Bayer CropScience®), tempo necessário para pulverizar um hectare e para esvaziar uma bomba do pulverizador, número de bombas utilizadas e de hectares pulverizados por dia. Este cálculo foi feito para cada uma das áreas experimentais (Anexo II).

Ainda para a análise econômica, foram realizadas estimativas de produção por planta baseadas nas médias de fruto fixado por ramo em cada tratamento. Para isso, foi utilizada a regressão entre produção das árvores (kg/planta, variável dependente) e número de frutos fixados por ramo (variável independente) proposta por Silva-Junior et al. (2014). As médias do número de frutos fixados por ramo de cada tratamento deste ensaio foram interpoladas à equação, e a estimativa de rendimento bruto da cultura por hectare foi calculada pela densidade de plantas na propriedade e o custo da caixa de 40,8 kg de laranja no ano de cada experimento. O preço utilizado para o cálculo do rendimento bruto por hectare em cada tratamento foi o de agosto de cada ano dos experimentos deste estudo (Cepea, 2017).

O número de aplicações de fungicida foi comparado entre tratamentos para que se confirmasse estatisticamente que a adoção dos tratamentos levou a um número diferente de pulverizações. Para esta análise, considerou-se que as três áreas eram homogêneas e os tratamentos das diferentes áreas foram unificados. Para isso, foram testadas as seguintes hipóteses, para cada ano dos experimentos:

H_0 : (hipótese de nulidade): média de aplicações de fungicidas nos tratamentos são iguais;

H_A : ao menos uma das médias de aplicações de fungicidas dos tratamentos é diferente.

A rejeição da hipótese nula (H_0) é válida quando a estatística F calculada (F_{calc}) é maior que a estatística F tabelada (valor crítico). Neste caso, considerou-se que os tratamentos foram designados às parcelas de maneira aleatória, não sendo, portanto, necessária a pressuposição da normalidade dos dados de pulverização para o cálculo de F (Vieira e Hoffmann, 1989). Essa rejeição implica na diferença de pelo menos um dos tratamentos em relação aos demais. Para que se evidencie quais tratamentos diferem entre si, teste Tukey a 5% de nível de significância foi realizado para o número de pulverizações.

2.3. Resultados

As datas das pulverizações nos diferentes tratamentos variaram em função das condições climáticas e da duração do florescimento nas três áreas experimentais. O número de pulverizações variou de uma a quatro em 2015, e de duas a sete nos experimentos realizados em 2016, conforme a necessidade de aplicação calculada pela equação 1. A duração do florescimento também foi variável

entre os anos-safra avaliados. Em 2015, o período considerado como suscetível, ou seja, entre os estádios R2 e R7, durou cerca de 21 dias. Em 2016, contudo, o período entre a duração destes estádios chegou a 51 dias em uma das propriedades avaliadas. Para as análises de incidência de flores sintomáticas, considerou-se a avaliação com maior incidência no tratamento testemunha. Tanto o início do florescimento quanto sua duração são dependentes da temperatura no pomar (Spiegel-Roy & Goldsmith, 1996).

2.3.1. Safra de 2015

Apesar das chuvas intensas durante o período de florescimento, sintomas característicos da podridão floral dos citros não foram observados nas duas avaliações na área experimental instalada no município de Iaras. O florescimento nessa área não foi tão expressivo quanto nas outras propriedades avaliadas. O número e a data das pulverizações dos limiares de 15 e 20% coincidiram em todas as áreas, pois quando houve condição climática favorável para a doença ela foi de tal ordem que os limiares de 20% de germinação de conídios foram sempre alcançados. Em Taquarituba, pela ocorrência de longos períodos de molhamento ocasionados pelas chuvas durante o período, o limiar de 25% foi ultrapassado em todas as vezes em que houve clima favorável para a ocorrência da doença.

Tabela 2 – Incidências médias de flores sintomáticas estimadas por modelos lineares generalizados (GLM) para cada tratamento nas áreas experimentais localizadas em Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo em 2015 e erro padrão associado à estimativa e agrupamento estatístico realizado por contrastes tipo Tukey a 5% de nível de significância.

		Incidência estimada de flores sintomáticas (erro padrão)
Tratamento ¹		
Taquarituba	Calendário	0,009 (0,002) a
	G25	0,020 (0,003) b
	Testemunha	0,108 (0,008) c
Sta. Cruz do Rio Pardo	Calendário	0,014 (0,005) a
	G20	0,022 (0,006) ab
	G25	0,051 (0,010) b
	Testemunha	0,155 (0,018) c

¹G20 e G25 correspondem aos limiares de 20 e 25% de germinação de conídios de *C. acutatum*, respectivamente.

Em todas as situações, a incidência da doença foi significativamente menor nas parcelas tratadas do que na testemunha não tratada (Tabela 2 e Figura 1). A proporção de flores sintomáticas no tratamento G20 não diferiu do calendário de aplicações. Contudo, G25 foi estatisticamente diferente do calendário de aplicações nas duas fazendas nesta safra. Em Santa Cruz do Rio Pardo, durante o florescimento, foi realizada apenas uma pulverização nos três limiares e três pulverizações no tratamento com calendário fixo (Tabela 4).

Nesta safra, as chuvas ocorreram em, no máximo, quatro dias durante o período de florescimento e não foram tão intensas como em 2009, o que pode explicar a menor ocorrência de doença nos talhões avaliados (Figura 2).

Figura 1: boxplots com as estimativas do modelo ($\diamond$) e medianas (-) das observações de proporção de flores sintomáticas, número de cálices retidos e frutos fixados por ramo de cada tratamento nos municípios de Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo na safra de 2015.

Figura 2: volume de chuva, em mm (barras), índice calculado de germinação de conídios (-▲-), duração de período de molhamento (-●-) e pulverizações conforme os limiares (setas) durante o período de florescimento em laras, Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo, na safra de 2015.

Em Taquarituba, o número de cálices retidos por ramo nos tratamentos que adotaram o sistema de previsão e calendário de aplicações não diferiram entre si, sendo significativamente menores do que a testemunha, com exceção do tratamento G15. Situação semelhante ocorreu em Santa Cruz do Rio Pardo. Não se verifica diferenças entre os tratamentos dos limiares e do calendário de aplicação; contudo, o número de cálices retidos neste tratamento se equiparou estatisticamente à testemunha. Em Taquarituba o número de frutos fixados no tratamento calendário fixo de aplicações não diferiu da testemunha, sendo menor do que nos tratamentos que receberam aplicações baseadas no sistema de previsão. Em Santa Cruz do Rio Pardo, não houve diferença estatística entre os tratamentos com relação ao número de frutos fixados por ramo.

Tabela 3 – Número de cálices retidos e frutos fixados por ramo estimados por modelos lineares generalizados (GLM) para cada tratamento e área experimental de 2015, erro padrão associado à estimativa e agrupamento estatístico realizado por contrastes tipo Tukey a 5% de nível de significância.

		Cálices retidos estimados por ramo (erro padrão)	Frutos fixados estimados por ramo (erro padrão)
Taquarituba	Calendário	0.033 (0.019) a	0.752 (0.097) bc
	G15	0.000 (0.000) ab	1.431 (0.133) a
	G20	0.056 (0.025) a	1.295 (0.127) a
	G25	0.111 (0,036) a	0.975 (0.110) ab
	Testemunha	0.412 (0,075) b	0.481 (0,077) c
Sta. Cruz do Rio Pardo	Calendário	2.159 (0.290) ab	0.783 (0.099) a
	G20	1.718 (0.258) a	0.932 (0,108) a
	G25	1.443 (0.236) a	0.770 (0.098) a
	Testemunha	3.006 (0.343) b	0.870 (0.104) a

A adoção do sistema de previsão reduziu o número de aplicações em todas as áreas avaliadas, e proporcionou a redução do nível da doença em comparação à testemunha em todos os casos. Não foram observadas diferenças no número de aplicação de fungicidas entre os tratamentos que adotaram os limiares de germinação baseados no sistema. A adoção do sistema de calendário para aplicações de fungicida implicou em um número estatisticamente maior de pulverizações. O custo de aplicação para cada área foi calculado e está representado na Tabela 4. O custo do total de aplicações de fungicida para o controle da PFC foi maior no tratamento calendário fixo do que nos tratamentos

baseados nos limiares. O custo por pulverização foi menor em laranjeiras e maior em Santa Cruz do Rio Pardo, em 2015. Os limiares de G15 e G20 proporcionaram maior rendimento ao produtor em Santa Cruz do Rio Pardo e Taquaritinga, contudo, em Santa Cruz do Rio Pardo o número de frutos fixados no calendário de aplicações foi menor do que na testemunha, apesar de não diferir estatisticamente, o que resultou em menor rendimento nesta situação. Para laranjeiras, como não foi verificada a ocorrência de doença não foi possível avaliar o número de frutos fixados, o que não possibilitou a produção por planta e as variáveis dela dependentes (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de pulverizações, custo de aplicação por hectare, custo total por hectare, produção por planta, produção de caixas de laranja (40,8 kg/ha), rendimento bruto da cultura/ha e custo de controle da PFC subtraído do rendimento bruto (RB-CT) em pomares de laranja doce em 2015 nos municípios de Iaras, Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo para os tratamentos G15, G20, G25, calendário de aplicações e testemunha.

Iaras							
Tratamento	Número de aplicações	Custo/aplicação (R\$)	Custo total (R\$)	Produção (kg/planta)	Caixas/ha	Rendimento bruto (RB)/ha	RB-CT
G15	2	63,38	126,76	*	*	*	*
G20	2	63,38	126,76	*	*	*	*
G25	2	63,38	126,76	*	*	*	*
Calendário	3	63,38	190,14	*	*	*	*
Testemunha	0	0	0	*	*	*	*

Taquarituba							
Tratamento	Número de aplicações	Custo/aplicação (R\$)	Custo total (R\$)	Produção (kg/planta)	Caixas/ha	Rendimento bruto (RB)/ha	RB-CT
G15	2	83,47	166,93	133,02	1.552,55	17.590,42	17.423,49
G20	2	83,47	166,93	133,02	1.552,55	17.590,42	17.423,49
G25	2	83,47	166,93	133,02	1.552,55	17.590,42	17.423,49
Calendário	3	83,47	250,40	145,99	1.703,94	19.305,63	19.055,23
Testemunha	0	0	0	54,91	640,92	7.261,66	7.261,66

Santa Cruz do Rio Pardo							
Tratamento	Número de aplicações	Custo/aplicação (R\$)	Custo total (R\$)	Produção (kg/planta)	Caixas/ha	Rendimento bruto (RB)/ha	RB-CT
G15	1	112,61	112,61	97,52	1.365,72	15.473,55	15.360,95
G20	1	112,61	112,61	97,52	1.365,72	15.473,55	15.360,95
G25	1	112,61	112,61	82,08	1.149,59	13.024,87	12.912,26
Calendário	3	112,61	337,82	83,32	1.166,83	13.220,16	12.882,34
Testemunha	0	0	0,00	91,55	1.282,18	14.527,13	14.527,13

*A variável fruto fixado não foi avaliada no município de Iaras, portanto, não foi realizada a estimativa de produção por planta. ^aO número de plantas por hectare para Iaras, Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo foi de 507,1, 476,2 e 571,4, respectivamente.

2.3.2. Safra 2016

Eventos de chuva mais intensos e frequentes ocorreram durante o florescimento na safra de 2016, especialmente em Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo (Figura 3). Foram registradas altas incidências de doença nos tratamentos testemunha, especialmente quando comparados à safra anterior, cujas incidências máximas não ultrapassaram os 40% de flores sintomáticas. Em Taquarituba e Santa

Cruz do Rio Pardo houve registros de mais de 60% de flores sintomáticas por planta avaliada (Figura 4). Em ambas as safras, o limiar de 20% proporcionou controle eficiente e reduziu significativamente o número de pulverizações de fungicidas nos pomares, mesmo com aplicações realizadas de maneira curativa.

Pelos gráficos da Figura 4, pode-se verificar uma tendência similar entre as curvas de duração do período de molhamento (DPM) e índice de germinação.

Figura 3: volume de chuva, em mm (barras), índice calculado de germinação de conídios (▲-), duração de período de molhamento (-●-) e pulverizações conforme os limiares (setas) durante o período de florescimento em laras, Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo na safra de 2016.

Na safra de 2016, optou-se por avaliar os limiares de 10, 15 e 20% para identificar possíveis diferenças estatísticas entre estes tratamentos, uma vez que o limiar de 25% aparentemente não foi tão eficiente em manter a doença em níveis toleráveis. Em 2015, quando o limiar de 15% foi atingido, o de 20% também foi, fato que se repetiu em todas as áreas em 2016. Não foram verificadas diferenças entre os três limiares e o calendário fixo de aplicações com relação à incidência de flores sintomáticas em nenhuma das três áreas experimentais em 2016 (Tabela 5). Estes tratamentos apresentaram incidência de flores doentes significativamente menor do que o tratamento testemunha.

Tabela 5 – Incidências de flores sintomáticas estimadas por modelos lineares generalizados (GLM) para cada tratamento e área experimental de 2016, erro padrão associado à estimativa e agrupamento estatístico realizado por contrastes tipo Tukey a 5% de nível de significância.

		Incidência de flores sintomáticas estimada (erro padrão)
Tratamento		
Iaras	Calendário	0.031 (0,014) a
	G10	0.011 (0,09) a
	G15	0.067 (0,021) a
	G20	0.017 (0,010) a
	Testemunha	0.302 (0,039) b
Taquarituba	Calendário	0.005 (0,002) a
	G10	0.005 (0,002) a
	G15	0.005 (0,002) a
	G20	0.009 (0,003) a
	Testemunha	0.520 (0,017) b
Sta. Cruz do Rio Pardo	Calendário	0.005(0,004) a
	G10	0.005 (0,004) a
	G15	0.005 (0,004) a
	G20	0.005 (0,004) a
	Testemunha	0.520 (0,025) b

Figura 4: boxplots com as estimativas dos modelos ($\diamond$) e medianas (-) das observações de proporção de flores sintomáticas, número de cálices retidos e frutos fixados por ramo de cada tratamento nos municípios de Iaras, Taquarituba e Santa Cruz do Rio Pardo na safra de 2016.

Com relação ao número de cálices retidos por ramo, diferenças mais expressivas foram encontradas entre os tratamentos em 2016 (Tabela 6). Em todas as áreas o tratamento testemunha apresentou número significativamente maior de cálices retidos por ramo (Tabela 6). Contudo, apenas nos tratamentos G10 e G15 o número de cálices retidos por ramo foi similar ao do calendário de aplicações. O

tratamento G20 apresentou número maior de cálices retidos por ramo em todas as áreas.

Já para o número de frutos fixados (Tabela 6), todos os tratamentos diferiram da testemunha em Taquarituba. Em Santa Cruz do Rio Pardo os tratamentos G10 e G20, apesar de não terem diferido do tratamento do calendário de aplicações, não apresentaram diferença significativa com relação à testemunha. Apenas o tratamento testemunha apresentou maior número de cálices retidos e menor número de frutos fixados. Os tratamentos baseados nos limiares não apresentaram diferenças entre si.

Tabela 6: Número de cálices retidos e frutos fixados por ramo estimados por modelos lineares generalizados (GLM) para cada tratamento e área experimental de 2016, erro padrão associado à estimativa e agrupamento estatístico realizado por contrastes tipo Tukey a 5% de nível de significância.

	Tratamento	Cálices retidos estimados por ramo (erro padrão)	Frutos fixados estimados por ramo (erro padrão)
Iaras	Calendário	0.139 (0.097) a	0.583 (0.092) a
	G10	0.603 (0.202) ab	0.596 (0.092) a
	G15	0.776 (0.230) ab	0.766 (0.105) a
	G20	1.495 (0.321) b	0.669 (0.098) a
	Testemunha	6.536 (0.697) c	0.511 (0.086) a
Taquarituba	Calendário	0.012 (0.013) a	2.055 (0,160) a
	G10	0.024 (0.018) a	1.981 (0.157) a
	G15	0.147 (0.044) ab	1.968 (0.157) a
	G20	0.245 (0.057) b	2.005 (0.158) a
	Testemunha	4.222 (0.243) c	0.648 (0.090) b
Sta. Cruz do Rio Pardo	Calendário	1.062 (0.217) a	0.944 (0.108) a
	G10	2.431 (0.330) b	0.708 (0.094) ab
	G15	1.782 (0.282) ab	0.845 (0.103) a
	G20	2.525 (0.336) b	0.596 (0.086) ab
	Testemunha	5.735 (0.514) c	0.447 (0.075) b

A equação de previsão de germinação de conídios reduziu o número de aplicações de fungicidas em até 71,4%, resultando em mesmo controle da doença que o calendário (Tabela 7). O número de pulverizações baseadas nos limiares G15 e G20 foram significativamente menores do que os do limiar G10 e do calendário fixo ($p=0,05$). O número de pulverizações baseadas no limiar G10 também foi estatisticamente menor do que o aplicado para o calendário fixo de pulverizações. O

menor e o maior custo de aplicação foram observados em laranjeiras e Santa Cruz do Rio Pardo, respectivamente, no ano de 2016 (Tabela 7). O número de aplicações em G10 e no calendário fixo de aplicações foi significativamente maior do que nos demais limiares para o ano de 2016. O rendimento ao produtor foi sempre maior nos tratamentos que receberam aplicações de fungicida do que na testemunha, sendo o custo de aplicação irrisório em relação aos ganhos de produção estimados para todas as áreas.

Tabela 7 – Número de pulverizações, custo de aplicação por hectare, custo total por hectare, produção por planta, número de plantas por hectare, produção de caixas de laranja (40,8 kg/ha), rendimento bruto da cultura/ha e custo de controle da PFC subtraído do rendimento bruto (RB-CT) em pomares de laranja doce nos municípios de laranjeiras, Taquaritinga e Santa Cruz do Rio Pardo para os tratamentos G15, G20, G25, calendário de aplicações e testemunha.

laranjeiras							
Tratamento	Número de aplicações	Custo/aplicação (R\$)	Custo total (R\$)	Produção (kg/planta)	Caixas/ha	Rendimento bruto (RB)/ha	RB-CT
G10	5	62,98	314,89	66,75	829,60	16.583,71	16.268,82
G15	2	62,98	125,96	83,32	1.035,52	20.700,13	20.574,17
G20	2	62,98	125,96	73,85	917,85	18.347,89	18.221,93
Calendário	7	62,98	440,85	65,52	814,30	16.277,92	15.837,07
Testemunha	0	0	0	58,42	726,05	14.513,74	14.513,74
Taquaritinga							
Tratamento	Número de aplicações	Custo/aplicação (R\$)	Custo total (R\$)	Produção (kg/planta)	Caixas/ha	Rendimento bruto (RB)/ha	RB-CT
G10	3	82,58	247,75	196,93	2.298,43	45.945,65	45.697,90
G15	2	82,58	165,17	195,69	2.284,07	45.658,49	45.493,33
G20	2	82,58	165,17	199,48	2.328,27	46.542,06	46.376,89
Calendário	5	82,58	412,91	204,03	2.381,31	47.602,33	47.189,42
Testemunha	0	0	0	70,25	819,93	16.390,48	16.390,48
Santa Cruz do Rio Pardo							
Tratamento	Número de aplicações	Custo/aplicação (R\$)	Custo total (R\$)	Produção (kg/planta)	Caixas/ha	Rendimento bruto (RB)/ha	RB-CT
G10	5	148,78	743,92	76,22	664,27	13.278,69	12.534,78
G15	3	148,78	446,35	89,19	777,31	15.538,49	15.092,14
G20	3	148,78	446,35	65,52	571,02	11.414,77	10.968,42
Calendário	6	148,78	892,70	98,65	859,83	17.187,98	16.295,28
Testemunha	0	0	0	51,32	447,25	8.940,53	8.940,53

^aO número de plantas por hectare para laranjeiras, Taquaritinga e Santa Cruz do Rio Pardo foi de 507,1, 476,2 e 355,6, respectivamente.

2.4. Discussão

Os números de aplicações de fungicidas determinados pelos limiares de germinação de conídios não diferiram entre si na maioria dos casos deste estudo. Contudo, é notável que a adoção dos limiares de ação mais baixos, especialmente o de 10% de germinação de conídios, levou a um número consideravelmente maior de pulverizações de fungicidas em comparação aos demais limiares de ação. O índice de germinação que mais eficientemente controlou a doença e não resultou em aplicações desnecessárias de fungicidas foi o de 15%. O calendário de aplicação de fungicidas, apesar de controlar a doença de maneira efetiva, é especialmente problemático em safras, ou regiões, cuja florada é extensa. Nestas condições, a redução do número de aplicações é ainda mais expressiva. Com exceção de Taquarituba, com relação à safra de 2015, foi realizado o dobro de pulverizações baseadas na fenologia dos citros em comparação aos tratamentos que adotaram os limiares de ação. A adoção do limiar de ação para o controle da doença reduziu o número de aplicações de fungicidas em todas as áreas e nas duas safras, resultando em mesmo controle da podridão floral dos citros. Apesar de as pulverizações baseadas nos limiares sempre controlarem a doença, o nível de controle foi maior na aplicação dos limiares de ação mais baixos (G10 e G15) em comparação aos mais altos (G20 e G25). Em função da combinação do nível de controle da doença com a análise econômica, recomenda-se o limiar de ação G15 para uso em um sistema de previsão da PFC. Este limiar de ação implica em menor número de pulverizações do que o limiar G10 e proporciona controle da doença equiparável àquele do sistema de aplicações baseado em calendário. Além disso, na maioria dos casos, a adoção do limiar G20 foi eficiente em controlar a doença. Este fato é importante por estabelecer que, além do limiar G15 ser o mais adequado, a faixa entre o G15 e o G20 ainda é segura, o que implica em maior tempo para tomadas de decisão pelos produtores após o limiar G15 ser atingido.

Além da redução do número de aplicações de fungicidas, a adoção do sistema de previsão geralmente levou a ganhos de produtividade. Pelo cálculo dos ganhos de produção, fica claro que o controle da doença é importante para a obtenção de produtividades maiores. Contudo, nos casos de baixa incidência da doença, apesar dos tratamentos diferirem estatisticamente quanto à proporção de flores doentes, isto não ocorreu com relação ao número de frutos fixados, variável

que impacta diretamente a produção de citros. Este fato ocorre devido à baixa porcentagem de flores que de fato vêm a se tornar frutos, sendo esta cerca de 1% (Erickson & Brannaman, 1960).

Considerando apenas os custos de pulverização, ou seja, desconsiderando os ganhos em produtividade, a adoção do limiar G15 do sistema de previsão proporcionou economia média de R\$ 124,02/ha em 2015 e R\$ 336,33/ha em 2016. O sistema de alerta, quando disponível, será gratuito aos produtores, e requererá somente que a área de produção possua uma estação meteorológica automatizada para seu funcionamento. Considerando que o valor de uma estação meteorológica é de aproximadamente R\$ 20.000,00 (Silva-Junior, informação pessoal), para o ano de 2015 a economia gerada pelo sistema pagaria o custo do equipamento em propriedades maiores que 161,26 ha. Em 2016, propriedades acima de 59,47 ha já seriam suficientemente extensas para que a economia em pulverizações fosse de tal ordem que suprisse o custo da estação meteorológica. É válido ressaltar que, para o tipo de previsão climática que irá ser incorporada ao sistema, recomenda-se que a estação meteorológica esteja a um raio de no máximo 5 km de distância da propriedade citrícola de interesse. Isso, na prática, implica que propriedades de até 7.000 ha necessitam de apenas uma estação meteorológica para o correto funcionamento do sistema, ao passo que mais equipamentos são necessários em propriedades maiores.

Um dos fatos mais relevantes para a substituição de sistemas de pulverização baseados em calendários por um sistema automatizado de previsão para a PFC se dá pela esporadicidade de danos relacionados a esta doença nos campos de citros. Epidemias severas da PFC somente ocorrem quando as condições climáticas favoráveis à doença coincidem com o período de florescimento, isto é, quando eventos de chuvas frequentes e de longa duração acontecem. Nas áreas produtoras de citros no Brasil, tais condições não ocorrem de maneira regular. Apesar de eventos de chuva serem menos frequentes durante o inverno em comparação à época de verão, a região sudoeste do estado de São Paulo é a de maior ocorrência de PFC por suas condições climáticas e período de florescimento mais extenso (Soares-Colleti, 2016). Ainda que epidemias de PFC sejam esporádicas, o inóculo permanece nas áreas produtoras pela alta eficiência do patógeno em sobreviver sobre as folhas de citros (Pereira, 2013) e de daninhas (Frare et al., 2016).

Neste trabalho, todas as pulverizações foram realizadas em menos de 24 horas após os alertas de cada limiar. Apesar de não haver informações sobre a capacidade curativa da mistura trifloxistrobina e tebuconazol no controle da PFC, a aplicação de piraclostrobina reduziu a incidência de podridão da coroa do morangueiro, também causada por espécie do gênero *Colletotrichum*, um dia após a inoculação do fungo (MacKenzie et al., 2009). A literatura não recomenda o uso de aplicações curativas de fungicidas, pois estas podem representar maior pressão de seleção aos patógenos (Fao, 2012). No entanto, não há evidências de que a adoção de sistemas baseadas em limiares facilite o estabelecimento de populações resistentes a fungicidas (Ishii & Hollomon, 2015). O que há, de fato, é um comum entendimento que a eficácia de controle é usualmente maior quando os fungicidas são aplicados pré-infecção (McGrath, 2004; Ishii & Hollomon, 2015) e que excessivas aplicações de fungicida durante a safra implicam em maior pressão de seleção de indivíduos resistentes (Brent & Hollomon, 2007; Van den Berg et al., 2016). Portanto, com base nas informações disponíveis na literatura e de trabalhos que avaliam a pressão de seleção de isolados resistentes (Ishii & Hollomon, 2015; Van den Berg et al., 2016), é válido preconizar um número significativamente menor de pulverizações do que um sistema preventivo de aplicações de fungicidas baseados em fenologia que implique em pulverizações desnecessárias e excessivas. Apesar do risco de indivíduos de *Colletotrichum* spp. resistentes a fungicidas ser considerado baixo, isolados de *C. acutatum* resistentes aos Qols já foram relatados recentemente na cultura do morangueiro (Forcelini et al., 2016). Além dos aspectos já citados, a preocupação crescente da sociedade com o uso de agrotóxicos nos pomares justifica a adoção de pulverizações baseadas em sistemas de alerta.

Há diversos relatos do desenvolvimento e do uso de sistemas de previsão de epidemias na literatura (Krause & Massie, 1975; Zadoks, 1983; Billing, 1984). Apesar deste tipo de tecnologia ser relativamente antiga, até a atualidade a adoção de sistemas de alerta de doenças em sistemas agrícolas representa um avanço no manejo de doenças que, no entanto, não é amplamente usada pela maioria dos produtores (Gent et al., 2013). Dentre as dificuldades de aplicação agrícola de sistemas de alerta, podem-se citar aspectos de diferentes naturezas, como técnica, profissional, econômica, social e psicológica (Shtienberg, 2013).

Mais detalhadamente, segundo Jorgensen et al. (2007), fatores que influenciam negativamente o uso destes sistemas incluem: a necessidade de serem realizadas avaliações no campo; o crescente tamanho das propriedades que implica em menor tempo disponível para tomadas de decisão para campos individuais; falta de incentivos econômicos para abandonar os sistemas de decisão tradicionais; a incapacidade dos sistemas disponíveis em interagir com outros programas computacionais já utilizados pela propriedade agrícola; a falta de compatibilidade entre o sistema de alerta e o modo com que o produtor toma decisões de manejo; a necessidade do contato direto do produtor com um consultor. Exemplificando tais dificuldades, apesar de ser eficiente em reduzir o número de aplicações de fungicidas no campo, o PFD-FAD (Peres et al., 2002) não é utilizado pelos produtores brasileiros por demandar que diversas variáveis sejam quantificadas ou estimadas no campo.

Mesmo que um sistema de alerta baseado no limiar de ação proposto neste trabalho seja adotado pelos produtores e consiga superar as dificuldades acima citadas, há evidências para afirmar que sua durabilidade será limitada. Normalmente, os sistemas são usados pelo período que os usuários conseguem obter informações úteis e novas das plataformas. Quando os usuários aprendem novas informações e as incorporam rotineiramente nas decisões agrícolas, o sistema cai em desuso (Gent et al., 2013). Contudo, a ocorrência esporádica da doença implica em maior dificuldade de aprendizagem da dinâmica das epidemias pelos agricultores, o que pode aumentar o período útil do sistema, por prever condições de risco que não podem ser estimadas facilmente pela experiência dos produtores (Gent et al., 2013). Espera-se que, com os resultados obtidos neste trabalho e contornadas as dificuldades inerentes à ampla utilização de sistemas de previsão na agricultura, o sistema de alerta da PFC seja amplamente adotado pelos citricultores.

2.5. Conclusão

A adoção de limiares de ação para manejo da podridão floral dos citros permitiu a redução do número de aplicações de fungicida sem reduzir o nível de controle da doença.

O limiar de 15% de germinação de conídios foi o mais eficaz pois proporcionou a melhor relação entre rendimento da cultura e custos de controle.

O custo da estação automática pode ser recuperado em apenas um ano em propriedades maiores que 161,26 ha.

Referências

Agrofit. 2016. Produtos registrados para *Colletotrichum acutatum* na cultura dos citros. Disponível em:

< http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 1 de março de 2017.

Billing, E. 1984. Principles and applications of fire blight risk assessment systems. Acta Horti 151 15-22

Brent, K.J., Hollomon, D.W. 2007. Fungicide resistance in Crop Pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph 1. 2nd Ed. Brussels, CropLife International, Brussels: 55.

Cepea. 2017. Indicador – citros. Disponível em:

< <http://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/citros.aspx>>. Acesso em: 26 de Abril de 2017.

Erickson, L.C., Brannaman, B.L. 1960. Abscission of reproductive structures and leaves of orange trees. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 75:222-229.

Fao. 2012. Guidelines on Prevention and Management of Pesticide Resistance. Disponível em:

<https://www.eppo.int/PPPRODUCTS/resistance/FAO_RMG_Sept_12.pdf>. Acesso em: 22 de maio de 2017.

FAOSTAT. Citrusfruit production quantities by country. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E>. Acesso em: 19 fev. 2014.

Fitzell, R.D., Peak, C.M. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: Inoculum sources, spore production and dispersal. *Annals of Applied Biology* 104:53-59.

Forcelini, B.B., Seijo, T.E., Amiri, A., Peres, N.A. 2016. Resistance in Strawberry Isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to Quinone-Outside Inhibitor Fungicides. *Plant Disease* 100: 2050-2056

Frare, G.F., Couto, H.T.Z., Ciampi-Guillardi, M., Amorim, L. 2016. The causal agent of citrus postbloom fruit drop, *Colletotrichum acutatum*, can survive on weeds. *Australasian Plant Pathol.* (2016) 45: 339-346.

Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2016. FRAC code list 2015: fungicides sorted by mode of action (including FRAC code numbering). <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2016.pdf?sfvrsn=2>

Gent, D.H., Mahaffee, W.F., McRoberts, N., Pfender, W. 2013. The use and role of predictive systems in disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:267-289.

Giosuè, S., Spada, G., Rossi, V., Carli, G., Ponti, I. 2000. Forecasting infections of the leaf curl disease on peaches caused by *Taphrina deformans*. *European Journal of Plant Pathology* 106:563-571.

Goes, A., Garrido, R.B.O., Reis, R.F., Baldassari, R.B., Soares, M.A. 2008. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. *Crop Protection* 27:71-76.

Gonçalves, F.P., Amorim, L. 2013. Temperatura e molhamento requeridos para a infecção de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* em flores de laranja doce. In: 46º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Ouro Preto, Tropical Plant Pathology - Suplemento 38-S:446

Hinde, J., Demétrio, C.G.B. 1998. Overdispersion: models and estimation. *Computational Statistics & Data Analysis* 27:151-170.

Hollomon, D.W., and Brent, K.J. 2009. Combating plant diseases – the Darwin connection. *Pest Manag Sci* 65: 1156-1163

Ishii, H., Hollomon, D.W. 2015. Fungicide Resistance in Plant pathogens. Tokyo, Springer. 63-77. 489 p.

Jorgensen, L.N., Noe, E., Nielsen, G.C., Jensen, J.E., Orum, J.E., Pinnschmidt, H.O. 2008. Problems with disseminating information on disease control in wheat and barley to farmers. *Eur J Plant Pathol* 121:303-312.

Krause, R.A., Massie, L.B. 1975. Predictive systems: modern approaches to disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13: 31-47.

Lima, W.G., Spósito, M.B., Amorim, L., Gonçalves, F.P., Filho, P.A.M. 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology* 131:157-165

MacKenzie S.J., Peres N.A. 2012. Use of leaf wetness and temperature to time fungicide applications to control anthracnose fruit rot of strawberry in Florida. *Plant Dis* 96:522–528

MacKenzie, S. J., Mertely, J. C., and Peres, N. A. 2009. Curative and protectant activity of fungicides for control of crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Dis.* 93:815-820.

Madden, L.V., Ellis, M.A. 1988. How to Develop Plant Disease Forecasters. In: Kranz, J., Rotem, J. 1988. *Experimental techniques in Plant Disease Epidemiology.* Springer-Verlag. P. 191-206.

McGrath, M.T. 2004. What are Fungicides. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01.

Neves, M.F., Lopes, F.F., Trombin, V.G., Amaro, A.A., Neves, E.M., Jank, M.S. 2007. Caminhos para a citricultura: uma agenda para manter a liderança mundial. Editora Atlas: São Paulo. 110 p.

Neves, M.F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalaki, R. 2010. O retrato da citricultura brasileira. São Paulo. CitrusBR. 137p.

Pavan, W., Fraisse, C.W., Peres, N.A. 2011. Development of a web-based disease forecast system for strawberries. *Computers and Electronics in Agriculture* 75:169-175.

Pedigo, L. P., S. H. Hutchins, and L. G. Higley. 1986. Economic injury levels in theory and practice. *Annu. Rev. Entomol.* 31:341-368.

Pereira, W.V. 2013. Sobrevivência, colonização, detecção e monitoramento de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. doi:10.11606/T.11.2014.tde-21032014-162045. Recuperado em 2017-04-17, de www.teses.usp.br.

Peres, N.A.R., Kim, S., Beck, H.W., Souza, N.L., Timmer, L.W. 2002a. A fungicide application decision (FAD) support system for postbloom fruit drop of citrus (PFD). Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2002-0731-01-RV.

Peres, N.A.R., Souza, N.L., Furtado, E.L., Timmer, L.W. 2004. Evaluation of Systems for Timing of Fungicide Sprays for Control of Postbloom Fruit Drop of Citrus in Brazil. *Plant Dis* 99:731-735

Peres, N.A.R., Souza, N.L., Zitko, S.E., Timmer, L.W. 2002b. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 86:620-624.

- Resende, M.D.V., Biele, J. 2002. Estimação e predição em modelos lineares generalizados mistos com variáveis binomiais. *Rev. Mat. Estat.* 20: 39-65
- Shtienberg, D. 2013. Will decision-support systems be widely used for the management of plant diseases? *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:1-16.
- Silva-Junior, G.J. 2011. Podridão Floral dos Citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. 2011.
- Silva-Junior, G.J., Spósito, M.B., Marin, D.R., Amorim, Lilian. 2014. Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus Postbloom fruit drop. *Crop Protection* 59:51-56.
- Soares-Colletti, A.R., Alvares, C.A., Sentelhas, P.C. 2016. An agro-climatic approach to determine citrus postbloom fruit drop risk in Southern Brazil. *Int J Biometeorol* 60:89-905.
- Spiegel-Roy, P., Goldsmith, E.E. 1996. *The Biology of Citrus*. Cambridge. Cambridge University press. 230 p.
- Stern, V.M. 1973. Economic thresholds. *Annu. Rev. Entomol.* 18:259-280.
- Timmer, L.W. 1993. Postbloom fruit drop of citrus – symptoms, disease cycle and control. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 106:102-105.
- Timmer, L.W., Zitko, S.E. 1996. Evaluation of a model for prediction of postbloom fruit drop of citrus. *Plant Disease* 80:380-383
- van den Berg, F., Paveley, N.D., van den Bosch, F. 2016. Dose and number of applications that maximize fungicide effective life exemplified by *Zymoseptoria tritici* on wheat – a model analysis. *Plant Pathology* 65:1380-1389.
- Vieira, S., Hoffmann, R. *Estatística experimental*. São Paulo: Editora Atlas, 1989. 179p.

Zadoks, J.C. 1983. An integrated disease and pest management scheme, EIPRE, for wheat. Better crops for food 116-129.

Anexos

Anexo I – Justificativa do uso de modelos lineares generalizados (GLM)

Como as variáveis não apresentaram distribuição não normal, modelos lineares generalizados (GLM) foram ajustados para testar a significância dos tratamentos. Estes modelos aceitam todos os tipos de distribuições nos dados. Para a variável incidência foi implementada a família “binomial”. As variáveis cálices retidos e frutos fixados são de natureza Poisson (contagem), o que foi especificado na função do modelo GLM. Para o ajuste dos modelos foram usadas as funções “glm” (modelo de efeitos fixos) ou “glmer” (modelo de efeitos aleatórios) do pacote LME4 do R (R Core Team, 2016). Para as distribuições binomial e Poisson o parâmetro de dispersão (Φ) deve ser igual a 1, fixo. Quando isso não acontece o modelo pode ter um ajuste errôneo, nesses casos a variação dos dados é significativamente maior do que a predita pelo modelo, fenômeno conhecido como superdispersão. A superdispersão é observada especialmente para distribuições binomiais e Poisson (Hinde & Demétrio, 1998), principais tipos de distribuição para as variáveis deste estudo. As três variáveis apresentaram superdispersão quando testada a igualdade $\Phi = 1$. Isto pode ter ocorrido pela excessiva presença de zeros em alguns tratamentos. A incorporação da superdispersão nos modelos foi realizada com uso do método da quase-verossimilhança dos parâmetros, por meio da seleção da família “quase-binomial” ou “quase-Poisson” do pacote acima detalhado, para o caso dos modelos de efeitos fixos. Para os modelos mistos, o mesmo foi realizado com a incorporação do efeito aleatório ao nível da observação. Para isto foram identificados individualmente as unidades experimentais para o caso de incidência [árvore_id] e cálices retidos ou frutos fixados ao [ramo_id], contendo toda a informação (fazenda + tratamento + bloco + árvore).

Modelos de efeitos fixos são adequados para inferências nas condições de experimentação específicas onde foi realizado o estudo. Já modelos mistos incluem além dos efeitos fixos, efeitos aleatórios que permitem realizar inferências no sentido amplo, expandindo as conclusões para o total de condições possíveis. As mais comuns aplicações deste tipo de modelos consideram os tratamentos como fixos, e todos os outros termos como aleatórios. Em particular, as interações tratamentos com ano ou local são consideradas como aleatórias. Modelos de efeitos fixos foram

ajustados para a análise individual dos experimentos, e modelos de efeitos mistos para a análise combinada dos experimentos considerando tratamentos como efeito fixo e a interação fazenda tratamento como efeito aleatório.

Anexo II – Tabelas dos cálculos de custo para as operações agrícolas

Tabela 8: Cálculo do custo de aplicação de fungicida para controle da podridão floral dos citros em Santa Cruz do Rio Pardo no ano de 2015

Santa Cruz 2015 - Laranja Pera			
Densidade (plantas/ha)	571	Quantas horas gastos para pulverizar 1ha?	0.20
Espaçamento na linha (m)	7.0		
Espaçamento dentro linha	2.5	Quantas horas gasto para esvaziar 1 bomba?	0.48
Volume de copa (m3/planta)	59.6		
Velocidade (km/h)	7	Quantas bombas pulverizo por dia?	13.13
Volume de calda (L/ha)	1704		
Volume de calda (mL/m3)	50	Quanto ha pulverizo por dia?	30.83
Tempo de reabastecimento (horas)	0.13		
Tamanho do tanque (litros)	4000	Quantas horas trabalhadas por ha?	0.26
Horas trabalhadas/dia	8		
Valor da hora maquina (R\$)	101.35	Quanto gasto de operacional em R\$ por ha?	28.11
Valor da hora homem (R\$)	6.99	Quanto gasto de operacional US\$ por ha?	8.44
Valor hora total trabalho (R\$)	108.34		
Valor da hora maquina (US\$)	30.43	Quanto gasto de Nativo em R\$ por ha?	84.50
Valor da hora homem (US\$)	2.10	Quanto gasto de Nativo US\$ por ha?	25.37
Valor hora total trabalho (US\$)	32.52		
Dose de Nativo (L/há)	0.97	Qual o custo total da aplicação R\$ por há?	112.61
Dose de Nativo (mL/m3)	0.028	Qual o custo total da aplicação US\$ por há?	33.80
Nativo (R\$/litro)	87.11		
Nativo (US\$/litro)	26.15		

Tabela 9: Cálculo do custo de aplicação de fungicida para controle da podridão floral dos citros em Santa Cruz do Rio Pardo no ano de 2016.

Santa Cruz 2016 - Laranja Pera			
Densidade (plantas/ha)	356	Quantas horas gastos para pulverizar 1ha?	0.27
Espaçamento na linha (m)	7.5		
Espaçamento dentro linha	3.8	Quantas horas gasto para esvaziar 1 bomba?	0.82
Volume de copa (m3/planta)	132.0		
Velocidade (km/h)	5	Quantas bombas pulverizo por dia?	8.42
Volume de calda (L/ha)	1300		
Volume de calda (mL/m3)	28	Quanto ha pulverizo por dia?	25.90
Tempo de reabastecimento (horas)	0.13		
Tamanho do tanque (litros)	4000	Quantas horas trabalhadas por ha?	0.31
Horas trabalhadas/dia	8		
Valor da hora maquina (R\$)	109.42	Quanto gasto de operacional em R\$ por ha?	36.17
Valor da hora homem (R\$)	7.66	Quanto gasto de operacional US\$ por ha?	10.39
Valor hora total trabalho (R\$)	117.08		
Valor da hora maquina (US\$)	31.43	Quanto gasto de Nativo em R\$ por ha?	112.61
Valor da hora homem (US\$)	2.20	Quanto gasto de Nativo US\$ por ha?	32.35
Valor hora total trabalho (US\$)	33.63		
Dose de Nativo (L/ha)	1.37	Qual o custo total da aplicação R\$ por há?	148.78
Dose de Nativo (mL/m3)	0.028	Qual o custo total da aplicação US\$ por há?	42.73
Nativo (R\$/litro)	82.20		
Nativo (US\$/litro)	23.61		

Tabela 10: Cálculo do custo de aplicação de fungicida para controle da podridão floral dos citros em laranjas para o ano de 2015.

Laranjas 2015 - Laranja Natal			
Densidade (plantas/ha)	507	Quantas horas gastos para pulverizar 1ha?	0.19
Espaçamento na linha (m)	6.8		
Espaçamento dentro linha	2.9	Quantas horas gasto para esvaziar 1 bomba?	1.51
Volume de copa (m ³ /planta)	32.5		
Velocidade (km/h)	7.8	Quantas bombas pulverizo por dia?	4.68
Volume de calda (L/ha)	500		
Volume de calda (mL/m ³)	30.3	Quanto ha pulverizo por dia?	37.46
Tempo de reabastecimento (horas)	0.2		
Tamanho do tanque (litros)	4000	Quantas horas trabalhadas por ha?	0.21
Horas trabalhadas/dia	8		
Valor da hora maquina (R\$)	101.35	Quanto gasto de operacional em R\$ por ha?	23.14
Valor da hora homem (R\$)	6.99	Quanto gasto de operacional US\$ por ha?	6.95
Valor hora total trabalho (R\$)	108.34		
Valor da hora maquina (US\$)	30.43	Quanto gasto de Nativo em R\$ por ha?	40.24
Valor da hora homem (US\$)	2.10	Quanto gasto de Nativo US\$ por ha?	12.08
Valor hora total trabalho (US\$)	32.52		
Dose de Nativo (L/há)	0.46	Qual o custo total da aplicação R\$ por há?	63.38
Dose de Nativo (mL/m ³)	0.028	Qual o custo total da aplicação US\$ por há?	19.03
Nativo (R\$/litro)	87.11		
Nativo (US\$/litro)	26.15		

Tabela 11: Cálculo do custo de aplicação de fungicida para controle da podridão floral dos citros em laranjas para o ano de 2016.

Laranjas 2016 - Laranja Natal			
Densidade (plantas/ha)	507	Quantas horas gastos para pulverizar 1ha?	0.19
Espaçamento na linha (m)	6.8		
Espaçamento dentro linha	2.9	Quantas horas gasto para esvaziar 1 bomba?	1.51
Volume de copa (m ³ /planta)	32.5		
Velocidade (km/h)	7.8	Quantas bombas pulverizo por dia?	4.68
Volume de calda (L/ha)	500		
Volume de calda (mL/m ³)	30.3	Quanto ha pulverizo por dia?	37.46
Tempo de reabastecimento (horas)	0.2		
Tamanho do tanque (litros)	4000	Quantas horas trabalhadas por ha?	0.21
Horas trabalhadas/dia	8		
Valor da hora maquina (R\$)	109.42	Quanto gasto de operacional em R\$ por ha?	25.00
Valor da hora homem (R\$)	7.66	Quanto gasto de operacional US\$ por ha?	7.18
Valor hora total trabalho (R\$)	117.08		
Valor da hora maquina (US\$)	31.43	Quanto gasto de Nativo em R\$ por ha?	37.98
Valor da hora homem (US\$)	2.20	Quanto gasto de Nativo US\$ por ha?	10.91
Valor hora total trabalho (US\$)	33.63		
Dose de Nativo (L/há)	0.46	Qual o custo total da aplicação R\$ por há?	62.98
Dose de Nativo (mL/m ³)	0.028	Qual o custo total da aplicação US\$ por há?	18.09
Nativo (R\$/litro)	82.20		
Nativo (US\$/litro)	23.61		

Tabela 12: Cálculo do custo de aplicação de fungicida para controle da podridão floral dos citros em Taquarituba para o ano de 2015.

Taquarituba 2015 - Laranja Pera			
Densidade (plantas/ha)	476	Quantas horas gastos para pulverizar 1ha?	0.22
Espaçamento na linha (m)	7.0		
Espaçamento dentro linha	3.0	Quantas horas gasto para esvaziar 1 bomba?	1.31
Volume de copa (m3/planta)	47.9		
Velocidade (km/h)	6.4	Quantas bombas pulverizo por dia?	5.31
Volume de calda (L/ha)	684		
Volume de calda (mL/m3)	30	Quanto ha pulverizo por dia?	31.08
Tempo de reabastecimento (horas)	0.2		
Tamanho do tanque (litros)	4000	Quantas horas trabalhadas por ha?	0.26
Horas trabalhadas/dia	8		
Valor da hora maquina (R\$)	101.35	Quanto gasto de operacional em R\$ por ha?	27.89
Valor da hora homem (R\$)	6.99	Quanto gasto de operacional US\$ por ha?	8.37
Valor hora total trabalho (R\$)	108.34		
Valor da hora maquina (US\$)	30.43	Quanto gasto de Nativo em R\$ por ha?	55.58
Valor da hora homem (US\$)	2.10	Quanto gasto de Nativo US\$ por ha?	16.68
Valor hora total trabalho (US\$)	32.52		
Dose de Nativo (L/há)	0.64	Qual o custo total da aplicação R\$ por ha?	83.47
Dose de Nativo (mL/m3)	0.028	Qual o custo total da aplicação US\$ por ha?	25.06
Nativo (R\$/litro)	87.11		
Nativo (US\$/litro)	26.15		

Tabela 13: Cálculo do custo de aplicação de fungicida para controle da podridão floral dos citros em Taquarituba para o ano de 2016.

Taquarituba 2016 - Laranja Pera			
Densidade (plantas/ha)	476	Quantas horas gastos para pulverizar 1ha?	0.22
Espaçamento na linha (m)	7.0		
Espaçamento dentro linha	3.0	Quantas horas gasto para esvaziar 1 bomba?	1.31
Volume de copa (m3/planta)	47.9		
Velocidade (km/h)	6.4	Quantas bombas pulverizo por dia?	5.31
Volume de calda (L/ha)	684		
Volume de calda (mL/m3)	30	Quanto ha pulverizo por dia?	31.08
Tempo de reabastecimento (horas)	0.2		
Tamanho do tanque (litros)	4000	Quantas horas trabalhadas por ha?	0.26
Horas trabalhadas/dia	8		
Valor da hora maquina (R\$)	109.42	Quanto gasto de operacional em R\$ por ha?	30.14
Valor da hora homem (R\$)	7.66	Quanto gasto de operacional US\$ por ha?	8.66
Valor hora total trabalho (R\$)	117.08		
Valor da hora maquina (US\$)	31.43	Quanto gasto de Nativo em R\$ por ha?	52.44
Valor da hora homem (US\$)	2.20	Quanto gasto de Nativo US\$ por ha?	15.06
Valor hora total trabalho (US\$)	33.63		
Dose de Nativo (L/há)	0.64	Qual o custo total da aplicação R\$ por ha?	82.58
Dose de Nativo (mL/m3)	0.028	Qual o custo total da aplicação US\$ por ha?	23.72
Nativo (R\$/litro)	82.20		
Nativo (US\$/litro)	23.61		

3. MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DOS COMPLEXOS *Colletotrichum acutatum* E *C. gloeosporioides* A TEBUCONAZOL E TRIFLOXISTROBINA

Resumo

A podridão floral dos citros (PFC), causada por espécies dos complexos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, é uma doença importante em anos em que o florescimento dos pomares coincide com períodos de chuvas frequentes. O controle químico da doença é feito preventivamente todos os anos, principalmente pela aplicação da mistura de trifloxistrobina (QoI) e tebuconazol (DMI), sem considerar a favorabilidade climática à doença. Aplicações exacerbadas podem favorecer a seleção de indivíduos resistentes. Esta seleção é detectada por meio do monitoramento da sensibilidade de isolados coletados antes e depois do uso extensivo de um fungicida. Com o intuito de verificar a ocorrência de isolados de *Colletotrichum* causadores da PFC resistentes a tebuconazol e trifloxistrobina, 164 isolados coletados entre 1999 e 2016 no estado de São Paulo foram expostos a doses crescentes destes fungicidas, pelo método da diluição em gradiente espiral. Uma sub-amostra destes isolados foi submetida ao método da inibição da germinação de conídios em doses crescentes de trifloxistrobina. Os 50 isolados coletados entre 1999 e 2000 desta coleção representam a população *baseline*. Os genes *Cyp51* e *CytB* foram sequenciados para que se verificasse a presença/ausência de mutações relacionadas a mudanças de sensibilidade aos QoI e DMI. Cento e cinquenta e seis isolados pertencem ao complexo *C. acutatum* e os demais, ao complexo *C. gloeosporioides*. Não foram verificadas mutações em nenhum dos isolados. Considerando o método da diluição em gradiente espiral, as CE₅₀ médias dos isolados foram de 0,134 µg/ml e 0,21 µg/ml para tebuconazol e trifloxistrobina, respectivamente. Para o método da inibição da germinação de conídios, a CE₅₀ média da trifloxistrobina foi de 0,002 µg/ml. Esses valores são importantes para estudos futuros de monitoramento de resistência desse patógeno ao tebuconazol e à trifloxistrobina. Os isolados utilizados neste estudo são sensíveis por apresentarem o mesmo nível de sensibilidade que a população *baseline*.

Palavras-chave: Podridão floral dos citros; DMI; QoI; EC₅₀; Resistência a fungicidas

Abstract

Postbloom fruit drop (PFD), caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes, is an important disease in years on which the flowering period of orchards coincides with frequent rainy seasons. In Brazil, PFD is controlled preventively every year, especially through the application of the mixture of trifloxystrobin (QoI) and tebuconazole (DMI). Exacerbated applications may favor the selection of resistant isolates. In order to verify if such selection occurred, it is important to monitor the sensitivity of the isolates collected before and after the extensive use of a fungicide. For this purpose, 164 *Colletotrichum* isolates collected between 1999 and 2016 in the state of São Paulo were exposed to increasing doses of tebuconazole and trifloxystrobin using the spiral gradient dilution methods. For trifloxystrobin, the method of conidial germination inhibition was also applied. Fifty isolates sampled between 1999 and 2000 from this collection represent the *baseline* population. The *Cyp51* and *CytB* genes were sequenced to verify the presence/absence of mutations related to changes in sensitivity to QoI and DMI. From the total number of isolates, 156 belong to the complex *C. acutatum* and 8 to the *C. gloeosporioides* complex. No mutations were observed in any of the isolates. Considering the spiral gradient dilution method, the mean EC₅₀ of the isolates were 0.134 µg/ml and 0.21 µg/ml for tebuconazole and trifloxystrobin, respectively. The mean EC₅₀ for trifloxystrobin was 0.002 µg/ml on conidial germination inhibition assays. These results are important for future studies to survey the resistance of this pathogen to tebuconazole and trifloxystrobin. The isolates used in this study are sensitive to tebuconazole and trifloxystrobin according to the similarity between the EC₅₀ values of the *baseline* population and the rest of the collection.

Keywords: Postbloom fruit drop; DMI; QoI; EC₅₀; Fungicide resistance

3.1. Introdução

Epidemias severas da Podridão Floral dos Citros (PFC), causada por espécies dos complexos *C. acutatum* (Simmond, 1965) e *C. gloeosporioides* (Lima et al., 2011), ocorrem quando chuvas frequentes coincidem com o período de florescimento das plantas nos pomares. Os sintomas da doença são caracterizados por lesões marrom-alaranjadas formadas pelos acérvulos dos fungos nas flores de citros. Sobre as lesões, elevada quantidade de conídios é formada imersa em mucilagem (Timmer & Zitko, 1996). Frutos oriundos das flores infectadas, eventualmente amarelados, caem de forma prematura, deixando seus cálices retidos nos ramos (Timmer et al., 1994). A queda precoce de frutos jovens está diretamente relacionada à redução da produção, principal prejuízo causado pela doença. Sem medidas adequadas de controle e quando condições favoráveis ao desenvolvimento da doença ocorrem, perdas de produção podem chegar a 100% (Timmer & Zitko, 1996). Entre floradas, o patógeno sobrevive epifiticamente na superfície de folhas de citros (Zulfiqar et al., 1996;

Mackenzie et al., 2010; Pereira, 2013) ou de plantas daninhas (Frare et al., 2016). A cada nova florada, conídios secundários são formados na superfície das folhas. A formação desses conídios ocorre após contato do fungo com substâncias lavadas das flores pela água da chuva ou orvalho (Agostini & Timmer, 1994). Os conídios secundários dão início à epidemia no pomar. A dispersão do patógeno ocorre por meio de respingos de chuva (Timmer, 1993), não sendo descartada a participação de insetos polinizadores como agentes de dispersão (Gasparoto et al., 2016).

No Brasil, o controle da doença é usualmente realizado por aplicações preventivas de fungicidas, independentemente da ocorrência de condições favoráveis à doença (Silva-Junior et al., 2014). Na região citrícola brasileira não é incomum a ocorrência de épocas secas durante a florada (Soares-Colletti et al., 2016). Portanto, muitas das pulverizações preventivas são realizadas desnecessariamente.

Aplicações consecutivas de fungicidas com mesmo modo de ação (MOA) aumentam a pressão de seleção aos isolados resistentes dos fungos e podem reduzir a eficiência dos fungicidas registrados para controle da doença. Inicialmente, indivíduos resistentes constituem pequena parte da população do patógeno, mas a frequência destes indivíduos tende a crescer com a eliminação da parcela sensível da população pelo uso de fungicidas (Ma & Michailides, 2005). Quando a população resistente mostra elevada adaptabilidade, torna-se necessária a substituição do fungicida por outros de diferentes modos de ação. A resistência de patógenos a fungicidas tornou-se importante com a substituição dos fungicidas de amplo espectro de ação por produtos de MOA mais específico (Brent & Hollomon, 2007a).

Desde 2011, o controle da podridão floral dos citros no sudoeste paulista vem sendo realizado com a pulverização de uma mistura de trifloxistrobina (inibidor da síntese de quinona externa) e tebuconazol (inibidor da desmetilação do Carbono 14) (Silva-Junior, informação pessoal). Inibidores da síntese de quinona externa (Qol), inibem a transferência de elétrons no mitocôndrio dos fungos ligando-se ao sítio Qo do complexo III do citocromo bc1 e interferindo na síntese de ATP (Xiao et al., 2003). Já os inibidores da desmetilação do Carbono 14 (DMI) inibem a síntese do ergosterol, composto essencial à formação de membranas fúngicas, se ligando à enzima 14 α -desmetilase (Cools & Fraaije, 2012).

A resistência de fungos aos Qols está relacionada a mutações pontuais no gene do citocromo b (*Cytb*). Três mutações já foram relatadas: (i) mudança do aminoácido glicina para alanina no códon 143 (G137A; Gisi et al., 2002), (ii) mudança do

aminoácido fenilalanina para leucina no códon 129 (F129L; Barlett et al., 2002), (iii) mudança do aminoácido glicina para arginina na posição 137 (G137R; Gisi et al., 2002). Mecanismos de resistência aos DMI descritos em fungo fitopatogênicos, incluem: a alteração da enzima codificada pelo gene *Cyp51* por mutações pontuais (Diaz-Guerra et al., 2003; Wang et al., 2015), a superexpressão do gene *Cyp51* (Ma et al., 2006) e pelo efluxo ativo da molécula de fungicida (Cools & Fraaije, 2012a; Schmitz et al., 2013).

Apesar da resistência de fungos fitopatogênicos aos DMI ser relativamente rara, já foram relatados casos de indivíduos resistentes em populações de *Mycosphaerella graminicola* (Mavroeidi & Shaw, 2006), *Monilinia fructicola* (Luo et al., 2008), *Blumeriella jaapii* (Ma et al., 2006) e *Venturia inaequalis* (Köller et al., 1997). Casos de indivíduos resistentes a moléculas do grupo QoI são comumente encontrados na literatura, como em populações de *Magnaporthe oryzae* em arrozais no Brasil (Castroagudín et al., 2015), *Colletotrichum graminicola* em campos de produção de grama nos Estados Unidos (Avila-Adame, 2003) e *Colletotrichum acutatum* e *Botrytis cinerea* em campos de produção de morangueiro, também nos Estados Unidos (Forcelini et al., 2016).

Medidas anti-resistência podem ser adotadas para reduzir a chance de ocorrência de populações patogênicas resistentes aos fungicidas, como: restringir a aplicação do fungicida apenas a períodos críticos, usar misturas de fungicidas específicos com outros, alternar aplicação de fungicidas com modos de ação distintos, realizar monitoramento para detectar a presença de isolados resistentes do patógeno (Dekker, 1982), restringir o número de aplicações por safra, aplicar somente a dose recomendada pelo fabricante do fungicida e adotar medidas de manejo integrado de pragas, incluindo controle biológico e cultural nas tomadas de decisão, se possível (Brent & Hollomon, 2007a). Nestes estudos de monitoramento de indivíduos resistentes, é crucial conhecer o nível de sensibilidade da população de patógenos nunca antes exposta ao fungicida de interesse. A sensibilidade desta população que não foi submetida a aplicações do fungicida de interesse é denominada de sensibilidade *baseline* (FRAC, n.d.). Após verificada a sensibilidade *baseline* da coleção do patógeno de interesse, amostras populacionais de indivíduos já expostos aos fungicidas devem regularmente coletadas com o intuito de verificar uma possível mudança de sensibilidade aos ingredientes ativos em questão.

A sensibilidade a Qols ou a DMIs de isolados de espécies dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* patogênicos a citros é desconhecida. A presença de mutações que conferem resistência a esses grupos de fungicidas tampouco foi relatada nesses patógenos. Desta forma, o objetivo desse trabalho consistiu em determinar as concentrações efetivas de tebuconazol e de trifloxistrobina capazes de inibir em 50% o desenvolvimento de isolados dos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* coletados antes e após o uso intensivo desse produto no controle da PFC. Além disso procurou-se verificar a existência de mutações relacionadas à resistência a tebuconazol e a trifloxistrobina no genoma dos isolados amostrados.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Coleta e caracterização de isolados

Cento e sessenta e quatro isolados, coletados entre 1999 e 2016 foram utilizados neste estudo (Tabela 1). Os isolados coletados entre 1999 e 2000 não haviam sido expostos a nenhum dos dois fungicidas e os resultados obtidos foram considerados como *baseline*. Os isolados foram coletados a partir de flores sintomáticas de citros, em diferentes propriedades do estado de São Paulo (Tabela 1 e Figura 1). As áreas lesionadas foram cortadas em tiras pequenas, posteriormente transferidas a meio de cultura seletivo de Martin. Após o crescimento das colônias, discos de micélio de *C. acutatum* foram transferidos para BDA.

Para o teste de sensibilidade, todos os isolados foram provenientes de culturas monospóricas. A obtenção de isolados monospóricos foi realizada por meio do preparo de suspensões de 5×10^4 conídios/ml de cada um dos isolados. Alíquotas dessas suspensões foram depositadas em placas de Petri com meio ágar-água. As placas foram incubadas a 23°C sob luz constante por 24 h. Com auxílio de uma agulha histológica, acoplada ao microscópio, um disco de meio de cultura de aproximadamente 1 mm de diâmetro, contendo apenas um esporo do fungo germinado, foi cortado e, posteriormente, depositado em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Os isolados foram preservados em papel filtro, mantidos em envelopes de papel com sílica-gel a -20°C.

Tabela 1: Detalhes da origem dos isolados dos complexos *Colletorichum acutatum* e *C. gloeosporioides* avaliados para sensibilidade aos fungicidas trifloxistrobina e tebuconazol, coletados no Estado de São Paulo, Brasil.

Área	Número	Município	Ano*	Identificação
1	5	Itapetininga	1999	CITITP- 3, 4, 8, 9 e 10
2	5	Mogi Guaçu	1999	SLGMGG – 2, 4, 7, 8 e 9
3	5	Mogi Guaçu	1999	SFLMGG – 1, 2, 3, 5 e 6
4	5	Itapetininga	2000	CITCAITP – 1 a 5
5	5	Mogi Guaçu	2000	FSHMGG- 1, a 5
6	10	Botucatu	2000	CIABTU – 2, 3, 5, 7 a 10, 13 a 15
7	10	Colômbia	2000	FSHCLB – 1, 3, 4, 6, 12, 14, 15 a 17, 20
8	5	Pardinho	2000	FZRPRD – 1, 4, 5, 6, 9
9	1	Santa Cruz do rio Pardo	2008	Ca142
10	1	Pedranópolis	2008	Cg83
11	19	Iaras	2013	RP – 1 a 19
12	12	Santa Cruz do Rio Pardo	2013	G – 1 a 12
13	8	Iaras	2015	15RP – 1 a 8
14	45	Santa Cruz do Rio Pardo	2015	15G – 1 a 45
15	11	Taquarituba	2016	16T – 1 a 11
16	8	Santa Cruz do Rio Pardo	2016	16G – 1 a 8
17	9	Iaras	2016	16RP – 1 a 9

* isolados coletados em 1999 e 2000 não foram expostos aos fungicidas tebuconazol e trifloxistrobina.

Os isolados de 1999 e 2000 foram coletados pela Profa. Dra. Natalia Peres e estão preservados no Gulf Coast Research and Education Center, Flórida, EUA. Os isolados das áreas 9 e 10 foram coletados pela equipe do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) e estão preservados no Departamento de Fitopatologia da ESALQ-USP (LFN, ESALQ-USP), Brasil. Os isolados de 2013 foram coletados pela Profa. Dra. Maria Cândida G. Gasparoto e estão preservados no LFN, ESALQ-USP, Brasil. Os isolados de 2015 e 2016 foram coletados nas fazendas experimentais onde foram realizados os ensaios de campo para determinação dos limiares de ação e também estão preservados no LFN, ESALQ-USP. Após a coleta e a obtenção das culturas monospóricas, a detecção dos complexos de espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* foi realizada, por meio de primers específicos para cada complexo. O DNA dos isolados foi extraído seguindo o protocolo do fabricante do kit de purificação Promega™ Wizard™ Genomic DNA. Após a extração, reações de PCR

com os pares de primers Calnt2/ITS4 (Sreenivasaprasad et al., 1996) e CgInt/ITS4 (Mills et al., 1992) foram realizadas para a identificação dos complexos de espécies.

Após as reações de PCR para a detecção dos complexos de espécies *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, foram realizadas as eletroforeses com todos os isolados para que fosse verificada a amplificação dos fragmentos de interesse do gene ITS. Os pares de primers específicos para cada um dos complexos amplificam regiões de 450 pares de base (pb) (Mills et al., 1992; Sreenivasaprasad et al., 1996).

Figura 1: Localização e ano de coleta dos isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* utilizados nos ensaios de sensibilidade aos fungicidas trifloxistrobina e tebuconazol

3.2.2. Determinação da concentração efetiva de tebuconazol e trifloxistrobina para inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*

A sensibilidade de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* à trifloxistrobina e ao tebuconazol foi avaliada por meio do método da diluição em gradiente em espiral (Förster et al., 2004; Amiri et al., 2013). O método consiste na

utilização do equipamento Autoplate (modelo 4000 e 5000, Spiral Biotech), cuja função é depositar doses crescentes e conhecidas dos fungicidas de interesse sobre meio de cultura em placas de Petri (Figura 2A-C). Para a trifloxistrobina, foram utilizadas doses compreendidas entre os intervalos de 0,005 a 0,5 µg/ml (Forcelini et al., 2016). Nos experimentos com o fungicida tebuconazol, as doses avaliadas foram de 0,01 a 1 µg/ml (Xu et al., 2014). Dado o intervalo e o peso molecular dos fungicidas, o software Spiral Gradient Endpoint (SGE), fornecido pelo fabricante do equipamento, calcula a concentração da solução estoque a ser utilizada. Cinquenta microlitros da solução estoque foi aplicada de modo exponencial sobre meio BDA, usando o equipamento Spiral Plate, de acordo com a amplitude de concentrações de fungicida, resultando no gradiente radial de 1:100.

A concentração efetiva capaz de inibir em 50% (CE₅₀) o crescimento micelial foi determinada para cada um dos isolados. Para tal propósito, 50 mL de BDA modificado (39 g de BDA Difco + 14 g de ágar Difco por litro de água) foram vertidos em placas de Petri de 150 mm de diâmetro para que uma camada de 3,3 mm de meio de cultura fosse obtida. Suspensões de 10⁶ conídios/mL de *C. acutatum* e de *C. gloeosporioides*, obtidas de colônias de 7 dias (incubadas em meio de aveia-ágar, a 23°C e luz constante), foram distribuídas (1 mL/placa) com alça de Drigalski sobre meio BDA modificado. Cada placa de Petri foi selada com papel filme e mantida a 23°C sob luz constante por 48 h até que o crescimento do patógeno fosse homogêneo sobre o meio de cultura.

Tiras de inóculo (6 cm de comprimento por 0,7 cm de largura), obtidas a partir de cortes do meio de cultura com as colônias fúngicas, feitos com auxílio de um molde, foram depositados sobre as placas após a distribuição dos fungicidas. Foram utilizados dois isolados por placa com duas tiras por isolado, distribuídas em posições opostas (Figura 2D). Como tratamento testemunha, quatro tiras de isolados distintos foram distribuídas de maneira equidistante em uma mesma placa contendo meio BDA sem adição dos fungicidas. As placas foram incubadas a 23°C e luz constante por três dias. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento.

Figura 2: Processo de aplicação de fungicida e avaliação do crescimento micelial de *C. acutatum*. Aplicação de fungicida em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (A); visão geral do equipamento Autoplate (modelo 5000, Spiral Biotech), (B); corante cristal violeta aplicado em gradiente em espiral, com maior deposição de corante mais próximo ao centro da placa (C); visão final do experimento de crescimento micelial, à esquerda, isolados em placa com tebuconazol e, à direita, isolados em meio de cultura sem fungicida (tratamento testemunha) (D)

Após esse período, o crescimento micelial dos isolados do tratamento testemunha foi medido perpendicularmente à tira e a partir de sua borda, com o auxílio de uma régua. Nas placas com fungicida, marcou-se o ponto onde o crescimento micelial do mesmo isolado foi correspondente a 50% da média do tratamento testemunha. A distância entre esse ponto e o centro da placa foi mensurada e a concentração do fungicida neste local foi calculada com auxílio do software SGE. Essa concentração representa a CE_{50} do fungicida para o isolado testado.

3.2.3. Determinação da concentração efetiva (CE₅₀) de trifloxistrobina para inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* e relação com o método de inibição do crescimento micelial

Para trifloxistrobina, além da inibição micelial, testou-se também a inibição da germinação de conídios (Forcelini et al., 2016; Mondal et al., 2005). Foram estabelecidas doses com base nos dados da literatura para outras Qols (Forcelini et al., 2016) e em testes preliminares. Os tratamentos utilizados foram 0,0001, 0,001, 0,01 e 0,1 µg.ml⁻¹ de trifloxistrobina, além da testemunha, em que o fungicida não foi utilizado.

Meio de cultura ágar-água (AA) foi utilizado nos experimentos de germinação de conídios. Após a autoclavagem do meio, este foi resfriado a 60°C e as diferentes concentrações de trifloxistrobina foram adicionadas. O meio foi vertido em placas de Petri de poliestireno. Três alíquotas de 30 µl da suspensão de conídios de *C. acutatum* na concentração 5x10⁴ conídios.ml⁻¹ de cada isolado foram depositadas em placas com meio de cultura solidificado, em demarcações previamente feitas na placa de poliestireno. As placas foram individualmente dispostas em caixas de plástico com papel de filtro umedecido e mantidas a 23°C sob luz constante por nove horas. Após esse período, 30 µl de lactoglicerol foram depositados sobre os conídios dos isolados.

A avaliação foi feita por meio da porcentagem de germinação de conídios. Foram considerados como germinados os conídios com tubo germinativo de mesmo tamanho ou maior do que seu comprimento. A CE₅₀ foi determinada por meio de regressão linear entre a porcentagem de inibição da germinação e o logaritmo da concentração do fungicida. As CE₅₀ obtidas pelos métodos do gradiente de diluição em espiral e da inibição da germinação de esporos foram ajustadas à regressão linear a fim de estabelecer uma possível relação entre os valores.

3.2.4. Caracterização molecular de regiões do genoma relacionadas à resistência a Qols e DMIs em isolados do complexo *Colletotrichum acutatum*

O gene *Cytb* foi amplificado em oito isolados da população *baseline* desse estudo, sensíveis a Qols. A extração do DNA foi feita por meio do FastDNA®Kit, e a

concentração do produto da extração foi medida por espectofotômetro (Nanodrop, ND 1000, Version 3.8.1). A concentração das amostras de DNA foi calibrada para 25 ng/ μ L. Os códons 143, 137 e 129 do gene *Cytb* foram analisados no intuito de se verificar mutações. Foram realizadas reações de cadeia de polimerase (PCR) com os *primers* Grami1F (5'-GAAGAGGTATGTACTACGGTTCATATAG-3') e Grami1R (5'-TAGCAGCTGGAGTTTGCATAG-3') (Forcelini et al., 2016) para que parte do gene *Cytb* fosse amplificada. O ciclo programado no termociclador seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95°C por três minutos, 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 60°C por 50 segundos e 72°C por um minuto; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram dispostos em células de um gel a 1% de agarose em buffer 1X Tris-acetato-EDTA (0.04 M Tris-Acetato, 0.0001 M EDTA). Brometo de etídio foi usado para a coloração. O gel submerso em buffer foi exposto a potencial elétrico de 75 V por 45 minutos. Após esse período, o gel foi retirado da solução de buffer e levado a câmara UV para visualização e aquisição de imagens. Após verificada a amplificação do fragmento de interesse, as amostras foram preparadas seguindo o protocolo fornecido pela empresa responsável pelo sequenciamento (Genewiz Incorporation, South Plainfield, NJ). Após a aquisição das sequências, as mesmas foram alinhadas pelo software MEGA v5.10. Por meio deste software, as sequências de nucleotídeos também foram traduzidas para aminoácidos. Os dados da sequência foram alinhados com a sequência do gene do citocromo B depositada no GenBank do NCBI.

O gene *Cyp51B* foi amplificado em quatro isolados de *C. acutatum* coletados em 2013 e 2015. DNA genômico foi extraído a partir de colônias que cresceram em BDA por 10 dias. Os primers utilizados foram o *Cyp51BF* (5'-ATATTCGTCTTGTGCGTGCG - 3') e *Cyp51BR* (5' – GCAGACTAGACGGTCACCA - 3') (Baggio et al., dados não publicados). O ciclo do termociclador foi ajustado segundo o seguinte protocolo: 95°C por dois minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por três minutos; e extensão final a 72°C por 5 minutos. De maneira análoga ao que foi feito para o fragmento do gene *Cytb*, os códons 136, 147 e 175 das amostras sequenciadas foram analisados seguindo o mesmo protocolo.

3.3. Resultados

3.3.1. Coleta e caracterização molecular de isolados

Fragmentos de DNA de parte do gene ITS característicos de espécies do complexo *C. acutatum* foram obtidos em 73 isolados das populações de 2015 e 2016. O produto de PCR com o par de primers Calnt2/ITS4 não foi amplificado ou apresentou padrão distinto de *C. acutatum* (Figura 3A) em oito amostras. Estas amostras após PCRs com o par de primers CgInt/ITS4 amplificaram a região do ITS característica de espécies do complexo *C. gloeosporioides* (Figura 3B).

Figura 3: Gel de eletroforese (1% agarose) de fragmentos de parte do gene *ITS* de uma amostra de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* submetidos a PCR com os pares de primers Calnt2/ITS4 (A) e CgInt/ITS4 (B). As bandas próximas à linha do marcador de 500 pb representam isolados pertencentes ao complexo *C. acutatum* (A) e *C. gloeosporioides* (B). A identificação dos isolados, de acordo com a Tabela 1, aparece abaixo de cada banda.

3.3.2. Determinação da concentração efetiva de tebuconazol e trifloxistrobina para inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*

A CE_{50} média obtida em dois experimentos pelo método do crescimento micelial, assim como o intervalo das concentrações entre diferentes isolados no local e no ano em que eles foram coletados para os fungicidas tebuconazol e trifloxistrobina, estão listados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Média e intervalo de valores de CE_{50} de tebuconazol para isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, obtidos pelo método da diluição em gradiente espiral.

Área*	Número de isolados	CE_{50} médio ($\mu\text{g/ml}$)	Variação de CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		Ano
1	5	0,152	0,062	0,256	1999
2	5	0,125	0,049	0,256	1999
3	10	0,114	0,031	0,256	1999
4	5	0,137	0,07	0,288	2000
5	5	0,112	0,044	0,203	2000
6	5	0,127	0,031	0,256	2000
7	10	0,152	0,062	0,228	2000
8	5	0,128	0,062	0,228	2000
9	1	0,096	0,044	0,180	2008
10	1	0,268	0,126	0,41	2008
11	19	0,095	0,073	0,288	2013
12	12	0,104	0,027	0,324	2013
13	8	0,299	0,1	0,462	2015
14	45	0,101	0,027	0,365	2015
15	11	0,090	0,049	0,16	2016
16	8	0,089	0,055	0,142	2016
17	9	0,087	0,044	0,126	2016
Baseline	50	0,131	0,031	0,288	
<i>C. gloeosporioides</i>	9	0,284	0,1	0,462	
<i>C. acutatum</i>	105	0,095	0,027	0,365	
Total	164	0,134			

* o isolado da área 10, dois isolados da área 11, e todos os isolados da área 13 pertencem ao complexo *C. gloeosporioides*. Os demais pertencem ao complexo *C. acutatum*.

Tabela 3: Média e intervalo de valores de CE_{50} de trifloxistrobina para isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, obtidos pelo método da diluição em gradiente espiral.

Área	Número de isolados	CE_{50} médio ($\mu\text{g/ml}$)	Variação de CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		Ano
1	5	0,112	0,05	0,214	1999
2	5	0,159	0,035	0,501	1999
3	10	0,203	0,039	0,444	1999
4	5	0,137	0,031	0,444	2000
5	5	0,285	0,117	0,501	2000
6	5	0,158	0,031	0,393	2000
7	10	0,209	0,092	0,393	2000
8	5	0,202	0,103	0,444	2000
9	1	0,239	0,132	0,348	2008
10	1	0,21	0,044	0,501	2008
11	19	0,325	0,184	0,639	2013
12	12	0,269	0,012	0,639	2013
13	8	0,371	0,117	0,639	2015
14	45	0,218	0,035	0,501	2015
15	11	0,167	0,039	0,393	2016
16	8	0,173	0,017	0,393	2016
17	9	0,132	0,039	0,444	2016
Baseline	50	0,183	0,031	0,501	
<i>C. gloeosporioides</i>	9	0,291	0,044	0,639	
<i>C. acutatum</i>	105	0,218	0,012	0,639	
Total	164	0,210			

* o isolado da área 10, dois isolados da área 11, e todos os isolados da área 13 pertencem ao complexo *C. gloeosporioides*. Os demais pertencem ao complexo *C. acutatum*.

Os isolados apresentaram comportamento distinto quando expostos aos dois ingredientes ativos. No meio de cultura com a adição de tebuconazol, pode-se verificar 100% de inibição de crescimento micelial dentro das doses a que os isolados foram expostos. No entanto, quando os isolados foram expostos à trifloxistrobina, o crescimento não foi completamente inibido. A CE_{50} para os isolados expostos ao tebuconazol não variou expressivamente. Para o tebuconazol, A CE_{50} média, mínima e máxima de todos os isolados foi de 0,134, 0,031 e 0,462 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Com relação às diferentes áreas de coleta de isolados, a maior

CE₅₀ média foi de 0.299 µg/ml, na área 8 (Iaras, 2015), na qual foram coletados apenas isolados do complexo *C. gloeosporioides*. A CE₅₀ média mais baixa foi 0.087 µg/ml, para isolados do complexo *C. acutatum* coletados na área 17 (Iaras, 2016).

A variabilidade dos resultados foi maior nos ensaios com a trifloxistrobina, contudo, nenhum dos isolados apresentou CE₅₀ maior que 0.639 µg/ml. As CE₅₀ média e mínima de trifloxistrobina para todos os isolados foi de 0,21 e 0,012 µg/ml, respectivamente. Considerando as diferentes áreas, a maior CE₅₀ para a trifloxistrobina foi de 0,371 µg/ml, também para a área 8, assim como para o tebuconazol. A menor CE₅₀ registrada considerando cada área foi de 0,112 µg/ml, observada para isolados coletados na área 1. Assim como nos estudos com tebuconazol, as maiores CE₅₀ foi verificada em isolados do complexo *C. gloeosporioides*.

Os valores de CE₅₀ obtidos para os isolados provenientes de diferentes áreas e anos de coleta foram similares. A uniformidade dos resultados indica que não houve mudança de sensibilidade na população do fungo nas áreas avaliadas, baseando-se na amostra deste estudo.

3.3.3. Determinação da concentração efetiva (CE₅₀) de trifloxistrobina para inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* e relação com o método de inibição do crescimento micelial

Os valores de CE₅₀ para a trifloxistrobina estimados pelo método da germinação de conídios foram menores do que os de CE₅₀ estimados pelo método da diluição em gradiente em espiral, variando de 0,0008 a 0,0079 µg/ml, e a média dos CE₅₀ 0,002 µg/ml (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de coeficientes de determinação (R^2), coeficientes angulares, interceptos x , log da CE_{50} e estimativas de CE_{50} de isolados, estimados pelo método da inibição da germinação de esporos em diferentes doses.

Isolado	REPETIÇÃO 1					REPETIÇÃO 2				
	R^2	Coef		log		R^2	Coef		log	
		ang	intercepto	CE_{50}	CE_{50}		ang	intercepto	CE_{50}	CE_{50}
RP01	0.98	23.27	118.28	-2.93	0.0012	0.95	29.09	126.21	-2.62	0.0024
RP04	0.95	28.95	129.56	-2.75	0.0018	0.94	29.72	129.51	-2.68	0.0021
RP05	0.98	28.69	129.08	-2.76	0.0018	0.95	30.77	128.18	-2.54	0.0029
RP8	0.97	29.34	129.24	-2.70	0.0020	0.97	31.97	132.49	-2.58	0.0026
RP10	0.99	23.79	120.72	-2.97	0.0011	0.98	21.68	116.46	-3.07	0.0009
RP6	0.96	28.72	125.89	-2.64	0.0023	0.96	23.73	119.46	-2.93	0.0012
RP11	0.98	23.08	119.33	-3.00	0.0010	0.98	21.76	118.96	-3.17	0.0007
RP19	0.98	35.44	119.69	-1.97	0.0108	0.85	28.05	114.74	-2.31	0.0049
RP18	0.83	21.12	114.06	-3.03	0.0009	0.98	26.00	125.31	-2.90	0.0013
RP17	0.97	29.89	125.12	-2.51	0.0031	0.97	29.47	123.94	-2.51	0.0031
RP2	0.97	29.99	123.54	-2.45	0.0035	0.92	27.73	119.07	-2.49	0.0032
16T2	0.98	27.3	129.2	-2.90	0.0013	0.98	28.0	130.3	-2.9	0.0014
15G20	0.97	25.2	125.2	-3.00	0.0010	0.98	30.3	133.1	-2.7	0.0018
SLGMGG7	0.84	25.38	114.50	-2.54	0.0029	0.90	28.80	114.97	-2.26	0.0055
SFLMGG6	0.75	21.00	108.42	-2.78	0.0017	0.85	25.98	113.01	-2.43	0.0038
CIABTU15	0.90	22.97	118.31	-2.97	0.0011	0.91	23.12	117.91	-2.94	0.0012
FZRPRD6	0.89	21.60	113.44	-2.94	0.0012	0.95	29.52	123.99	-2.51	0.0031

O cálculo das CE_{50} pelo método da inibição da germinação está representado graficamente na Figura 4 para uma amostra de isolados. Os demais gráficos utilizados na estimativa de CE_{50} aparecem no Anexo 1.

Figura 4: Inibição da germinação de esporos dos isolados de *C. acutatum* sob diferentes concentrações do fungicida trifloxistrobina no experimento 1 com os isolados RP 01 (A), RP 04 (B), RP 05 (C), RP 08 (D).

A fim de estabelecer uma relação linear entre os dois métodos, foi feita a regressão linear entre os dados de CE_{50} obtidos pelo crescimento micelial e pelo método da inibição da germinação de esporos (Figura 5).

Figura 5: Relação linear entre os valores de CE_{50} obtidos a partir do método da inibição do crescimento micelial, no eixo Y, e da germinação de esporos, no eixo X.

O R^2 da regressão foi baixo, o que implica em uma regressão pouco acurada. Apesar de R^2 consideravelmente baixo, a regressão linear foi significativa (Tabela 5). De acordo com a regressão, o método da diluição em gradiente espiral superestima em aproximadamente 18 vezes a sensibilidade dos isolados.

Tabela 5: parâmetros calculados para determinação da significância da regressão entre os dados de CE_{50} estimados pelos métodos da diluição em gradiente espiral e da inibição da germinação de conídios.

	GL ^a	SQ ^b	MQ ^c	F ^d	F de significação
Regressão	1	3.75E-05	3.75E-05	13.42879	0.00255
Resíduo	14	3.91E-05	2.8E-06		
Total	15	7.67E-05			

^a graus de liberdade

^b soma de quadrados

^c quadrado médio

^d F calculado

3.3.4. Caracterização molecular de regiões do genoma relacionadas à resistência a Qols e DMIs em isolados do complexo *Colletotrichum acutatum*

Antes das amostras serem preparadas para o sequenciamento, a amplificação da região do gene de interesse foi confirmada por eletroforese. Sete das oito amostras sequenciadas foram analisadas no mesmo gel. Apesar de tentativas prévias, nenhuma das amostras de isolados pertencentes ao complexo *C. gloeosporioides* foi amplificada de maneira satisfatória. A amplificação das bandas está representada na Figura 6.

Figura 6: Amplificação de fragmentos do gene citocromo b de isolados de *Colletotrichum acutatum* em gel de eletroforese (1% agarose). Identificação dos isolados está mostrada nas colunas respectivas.

As amostras sequenciadas foram comparadas ao acesso NC027280.1 no GenBank, sequência da mitocôndria do isolado KC05 de *C. acutatum* (Kim et al., 2016). Após o alinhamento das sequências, os códons relacionados à resistência a Qols foram comparados. Os oito isolados mostraram sequências idênticas. Não foram encontradas diferenças entre as sequências dos códons 129, 137 e 143 dos isolados sequenciados em comparação ao isolado do GenBank. Contudo, verificou-se um SNP (single nucleotide polymorphism) na posição 130, apesar dessa substituição não alterar a proteína traduzida nesse códon (Figura 7).

Figura 7: Alinhamento das sequências analisadas dos isolados de *Colletorichum acutatum* patogênicos a citros (linha superior) e do depósito do GenBank do *Cytb* (linha inferior). Abaixo das sequências, as proteínas traduzidas para os códons 129 ao 143 do gene *Cytb*

Como mostrado na Figura 7, nenhuma das três mutações relacionadas à resistência a Qols foi detectada nos isolados. Este resultado foi esperado, já que os isolados do estudo nunca foram expostos às Qols, portanto não houve pressão de seleção de resistência no campo que aumentasse a proporção de isolados resistentes na população.

O mesmo procedimento foi realizado para o sequenciamento do gene *Cyp51B*. As sequências obtidas foram pareadas à sequência completa do gene do isolado Ca95-61C (Figura 8) (Baggio et al., dados não publicados). Foram verificados os códons 136, 147 e 175 do gene sequenciado, após comparação dos aminoácidos traduzidos por outras espécies em diferentes códons (Mair et al., 2016). Assim como o observado para o gene *Cytb*, não foram identificadas mutações relacionadas a mudanças de sensibilidade a DMIs em nenhuma das amostras sequenciadas.

TACGACTGCCCCAACGCCAAGCTCATGGAGCAGAAGAAGTTCATG...TACTTCAAG
TACGACTGCCCCAACGCCAAGCTCATGGAGCAGAAGAAGTTCATG...TACTTCAAG

Sequência traduzida - YDCPNAKLMEQKKFMKIALTTEAFRSYTPIIADEVTNYFK
YDCPNAKLMEQKKFMKIALTTEAFRSYTPIIADEVTNYFK

Figura 8: Alinhamento das sequências analisadas dos isolados de *Colletotrichum acutatum* de citros e do isolado Ca95-61C. Abaixo das sequências, os aminoácidos traduzidos pelo gene *Cyp51B* no fragmento em destaque. Circundado em vermelho, os códons 136, 147 e 175, nos quais mudanças dos aminoácidos traduzidos conferiram resistência a outros fungos.

3.4. Discussão

Os produtos registrados para controle da podridão floral dos citros no Brasil têm como ingredientes ativos carbendazim, tebuconazol + trifloxistrobina e fluxapiroxade + piraclostrobina (Agrofit, 2016). Apesar de registrado no Ministério da Agricultura para controle da PFC, carbendazim foi retirado da lista de Produção Integrada de Citros (PIC) (Fundecitrus, n.d.). A remoção ocorreu devido à detecção de resíduos da molécula em carregamentos de suco nos Estados Unidos (Geraldello, 2015), um dos principais importadores de suco de laranja brasileiro. No país norte-americano, a aplicação da molécula é proibida em áreas produtoras de citros, conseqüentemente, resíduos de qualquer ordem deste fungicida em produtos e subprodutos cítricos não são toleráveis. Por este motivo, atualmente, o controle da PFC no Brasil vem sendo realizado pela aplicação de Qols em mistura com outros ingredientes ativos. O uso da mistura trifloxistrobina + tebuconazol é comumente adotado pelos produtores brasileiros, e se mostrou mais eficiente que o carbendazim no controle da PFC (Silva-Junior et al., 2014). Para controle da doença no estado da Flórida, nos Estados Unidos, a lista de ingredientes ativos registrados é ainda menor, sendo composta apenas por moléculas do grupo Qol e Ferbam, um fungicida de contato de atuação multi-sítio. Ademais, produtores da Flórida são orientados a não realizarem mais que quatro aplicações de Qols por safra (Peres & Dewdney, 2016), o que é problemático durante floradas de longa duração.

A atual tendência à substituição de fungicidas de MOA multisítio a outros de atuação em passos metabólicos específicos apresenta vantagens como a usual

sistemicidade destes produtos, característica incomum aos fungicidas de ação multi-sítio (Oliver & Hewitt, 2014), que normalmente são tópicos. Além disso, fungicidas com MOA unisítio são altamente seletivos a certos organismos, o que os torna pouco tóxicos aos seres humanos e a outras espécies não-alvo (McGrath, 2004). Contudo, o risco de estabelecimento de populações resistentes é muito maior a fungicidas de MOA unisítio do que a fungicidas de MOA multi-sítio (Brent & Hollomon, 2007a). Isto se deve ao fato de que, geralmente, é necessário ocorrer apenas uma mutação em um indivíduo para que este se torne resistente a um fungicida unisítio, ao passo que diversas mutações devem ocorrer para que um fungo seja resistente a um fungicida multi-sítio (Brent & Hollomon, 2007b). Este fato pode ser evidenciado pelo período entre o registro de um fungicida até o aparecimento de indivíduos resistentes a seu MOA. Enquanto fungicidas cúpricos vêm sendo utilizados desde 1885 (Agrios, 2005) sem que haja casos relatados de resistência de fungos a estes compostos, dois anos após o registro das estrobilurinas já foram descritos problemas com indivíduos resistentes aos Qols (Heaney et al., 2000)

No Brasil, apesar de muitas das aplicações de fungicidas serem realizadas desnecessariamente, não foram encontrados isolados resistentes a DMIIs ou a Qols neste estudo. O fato de os ingredientes ativos serem aplicados em mistura no Brasil é um fator importante de manejo de resistência (Brent & Hollomon, 2007a) comumente adotado pelos produtores brasileiros. Mesmo que haja a presença de indivíduos resistentes a um dos fungicidas da mistura, o outro ingrediente ativo de MOA distinto pode ser suficiente para inibir o crescimento da população resistente (Fao, 2012).

A CE_{50} média para a trifloxistrobina encontrada nestes ensaios, de 0,21 $\mu\text{g/ml}$, foi semelhante à encontrada para isolados sensíveis a Qols de *C. acutatum* patogênicos à cultura do morangueiro, de 0,22 $\mu\text{g/ml}$ (Forcelini et al., 2016). Pode-se notar a clara diferença entre as CE_{50} de trifloxistrobina obtidas pelo método do crescimento micelial com relação às estimadas pelo método da inibição da germinação, apesar de apenas uma parte dos isolados ter sido submetida ao teste da inibição de germinação de conídios para o cálculo da CE_{50} . Este fato se dá devido à maior sensibilidade do tubo germinativo dos fungos aos fungicidas do grupo Qol do que o micélio dos mesmos (Vincelli, 2002). Contudo, para fins práticos, o método do crescimento micelial é usualmente mais vantajoso.

Não foram encontradas as substituições de aminoácidos traduzidos nos códons 129, 137 e 143 do gene *Cytb* que conferem resistência aos Qols. Apenas um SNP foi observado nos isolados analisados em comparação à sequência depositada no GenBank. Esse tipo de variação é comum nas espécies do complexo de *C. acutatum*. Vários estudos mostraram a variabilidade entre patógenos que, em *sensu lato*, são comumente classificados como *C. acutatum* (Guerber et al., 2003; Bragança et al., 2016; Nirenberg et al., 2002). Na literatura há diversos relatos dessas mutações conferirem resistência de fungos aos fungicidas do grupo Qol, como em isolados de *Venturia inaequalis* com a presença da mutação G143A (Frederick et al., 2014). A substituição G143A também foi relatada para isolados de *Cercospora beticola* coletados em regiões da França e da Itália, devido a uma mutação pontual de nucleotídeo no códon 428 do *Cytb* (Birla et al., 2012). Tal mutação confere resistência total a fungicidas do grupo Qols. As mutações que ocorrem nos códons 129 e 137 conferem resistência parcial a Qols, o que por vezes não implica em falhas de controle na dose de campo dos fungicidas (FRAC, 2006). As mutações nos códons 129 e 137 não conferem, portanto, resistência de campo dos fungos a esses fungicidas (Brent & Hollomon, 2007a). Tais mutações já foram descritas para outros patógenos, como para isolados de *P. tritici-repentis* coletados na Suécia e na Dinamarca, nos quais se verificou a mutação no códon 137, que conferiu níveis de resistência similares aos observados em mutantes com a substituição do aminoácido traduzido no códon 129 (Sierotzki et al., 2007). Isolados de *Pyricularia grisea* resistentes a Qols apresentaram ambas as mutações F129L e G143A, conferindo resistência a Qols moderada e total aos isolados, respectivamente (Kim et al., 2003). Recentemente, nos EUA, o sequenciamento do *Cytb* de diferentes isolados de *C. acutatum* provenientes de plantas de morangueiro evidenciaram a presença tanto da mutação F129L quanto da G143A, conferindo resistência parcial e total dos isolados a Qols, respectivamente (Forcelini et al., 2016), o que evidencia que tais mutações são passíveis de ocorrer em isolados de *C. acutatum* patogênicos a citros.

As CE_{50} encontradas neste estudo para o tebuconazol são menores do que os valores encontrados para amostra *baseline* de indivíduos do complexo *C. gloeosporioides* patogênicos a videira e morangueiro, que variaram de 0,27 a 3,75 $\mu\text{g/ml}$ (Xu et al., 2014). No entanto, a CE_{50} média para os isolados da espécie *C. gloeosporioides* patogênicos à videira e ao morangueiro (Xu et al., 2014) é

semelhante ao resultado encontrado neste estudo para espécies do mesmo complexo. Apesar de não haver informação com relação à sensibilidade *baseline* de *C. acutatum* ao tebuconazol, há informações com relação a outros DMIs. Isolados de pomares de citros na Flórida apresentaram valores de CE_{50} médio de 1,01 $\mu\text{g/ml}$ ao fenbuconazole (Mondal et al., 2005), também mais alta do que a CE_{50} média desse estudo, de 0,134 $\mu\text{g/ml}$. Isolados coletados em 2008 em pomares brasileiros apresentaram valores de CE_{50} de difenoconazol variando de 0,07 a 0,14 $\mu\text{g/ml}$ (Silva-Junior, 2011), similares aos resultados médios encontrados neste estudo.

O risco de ocorrência de resistência a DMIs é considerado baixo quando comparado ao dos fungicidas do grupo QoI (FRAC, n.d.), contudo, casos de resistência a fungicidas deste grupo já foram relatados na literatura. De maneira análoga ao observado no gene *Cytb*, o sequenciamento do *Cyp51B* não evidenciou substituições de aminoácidos traduzidos em códons associados a mudanças de sensibilidade a DMIs. Entretanto, ao contrário do observado no *Cytb*, a identidade da sequência deste gene entre as diferentes espécies é considerada variável, sendo de 98% entre espécies de mamíferos até 41% nos eucariotos unicelulares (Lepesheva & Waterman, 2006). Por este motivo, as mutações associadas a mudanças de sensibilidade aos DMIs podem ocorrer em códons distintos para diferentes espécies fúngicas (Mair et al., 2016; Schmitz et al., 2013). Foram verificados todos os códons nos quais já foram relatadas mutações que conferem resistência aos DMIs (Mair et al., 2016). Pela alta variabilidade que este gene apresenta entre espécies, alguns dos aminoácidos traduzidos em códons do *Cyp51* de outras espécies fúngicas não são traduzidos nos mesmos códons dos isolados de espécies do complexo *C. acutatum* amostrados neste estudo.

A substituição do aminoácido tirosina para fenilalanina no códon 136 (Y136F) do gene *Cyp51B* foi associada a resistência aos DMI para outros fungos, como *Monilinia fructicola* (Chen et al., 2012) e *Erysiphe necator* (Rallos & Baudoin, 2016). A mutação presente no códon 147 que implica na substituição do aminoácido traduzido de lisina para glutamina (K147Q) foi relatada em *Blumeria graminis* conferindo alto grau de resistência do patógeno a DMIs, assim como a substituição de lisina para asparagina (K175N) (Wyand & Brown, 2005). Na literatura, há relatos de mutações pontuais que conferem mudança de sensibilidade aos DMI no gene *Cyp51A*, além do *Cyp51B* (Mair et al., 2016). No passado, para espécies fúngicas somente conhecia-se um gene da família *Cyp51*, sendo o primeiro relato da

existência de dois genes descrito para *Aspergillus fumigatus* (Mellado et al., 2001). Ocorre que não há informação na literatura que confirme a existência de dois genes para *C. acutatum*, sendo possível que nesta espécie fúngica somente haja a presença de um gene da família *Cyp51*. Baseado em outras espécies fúngicas, primers específicos para *Cyp51A* foram desenvolvidos, mas não houve amplificação de fragmentos de DNA para os isolados de *C. acutatum* patogênicos a morangueiro (Baggio et al., dados não publicados).

Ao contrário do que ocorre para a mutação G143A do *CytB*, mutações nos genes *Cyp51* conferem resistência quantitativa aos fungos (Brent & Hollomon, 2007a), também chamada de resistência unimodal, contínua, poligênica, direcional ou progressiva (Brent & Hollomon, 2007a; Thind, 2012). Este tipo de mutação confere diferentes níveis de resistência do fungo ao fungicida, os quais são controlados por mutações independentes (Wyenandt, 2015), além dos outros mecanismos que conferem mudança de sensibilidade aos azois, como citado anteriormente. O efeito das mutações, da superexpressão gênica e do efluxo ativo de azois é sinérgico, ou seja, seus efeitos são aditivos nas mudanças de sensibilidade dos fungos aos DMI (Brent & Hollomon, 2007a; Schmitz et al., 2013).

Apesar de não encontrada para a coleção de isolados de *C. acutatum* dos citros, a resistência deste fungo a Qols e a DMIs pode ocorrer com o uso contínuo de fungicidas de mesmo MOA. Estratégias de manejo como a alternância do uso de fungicidas de diferentes modos de ação, a utilização de fungicidas de ação multi-sítio e a tomada de decisão baseada em sistemas de alerta de doenças devem ser adotadas para que a pressão de seleção nos sistemas agrícolas seja menor (Brent & Hollomon, 2007a). Tanto no sudoeste do estado de São Paulo quanto no estado da Flórida, a pequena quantidade de produtos registrados dificulta a adoção da alternância de produtos com diferentes modos de ação pelos produtores. Porém, na Flórida não foram realizados estudos que avaliassem a sensibilidade de uma amostra populacional de isolados de *Colletotrichum* spp. coletados recentemente em pomares locais, para que se verifique se o estabelecimento de isolados resistentes na população ocorreu. Além disso, no estado norte-americano é comum a aplicação somente de piraclostrobina para o controle da PFC (Peres & Dewdney, 2016), não em mistura como nos pomares brasileiros, o que aumenta o risco da ocorrência de isolados resistentes nas propriedades.

As CE₅₀ médias para os isolados deste estudo são essenciais para que possíveis mudanças de sensibilidade de *Colletotrichum* spp. sejam verificadas em monitoramentos populacionais a serem realizados no futuro, sendo referidas como a sensibilidade *baseline* de isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* isolados de pomares brasileiros de citros. Caso haja diferença discrepante de CE₅₀ entre os isolados deste estudo e da coleção nova, análises moleculares dos genes *Cytb* e *Cyp51* podem ser feitas para evidenciar a ocorrência de mutações associadas à resistência a DMIs e Qols.

3.5. Conclusão

Os isolados do complexo *Colletotrichum acutatum* causadores da podridão floral dos citros utilizados neste estudo são sensíveis aos fungicidas tebuconazol e trifloxistrobina. As populações patogênicas coletadas entre 2013 e 2016 mantiveram o mesmo nível de sensibilidade a estes fungicidas e que a população *baseline*.

O controle da podridão floral dos citros através da pulverização preventiva dos fungicidas tebuconazol e trifloxistrobina permanecerá efetivo se adotadas medidas de manejo de resistência nos pomares brasileiros.

Referências

Agostini, J.P., Timmer, L.W. 1994. Population-dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. *Phytopathology* 84:420-425.

Agrios, G. N. Plant pathology. San Diego: Academic Press. 5 ed. 2005. 922 p.

Agrofit. 2016. Produtos registrados para *Colletotrichum acutatum* na cultura dos citros. Disponível em:

<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 1 de março de 2017.

Amiri, A., Heath, S.M., Peres, N.A. 2013. Phenotypic Characterization of Multifungicide Resistance in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry Fields in Florida. *Plant Disease* 97:393-401.

Avila-Adame, C., Olaya, G. and Köller, W. (2003) Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides. *Plant Disease* 87: 1426-1432

Barlett, D.W.; Clough, J.M.; Godwin, J.R.; Hall, A.A.; Hamer, M.; Parr-dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest management Sci.* 58: 649-662. In: Ma, Z.; Michailides, T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24:853-863.

Birla, K., Rivera-Varas, V., Secor, G.A., Khan, M.F.R., Bolton, M.D. 2012. Characterization of cytochrome b from European field isolates of *Cercospora beticola* with quinone outside inhibitor resistance. *European Journal of Plant Pathology* 134:475-488.

Bragança, C.A.D.; Damm, U.; Baroncelli, R.; Massola JR., N.S.; Crous, P.W. 2016. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. *Fungal Biology*. 120: 547-561.

Brent, K.J., Hollomon, D.W. 2007a. Fungicide resistance in Crop Pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph 1. 2nd Ed. Brussels, CropLife International, Brussels: 55.

Brent, K.J., Hollomon, D.W. 2007b. Fungicide resistance: the assessment of risk. Fungicide Resistance Action Committee. FRAC Monograph 2. 2nd Ed. Brussels, CropLife International: 52.

Castroagudín, V.L., Ceresini, P.C., Oliveira, S.C., Reges, J.T.A., Maciel, J.L.N., Bonato, A.L.V., Dorigan, A.F., McDonald, B.A. 2015. Resistance to QoI Fungicides Is Widespread in Brazilian Populations of the Wheat Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology* 105: 284-294.

Chen, F.P.; Fan.; Zhou, T.; Liu, X.L.; Liu, J.L.; Schnabel., G. 2012. Baseline Sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI Fungicide SYP-Z048 and Analysis of DMI-Resistant Mutants. *Plant Disease* 96:416-422.

Cools, H.J.; Fraaije, B.A. 2012. Chap. 5: Resistance to Azole Fungicides in *Mycosphaerella graminicola*. In: Thind, T.S. *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management*. CAB International.

Dekker, J. 1982. Countermeasures for avoiding fungicide resistance. In: Dekker, J.; Georgopoulos, G. *Fungicide Resistance in Crop Protection*. P. 177-186.

Diaz-Guerra, T. M., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., & Rodriguez-Tudela, J. L. 2003. A Point Mutation in the 14 α -Sterol Demethylase Gene *Cyp51A* Contributes to Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 1120–1124. <http://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1120-1124.2003>

Fao. 2012. Guidelines on Prevention and Management of Pesticide Resistance. Disponível em: https://www.eppo.int/PPPRODUCTS/resistance/FAO_RMG_Sept_12.pdf. Acesso em: 1 de abril de 2017.

Forcelini, B.B.; Seijo, T.E.; Amiri, A.; Peres, N.A. 2016. Resistance in Strawberry Isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to Quinone-Outside Inhibitor Fungicides. *Plant Disease* 100: 2050-2056

Förster, H., Kanetis, L., and Adaskaveg, J. E. 2004. Spiral gradient dilution, a rapid method for determining growth responses and 50% effective concentration values in fungus-fungicide interactions. *Phytopathology* 94:163-170.

FRAC. 2006. Mutations associated with QoI-resistance. Disponível em: <http://www.frac.info/docs/default-source/about-frac/mutations-associated-with-qoi-resistance.pdf>. Acesso em: 27 de março de 2017.

FRAC. n.d. FRAC CODE LIST 1:Fungicides sorted by FRAC Code. Disponível em: <http://ipm.ifas.ufl.edu/resources/success_stories/T&PGuide/pdfs/Appendices/Appendix6-FRAC.pdf>. Acesso em: 27 de março de 2017.

Frare, G.F., Couto, H.T.Z., Ciampi-Guillardi, M., Amorim, L. 2016. The causal agent of citrus postbloom fruit drop, *Colletotrichum acutatum*, can survive on weeds. Australasian Plant Pathol. (2016) 45: 339-346.

Frederick, Z.A., Villani, S.M., Cooley, D.R., Biggs, A.R., Raes, J.J., Cox, K.D. 2014. Prevalence and Stability of Qualitative QoI Resistance in Populations of *Venturia inaequalis* in the Northeastern United States. Plant Disease 98: 1122-1130

Fundecitrus. Lista pic - produção integrada de citros. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/GradeZdeZDefensivosZ23.12.16_PT.pdf>. Acesso em: 15 de março de 2017.

Gasparoto, M.C.G., Lourenço, S.A., Tanaka, F.A.O., Spósito, M.B., Marchini, L.C., Silva-Junior, G.J., Amorim, L. 2016. Honeybees can spread *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* among citrus plants. Plant Pathology doi: 10.1111/ppa.12625

Geraldello, C.S. Antidumping na OMC. In: Medidas antidumping e política doméstica: o caso da citricultura estadunidense [online]. São Paulo: Editora UNESP; São Paulo: Cultura Acadêmica, 2015, pp. 43-84. ISBN 978-85-7983-665-7. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

Gisi, U.; Sierotzki, H.; Cook, A.; McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. Pest Management Science 58:859-867.

Guerber, J.C.; Liu, B.; Correll, J.C. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. Mycologia. 95:872-895.

Heaney, S.P.; Hall, A.A.; Davis, S.A.; Olaya, G. 2000 Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives. Proceedings British Crop Protection Conference – Pests & Diseases 755-762. In: Brent, K.J., Hollomon, D.W. 2007a. Fungicide resistance in Crop Pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph 1. 2nd Ed. Brussels, CropLife International, Brussels: 55.

Jin, L.; Chen, Y.; Chen, C.; Wang, J.; Zhou, M. 2009. Activity of Azoxystrobin and SHAM to Four Phytopathogens. *Agricultural Sciences in China*. 8: 835-842.

Kim, T., Dixon, E.W., Vincelli, P., Farman, M.L. 2003. Field Resistance to Strobilurin (QoI) Fungicides in *Pyricularia grisea* Caused by Mutations in the Mitochondrial Cytochrome b Gene. *Phytopathology* 93:891-900.

Kim, J.O., Choi, K.Y., Han, J.H., Choi, I.Y., Lee, Y.H. and Kim, K.S. 2016. The complete mitochondrial genome sequence of the ascomycete plant pathogen *Colletotrichum acutatum*. *Mitochondrial DNA*, 27:4547-4548.

Köller, W., Wilcox, W.F., Barnard, J., Jones, A.L., Braun, P.G. 1997. Detection and Quantification of Resistance of *Venturia inaequalis* Populations to Sterol Demethylation Inhibitors. *Phytopathology* 87(2):184-190.

Lepesheva, G.I., Waterman, M.R. 2007. Sterol 14 α -Demethylase Cytochrome P450 (Cyp51), a P450 in All Biological Kingdoms. *Biochimica et biophysica acta* 1770.3: 467–477.

Lima, W.G.; Spósito, M.B.; Amorim, L.; Gonçalves, F.P.; Filho, P.A.M. 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*. 131:157-165.

Luo, C., Cox, K.D., Amiri, A., Schnabel, G. 2008. Occurrence and Detection of the DMI Resistance-Associated Genetic Element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. *Plant Disease* 92:1099-1103.

Ma, Z.; Michailides, T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24:853-863

Ma, Z., Proffer, T. J., Jacobs, J. L., & Sundin, G. W. 2006. Overexpression of the 14 α -Demethylase Target Gene (*CYP51*) Mediates Fungicide Resistance in *Blumeriella jaapii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2581–2585. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2581-2585.2006>

MacKenzie, S.J., Peres, N.A., Timmer, L.W. 2010. Colonization of citrus leaves and secondary conidiation response to citrus flower extracts by non-postbloom fruit drop strains of *Colletotrichum acutatum*. *Tropical Plant Pathology* 35:333-342.

Mair, W., Lopez-Ruiz, F., Stammler, G., Clark, W., Burnett, F., Hollomon, D., Ishii, H., Thind, T.S., Brown, J.K.M., Fraaije, B., Cools, H., Shaw, M., Fillinger, S., Walker, A., Mellado, E., Schnabel, G., Mehl, A., Oliver, R.P. 2016. Proposal for a unified nomenclature for target-site mutations associated with resistance to fungicides. *Pest Manag Sci* 72:1449-1459.

Mavroeidi, V.I., Shaw, M.W. 2006. Effects of fungicide dose and mixtures on selection for triazole resistance in *Mycosphaerella graminicola* under field conditions. *Plant Pathology* 55: 715-725.

McGrath, M.T. 2004. What are Fungicides. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01.

Mellado, E., Diaz-Guerra, T.B., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L. 2001. Identification of Two Different 14- α Sterol Demethylase-Related Genes (*Cyp51A* and *Cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 39:2431-2438.

Mills PR, Sreenivasaprasad S, Brown AE, 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters* 98: 137–43

Mondal, S.N.; Bhatia, A.; Shilts, T.; Timmer, L.W. 2005. Baseline Sensitivities of Fungal Pathogens of Fruit and Foliage of Citrus to Azoxystrobin, Pyraclostrobin, and Fenbuconazole. *Plant Disease* 89: 1186-1194

Nirenberg, H.I.; Feiler, U; Hagedorn, G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *Mycologia* 94: 307–320

Oliver, R.P., Hewitt, H.G. 2014. Fungicides in crop protection. Second Ed. Oxfordshire, UK. CAB International.

Pereira, W.V. 2013. Sobrevivência, colonização, detecção e monitoramento de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. doi:10.11606/T.11.2014.tde-21032014-162045. Recuperado em 2017-04-17, de www.teses.usp.br.

Peres, N.A., Dewdney, M.M. 2016. 2016 Florida Citrus Pest Management Guide: Ch.22 Postbloom Fruit Drop. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/CG/CG00700.pdf>>. Acesso em: 20 de março de 2017.

Rallos L.E.E.; Baudoin A.B. Co-Occurrence of Two Allelic Variants of *Cyp51* in *Erysiphe necator* and Their Correlation with Over-Expression for DMI Resistance. Cantu D, ed. PLoS ONE. 2016;11(2):e0148025. doi:10.1371/journal.pone.0148025.

Schmitz, H.K.; Medeiros, C.A.; Craig, I.R.; Stammler, G. 2014. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Management Science* 70: 378-388

Sierotzki, H., Frey, R., Wulschleger, J., Palermo, S., Karlin, S., Godwin, J. and Gisi, U. (2007), Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for Qol resistance. *Pest. Manag. Sci.*, 63: 225–233. doi:10.1002/ps.1330

Silva-Junior, G.J. 2011. Podridão Floral dos Citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. 2011.

Silva-Junior, G.J., Spósito, M.B., Marin, D.R., Amorim, L. 2014. Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus postbloom fruit drop. *Crop Protection* 59: 51-56.

Simmonds, J. H. 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing fruit rots in Queensland. *Queensl. J. Agric. Anim. Sci.* 22:437-459.

Soares-Colletti, A.R.; Alvares, C.A.; Sentelhas, P.C. 2016. An agro-climatic approach to determine citrus postbloom fruit drop risk in Southern Brazil. *Int J Biometeorol* 60:89-905.

Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A. E. and Mills, P. R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*, 45: 650–655.

Thind, T.S. 2012. Fungicide Resistance in Crop Protection Risk and Management. Wallingford, CABI. 284 p.

Timmer, L.W. 1993. Postbloom fruit drop of citrus – symptoms, disease cycle and control. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 106:102-105.

Timmer, L.W., Agostini, J.P., Zitko, S.E., Zulfikar, M. 1994. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. *Plant Disease* 78: 329-334.

Timmer, L.W.; Zitko, S.E. 1993. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. *Plant Disease* 77:501-504.

Timmer, L.W.; Zitko, S.E. 1996. Evaluation of a model for prediction of postbloom fruit drop of citrus. *Plant Disease* 80:380-383.

Vincelli, P. 2002. QoI (Strobilurin) Fungicides: Benefits and Risks. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0809-02.

Wang, F., Lin, Y., Yin, W.-X., Peng, Y.-L., Schnabel, G., Huang, J.-B., & Luo, C.-X. 2015. The Y137H mutation of *VvCYP51* gene confers the reduced sensitivity to tebuconazole in *Villosiclava virens*. Scientific Reports, 5, 17575. <http://doi.org/10.1038/srep17575>

Wyand, R.A., Brown, J.K.M. 2005. Sequence variation in the *Cyp51* gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. Fungal Genetics and Biology 42:726-735.

Wyenandt, A. 2015. Grower's Guide: Understanding DMI or SBI fungicides. Disponível em: <<http://plant-pest-advisory.rutgers.edu/growers-guide-to-understanding-the-dmi-or-sbi-fungicides-frac-code-3-2015/>>. Acesso em: 19 de abril de 2017.

Xiao, K.; Engstrom, G.; Rajagukguk, S.; Yu, C.A.; Yy, L.; Durham, B.; Millet, F. 2003. Effect of famoxadone on photoinduced electron transfer between the Iron-Sulfur center and cytochrome c1 in the cytochrome bc1 complex. The journal of Biological Chemistry, 278:11419-11426.

Xu, X.F.; Lin, T.; Yuan, S.K.; Dai, D.J.; Shi, H.J. 2014. Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. Australian Plant Pathology. 43:605-613.

Zulfiqar, M., Bransky, R.H., Timmer, L.W. 1996. Infection of flower and vegetative tissue of citrus by *C. Acutatum* and *C. gloeosporioides*. Mycologia 88:121-128.

Anexos

Anexo I – Gráficos da inibição de germinação de conídios em doses crescentes de trifloxistrobina.

Figura 8: inibição da germinação de esporos dos isolados de *C. acutatum* sob diferentes concentrações do fungicida trifloxistrobina em dois experimentos (A e B) com os isolados RP 01 (1), RP 04 (2), RP 05 (3), RP 08 (4).

Figura 9: inibição da germinação de esporos dos isolados de *C. acutatum* sob diferentes concentrações do fungicida trifloxistrobina em dois experimentos (A e B) com os isolados RP 10 (5), RP 06 (6), RP 11 (7), RP 13 (8).

Figura 10: inibição da germinação de esporos dos isolados de *C. acutatum* (9 a 11) e *C. gloeosporioides* (12-A e 12-B) sob diferentes concentrações do fungicida trifloxistrobina em dois experimentos (A e B) com os isolados RP 16 (9), RP 18 (10), RP 19 (11), RP 17 (12).

Figura 11: inibição da germinação de esporos dos isolados de *C. acutatum* (14 a 16) e *C. gloeosporioides* (13-A e 13-B) sob diferentes concentrações do fungicida trifloxistrobina em dois experimentos (A e B) com os isolados RP 2 (13), SLGMGG7 (14), SLGMGG6 (15) e CIABTU15 (16).

Figura 8: inibição da germinação de esporos de isolados de *C. acutatum* sob diferentes concentrações do fungicida trifloxistrobina em dois experimentos (A e B) com os isolados FZRPRD6 (17), 15G20 (18) e 16T2 (19)