

UEDER PEDRO LOPES

DOENÇAS DO MORANGUEIRO: ETIOLOGIA, EPIDEMIOLOGIA E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

L864d
2014 Lopes, Ueder Pedro, 1986-
Doenças do morangueiro : etiologia, epidemiologia e
sensibilidade a fungicidas / Ueder Pedro Lopes. – Viçosa, MG,
2014.
xi, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Laércio Zambolim.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Morango - Doenças e pragas - Controle biológico.
2. Morango - Cultivo. 3. Mofo (Botânica). 4. Fungicidas.
5. Plantas - Efeito dos fungicidas. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 634.75

UEDER PEDRO LOPES

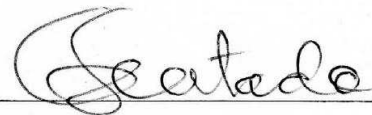
DOENÇAS DO MORANGUEIRO: ETIOLOGIA, EPIDEMIOLOGIA E
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

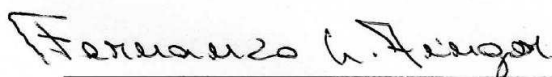
Aprovada em 31/01/2014



Pesq.: Hélcio Costa



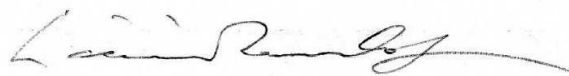
Prof.: Gleiber Quintão Furtado



Prof.: Fernando Luiz Finger



Prof.: Luis Cláudio Vieira Cunha



Prof.: Laércio Zambolim

(Orientador)

Aos meus pais Pedro e Rita

Aos meus irmãos, Uilson, Uilian, Uilton e Ueliton

À minha esposa Rejane

dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me conduzido por este caminho e me dado força nos momentos de dificuldade fazendo com que eu nunca desistisse.

À minha esposa, Rejane Freitas Lopes pela paciência, amizade, carinho e incentivo que me deram forças para finalizar mais esta etapa.

Aos meus pais, Pedro e Rita, e meus irmãos, Uilson, Uilian, Uilton e Ueliton que não mediram esforços para me auxiliar e sempre me apoiaram nesta jornada, desde o início de meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Laércio Zambolim pela orientação, ensinamentos, amizade, oportunidades e pela confiança em mim depositada ao longo dos nossos nove anos de convivência.

Ao Dr. Hélcio Costa pela orientação, ensinamentos, amizade e auxílio na obtenção de parte dos isolados.

Aos professores Fernando Luiz Finger, Gleiber Quintão Furtado e Luis Cláudio Vieira da Cunha pelas correções e participação na banca de defesa.

Aos produtores rurais onde realizamos as diversas visitas.

Ao prof. Olinto Liparini Pereira, pela amizade, ensinamentos e orientação.

Ao Dr. Danilo Batista Pinho pelo auxílio na identificação dos isolados de *Neofusicoccum* e correções do primeiro capítulo.

À minha esposa Rejane Freitas Lopes pelo auxílio na identificação dos isolados e pelas diversas sugestões e correções nos capítulos.

Aos estagiários Franklin Machado, Aline Vieira, Rodrigo Borba, Nayara e Nicolas pelo auxílio na execução dos trabalhos no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Proteção de Plantas, Pedro Nery, Henrique Duarte, Alexandre Capucho, Alessandro Nicoli, Uiraci Freitas, Lucas Fagundes, Sérgio Milagres e José Cláudio, pela amizade e convívio agradável durante este período.

A todos

Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

Ueder Pedro Lopes, filho Pedro Antônio Lopes e Rita Gorete do Nascimento Lopes, nasceu na cidade de São Miguel do Anta- MG, em 01 de outubro de 1986.

No ano de 2004 iniciou o curso de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo no ano de 2009.

No período de 2007 a 2008, foi bolsista de iniciação científica no Departamento Fitopatologia da UFV, onde desenvolveu atividades de pesquisa sobre manejo integrado de doenças do cafeeiro.

Em Março de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia pela UFV, submetendo-se à defesa em Fevereiro de 2011.

Em Março de 2011, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia pela UFV, submetendo-se à defesa em Janeiro de 2014.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3

CAPÍTULO I

Postharvest rot and mummification of strawberry fruits caused by *Neofusicoccum parvum* and *N. kwambonambiense* in Brazil

1 INTRODUCTION	5
2 REFERENCES	11

CAPÍTULO II

Análise temporal e espacial do vermelhão do morangueiro

1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Caracterização das áreas	22
2.2 Análise da dinâmica da doença.....	22
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

CAPÍTULO III

Prevalência de espécies de *Botrytis* em campos de produção de morango no Brasil

1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Obtenção dos isolados.....	35
2.2 Isolamento e armazenamento dos isolados	36

2.3 Extração do DNA e amplificação por PCR	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

CAPÍTULO IV

Levantamento do uso de fungicidas no controle do mofo cinzento do morangueiro

1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

CAPÍTULO V

Sensibilidade de isolados de *Botrytis cinerea* aos fungicidas dicarboxamidas e benzimidazóis

1 INTRODUÇÃO	54
2 MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 Obtenção dos isolados.....	56
2.2 Isolamento e armazenamento dos isolados	56
2.3 Avaliação da sensibilidade dos isolados aos fungicidas	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CONCLUSÕES GERAIS.....	67

RESUMO

LOPES, Ueder Pedro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2014. **Doenças do Morangueiro: Etiologia, epidemiologia e sensibilidade a fungicidas**. Orientador: Laércio Zambolim. Co-Orientador: Olinto Liparini Pereira.

A cultura do morangueiro, *Fragaria x ananassa* Duch, tem enfrentado diversos problemas, dentre os quais destacam-se os causados por patógenos. Além de doenças amplamente conhecidas, como o mofo cinzento, novas doenças vêm causando sérios danos à cultura. Visando estudar os diversos problemas da cultura do morangueiro, este trabalho teve por objetivos: i) identificar o agente causal de uma podridão pós-colheita em frutos de morango; ii) estudar a dinâmica temporal e espacial do vermelhão do morangueiro, cuja etiologia é ainda desconhecida; iii) determinar as espécies de *Botrytis* que causam mofo cinzento em morangueiro no Brasil; iv) realizar um levantamento da situação atual do uso de fungicidas para controle do mofo cinzento do morangueiro; v) estudar a sensibilidade de isolados de *B. cinerea* aos fungicidas dicarboxamidas e benzimidazóis. A fim de identificar o agente causal da podridão pós-colheita de frutos de morango, isolados obtidos a partir de frutos sintomáticos foram analisados por meio de análises morfológicas e filogenéticas. Após a confirmação da patogenicidade dos isolados, foi feita a identificação das espécies como *Neofusicoccum kwambonambiense* e *N. parvum*. Este é o primeiro relato da ocorrência de *Neofusicoccum kwambonambiense* no Brasil e o primeiro relato de *Neofusicoccum* spp. causando podridão em morango. O estudo do padrão de distribuição temporal e espacial do vermelhão do morangueiro foi realizado em quatro áreas de cultivo comercial. Com os dados de incidência da doença foram construídas curvas de progresso e mapas de dispersão, além da análise de agregação de plantas pelo teste de ordinário runs. Os

resultados mostraram que a doença apresenta comportamento semelhante a uma doença biótica com padrão de distribuição semelhante ao de doenças que se dispersam na linha de plantio. Para atingir os demais objetivos, foram obtidos isolados a partir de plantas com sintomas do mofo cinzento, em diversas propriedades de diferentes cidades nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, totalizando 200 isolados. Inicialmente, foi realizado um estudo para verificar a ocorrência de outra espécie de *Botrytis* nos campos de cultivo de morango no Brasil. Para isso, foi feita a extração de DNA de todos os isolados, seguindo-se à reação de PCR com *primers* específicos para as espécies *B. cinerea* e *B. caroliniana*. Apesar da variação morfológica observada entre os isolados, todos foram identificados como *B. cinerea*. O levantamento sobre as práticas utilizadas para controle do mofo cinzento do morangueiro foi realizado diretamente com os produtores, que foram questionados quanto aos produtos utilizados para o controle da doença, eficiência de controle dos produtos e uso da prática de retirada de material doente. Foi possível observar diversos problemas, destacando-se o reduzido uso de medidas de controle cultural, o uso de produtos não recomendados para a cultura e o baixo nível de conhecimento dos produtores. Por fim, foi realizada a análise de sensibilidade dos isolados aos principais fungicidas utilizados na cultura (iprodiona, procimidona e tiofanato-metílico). Para isso, foi utilizado um total de 100 isolados, os quais foram crescidos em meio de cultura contendo diferentes doses dos fungicidas. Os resultados mostraram que 89% dos isolados foram insensíveis ao fungicida tiofanato-metílico, 36% ao iprodiona e 54% ao procimidona. Considerando o número restrito de fungicidas registrados para o controle do mofo cinzento e a baixa sensibilidade dos isolados de *B. cinerea* a estes produtos, torna-se difícil o manejo dessa importante doença do morangueiro.

ABSTRACT

LOPES, Ueder Pedro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2014. **Strawberry Disease: Etiology, epidemiology and fungicide sensibility**. Adviser: Laércio Zambolim. Co-adviser: Olinto Liparini Pereira

The culture of strawberry , *Fragaria x ananassa* Duch, has faced several problems, among which we highlight those caused by pathogens. In addition to widely known diseases such as gray mold, new diseases have caused serious damage to the crop. In order to study the various problems of strawberry culture, this study aimed to: i) identify the causal agent of a postharvest fruit rot in strawberry , ii) to study the temporal and spatial dynamics of the redness in strawberry, whose etiology is still unknown; iii) determine the species of *Botrytis* that cause gray mold in strawberry in Brazil iv) conduct a survey of the current situation of fungicides for control of gray mold on strawberry v) to study the sensitivity of isolates of *B. cinerea* to dicarboxamide and benzimidazole fungicides. In order to identify the causal agent of post harvest fruit rot of strawberry, isolates from symptomatic fruits were analyzed by morphologic and phylogenetic analyzes. After confirming the pathogenicity of the isolates, species identification as *Neofusicoccum kwambonambiense* and *N. parvum* was taken. This is the first report of the occurrence of *Neofusicoccum kwambonambiense* in Brazil and the first report of *Neofusicoccum* spp. causing rot in strawberry. By studying the pattern of temporal and spatial distribution of the redness of strawberry was conducted in four areas of commercial cultivation. With the data on incidence of disease progress curves and dispersion maps were constructed, and analysis of aggregation of plants by ordinary runs test. The results showed that the disease has a similar disease biotic distribution

pattern similar to diseases which are dispersed in the row. To achieve other goals, isolates were obtained from plants with symptoms of gray mold on various properties of different cities in the states of Espírito Santo, Minas Gerais and São Paulo, totaling 200 isolates. Initially, a study was conducted to verify the occurrence of other species of *Botrytis* in the fields of strawberry cultivation in Brazil. For this, the extraction of DNA from all strains was performed, followed by PCR with the specific species and *B. cinerea* and *B. caroliniana* primers. Despite the morphological variation observed among isolates, all were identified as *B. cinerea*. The survey on the practices used to control gray mold on strawberry was performed directly with the producers, who were asked about the products used for the control of disease, efficiency of these products and use of the practice of removing diseased material. It was possible to observe many problems, especially reduced use of cultural control measures, the use of products not recommended for culture and the low level of knowledge of the farmers. Finally, the sensitivity analysis of the isolated main culture fungicides (iprodione, procymidone and thiophanate-methyl) was carried. Thus, a total of 100 isolates were grown in culture medium containing different doses of the fungicide was used. The results showed that 89% of isolates were insensitive to thiophanate-methyl fungicide, 36% to and 54% to procymidone. Considering the limited number of fungicides registered for the control of gray mold and the low sensitivity of isolates of *B. cinerea* to these products, it becomes difficult to manage this important disease of strawberry.

DOENÇAS DO MORANGUEIRO: ETIOLOGIA, EPIDEMIOLOGIA E SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS

1 INTRODUÇÃO GERAL

O morangueiro, *Fragaria x ananassa* Duch, é uma planta herbácea pertencente à família Rosaceae, cultivada em diferentes regiões no mundo. Parte das cultivares plantadas atualmente são híbridos oriundos de cruzamentos naturais das espécies *Fragaria virginiana* e *Fragaria vesca* (Stauct, 1988).

A maior produção mundial de morango ocorre nos Estados Unidos, com cerca de 1.312.960 toneladas em 2011 (Fao, 2013). Na América do Sul, os maiores produtores são Brasil, Chile e Argentina (Antunes & Peres, 2013), sendo que no ano de 2011 foram produzidas cerca de 3.016 toneladas apenas no Brasil. A produção brasileira está concentrada nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo, embora outros estados como Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo, Goiás e Distrito Federal também cultivem o morango.

No Brasil, a cultura do morangueiro tem enfrentado diversos problemas, dentre os quais destacam-se os causados por patógenos. Além de doenças amplamente conhecidas, como o mofo cinzento, novas doenças vêm sendo descritas na literatura (Lopes et al., 2010, Lopes, 2011), algumas ainda com etiologia desconhecida. O conhecimento dos patógenos que ocorrem na cultura é extremamente importante, pois todas as estratégias de manejo dependem do conhecimento da etiologia da doença.

O mofo cinzento é uma doença de ocorrência generalizada em todas as regiões onde se cultiva o morango, sendo que no Brasil a doença é atribuída apenas à espécie *Botrytis cinerea* (Costa et al., 2011, Lopes, 2011). No entanto, isolados obtidos de

plantas com sintomas do mofo cinzento apresentam grande variabilidade morfológica, sugerindo se tratar de outra espécie. Nos EUA, foi verificada a presença da espécie *B. caroliniana* causando sintomas do mofo cinzento no morangueiro (Fernández-Ortuño et al., 2012). Portanto, a ocorrência desta espécie em campos de cultivo no Brasil poderia explicar parte da variabilidade observada entre os isolados obtidos de áreas de cultivo comercial.

O principal método de controle do mofo cinzento no Brasil é o controle químico. No entanto, diversos problemas têm sido observados, principalmente a ineficiência de controle de muitos fungicidas. Por isso, é extremamente importante realizar o levantamento de informações acerca do controle desta doença em condições de cultivo comercial, bem como estudar o comportamento da população de *B. cinerea* frente aos fungicidas mais utilizados na cultura. Com estas informações, será possível identificar possíveis problemas que vêm ocorrendo em condições de campo e, assim, otimizar as estratégias de manejo da doença.

Neste sentido, a fim de estudar os diversos problemas da cultura do morangueiro, levantados anteriormente, foi realizado um trabalho com os seguintes objetivos: i) identificar a etiologia e relatar a ocorrência de uma podridão pós-colheita em frutos de morango no Brasil; ii) estudar a dinâmica temporal e espacial do vermelhão do morangueiro cuja etiologia é ainda desconhecida; iii) verificar a possível ocorrência de diferentes espécies de *Botrytis* em condições brasileiras; iv) realizar um levantamento da situação atual do uso de fungicidas para controle do mofo cinzento do morangueiro; v) estudar a sensibilidade de isolados de *B. cinerea* aos fungicidas dicarboxamidas e benzimidazóis.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antunes LEC, Peres NA, 2013. Strawberry Production in Brazil and South America. *International Journal of Fruit Science* **13**, 156-61.

Costa H, Ventura JA, Lopes UP, 2011. Manejo integrado de doenças do morangueiro. In. *Horticultura Brasileira*. Viçosa, S5856-77. (29.)

Fao. <http://www.fao.org/home/en/>. Acesso em Dezembro de 2013

Fernández-Ortuño D, Li X, Wang F, Schnabel G, 2012. First Report of Gray Mold of Strawberry Caused by *Botrytis caroliniana* in North Carolina. *Plant disease* **96**, 914.

Lopes UP, Zambolim L, Lopes UN, Pereira OL, Costa H, 2010. First report of *Pilidium concavum* causing tan-brown rot in strawberry fruits in Brazil. *Plant Pathology* **59**, 1171-2.

Lopes UP, 2011. *Podridões em pós-colheita de morango: Etiologia e efeito de produtos alternativos*: Universidade Federal de Viçosa, Mestrado.

Stauct G. The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. *Proceedings of the International Strawberry Symposium* 265, 1988, 23-34.

CAPÍTULO I

Aceito na Revista Tropical Plant Pathology

Postharvest rot and mummification of strawberry fruits caused by

Neofusicoccum parvum **and** *N. kwambonambiense* **in Brazil**

ABSTRACT

In addition to the rots that are commonly found on strawberries, a new disease was found in 7% of stored fruits during a survey of strawberry diseases at the postharvest stage. Koch's postulates were satisfied, and the fungi were identified as *Neofusicoccum kwambonambiense* and *N. parvum* based on morphology and phylogenetic analysis of the internal transcribed spacers, β -tubulin, RNA polymerase subunit II and transcription elongation factor 1- α regions. This is the first report of *Neofusicoccum kwambonambiense* in Brazil and the first report of *Neofusicoccum* spp. causing mummification and postharvest rot of strawberry.

Key words: Botryosphaerales, Dothideomycetes, *Fragaria x ananassa*, Postharvest pathology, Stored fruit, Tropical fungi

1 INTRODUCTION

A major problem in the strawberry production chain is the occurrence of fruit rot caused by fungi, especially at the postharvest stage. In Brazil, the main fungal species that cause postharvest rot in strawberry are *Botrytis cinerea* Pers., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Pilidium concavum* (Desm.) Höhn., *Geotrichum candidum* Link. and *Colletotrichum spp.* Others fungi associated to rotting of strawberry fruit at postharvest stage are *Rhizoctonia solani* Kühn, *Phytophthora spp.*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Pestalotia longisetula* Guba., *Gnomonia comari* Karst. and *Alternaria spp.* (Costa et al., 2003; Tanaka et al., 2005; Lopes, 2011).

The occurrence of diseases in strawberries varies according to the region, climate conditions and crop management (Maas, 1998). Moreover, when the symptoms are similar to those caused by other pathogens, diagnostic errors are common. In such cases, the damage caused by certain pathogens may be ignored or overestimated depending on the situation (Lopes et al., 2010; Lopes, 2011). Therefore, the knowledge regarding the epidemiology and management of the disease depends of its correct etiologic identification such that postharvest damage to strawberry fruits can be reduced.

From March 2009 to February 2010, a survey of diseases in strawberry fruits was performed in the mountainous region of the state of Espírito Santo, Brazil. Fruits from different commercial plantations were collected and stored at 25 °C and 100% relative humidity for seven days. In addition to the rots that are commonly found on strawberries in postharvest, a new fruit rot was verified in 7% of 3.500 stored fruits. Because the symptoms of this postharvest rot have not been previously reported in

strawberries, the aim of this research was to determine the etiology of this disease in *Fragaria x ananassa* based on morphological and molecular approaches.

The initial symptoms of rot were observed from the first to the fourth day of storage. Initially, the grayish-white mycelium grew, covering the entire fruit, which gradually became gray to black (Figure 1A and B). The fruits became mummified one week after the initial observation. The formation of droplets due to leakage of cellular liquid was commonly observed on the surface of affected fruits (Figure 1C). However, sporulation was not observed on the surface of infected fruits.

The fungi were isolated on potato dextrose agar (PDA) by removing the tip of the hyphae from infected fruits. Three isolates were transferred to 2% water agar medium containing sterilized corn straw to induce sporulation. Single spore isolates were obtained from the samples, and derived cultures were deposited at the Coleção de culturas de fungos fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brazil (codes CMM 1842, CMM 1845 and CMM 1846). When the fungi were grown at 25 °C in petri dishes (9 mm in diameter) containing PDA medium, colonies of the CMM1842 increased in only three days, whereas the colonies of the CMM1845 and CMM 1846 grew in entire petri dish in four days. Although CMM 1842 exhibited a higher growth rate, both isolates exhibited maximum growth between 25 and 30 °C.

Fungal structures were scraped, mounted in drops of lactophenol on microscope slides and examined under a light microscope. Biometric data were based on 30 measurements of various structures. The hyaline conidia were ellipsoidal to fusiform and aseptate with thin, smooth walls, measuring $7.5\text{-}20 \times 2.5\text{-}5 \mu\text{m}$. These morphological characteristics indicated that the pathogen belongs to the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex (Pavlic et al., 2009a, 2009b). However, the species of this

complex show conidial dimensions (length and width) that overlap among species, which cannot be distinguished based only on morphological characteristics (Pavlic et al., 2009b). Thus, a molecular characterization of the isolates was performed based on a combined analysis of the following sequences: internal transcribed spacer (ITS) regions 1 and 2 (including the 5.8S rRNA gene and 28S rDNA), β -tubulin, transcription elongation factor 1- α (TEF1- α) and RNA polymerase subunit II (RPB2) (Pavlic et al., 2009b)

To obtain representative fungal DNA, a single spore-derived culture was grown on PDA at 25 °C for one week. The genomic material was extracted from approximately 40 mg of fungal tissue using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega corporation, WI, U.S.A.) following the protocol described by Pinho et al. (2012).

The target sequences of the ITS region, 28S rDNA, β -tubulin, TEF1- α and RPB2 were amplified using the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') for ITS (White et al., 1990), LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') and LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') for the partial 28S rDNA (Vilgalys & Hester, 1990), T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') and Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') for the partial β -tubulin (Glass & Donaldson, 1995; O'Donnell & Cigelnik, 1997), EF1F (5'-TGCGGTGGTATCGACAAGCGT-3') and EF2R (5'-AGCATGTTGTCCCGTTGAAG-3') for the partial TEF1- α (Jacobs et al., 2004) and 5F2 (5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') and 7cR (5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3') for the partial RPB2 (Sung et al., 2007; Liu et al., 1999) following the protocols of Pinho et al. (2013) and Sung et al. (2007).

Amplification of ITS, β -tubulin, TEF1- α and RPB2 produced sequences of approximately 550, 630, 680 and 860 bp, respectively. The nucleotide sequences were edited with BioEdit software (Hall, 2012), and the new sequences were deposited in GenBank. ITS, TEF1- α , β -tubulin and RPB2 sequences from additional species were retrieved from GenBank (Table 1).

Consensus regions were compared with the GenBank database using the MegaBLAST program. The closest hit sequences were aligned using the multiple sequence alignment program MUSCLE® (Edgar, 2004) and built in MEGA v.5 software (Tamura et al., 2011). All of the ambiguously aligned regions within the dataset were excluded from the analyses. Gaps (insertions/deletions) were treated as missing data. The resulting alignment was deposited in TreeBASE (<http://www.treebase.org/>) under accession number S13850. The manually adjusted alignment contained 28 strains and, of the 1781 characters used in the phylogenetic analysis, 113 were parsimony-informative, 125 were variable and 1655 were conserved. Although the 28S rDNA sequences were not used in the phylogenetic analyses, they were deposited in GenBank (accession nos. KC507815 and KC507816).

Bayesian inference (BI) concatenated analyses employing a Markov Chain Monte Carlo method were performed with all sequences, first with each gene/locus separately and later with the concatenated sequences (ITS, TEF1- α , β -tubulin and RPB2). Before launching the BI, the best nucleotide substitution models were determined for each gene with MrMODELTEST 2.3 (Posada & Buckley, 2004). Once the likelihood scores were calculated, the models were selected according to the Akaike Information Criterion (AIC). The HKY+I model of evolution was used for ITS and TEF1- α , whereas GTR+I was used for RPB2 and β -tubulin. The phylogenetic analysis of the concatenated alignment was performed on the CIPRES web portal (Miller et al., 2010) using

MrBayes v.3.1.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). The remainder of the phylogenetic analysis was conducted as described by Pinho et al. (2012).

The BI analysis showed that the CMM 1842 isolate belongs to *N. kwambonambiense*, whereas CMM 1845 and CMM 1846 belong to *N. parvum* (Figure 2). *Neofusicoccum parvum* infects a broad range of hosts in a wide range of botanical families (Pavlic et al., 2009a, 2009b; Sakalidis et al., 2011; Farr & Rossman 2013), and in Brazil, it was recently reported as a pathogen in mango (Costa et al., 2010; Marques et al., 2013). *Neofusicoccum kwambonambiense* has been described in *Corymbia torelliana*, *Eucalyptus dunnii* and *Syzygium cordatum* (Pavlic et al., 2009a, 2009b; Sakalidis et al., 2011; Farr & Rossman, 2013) but has not yet been reported in Brazil (Mendes & Urben, 2013).

Fungi of the *Neofusicoccum* genus have not been reported to infect strawberry. Only the *Fusicoccum*-like anamorphic fungus *Botryosphaeria obtusa* (Schwein.) Shoemaker (teleomorph: *Botryosphaeria*-like) is known to cause fruit blotch in strawberry (Gubler & Converse, 1993); however, the fungus found in this research is morphologically distinct from *B. obtusa* (Shoemaker, 1964). In addition, a MegaBLAST search of the nucleotide sequence database (GenBank) using the ITS sequence show that our isolates of strawberries have only 87% identity with *B. obtusa* and belong to *Neofusicoccum*, a genus recently separated from *Botryosphaeria* (Crous et al., 2006).

To verify the pathogenicity of the fungus, 6-mm-diameter plugs of the isolates CMM 1842, CMM 1845 and CMM 1846 (single spore-derived cultures) from three-day-old cultures grown on PDA were inoculated under the intact surface of sixty fruits (twenty for each isolate) of strawberry fruits of the cultivar 'Camarosa', which is widely cultivated in Brazil. An agar plug was deposited in twenty control fruits. The fruits were maintained at 25 °C in plastic trays with individual compartments. Inoculated fruits

showed symptoms that were similar to those initially observed, i.e., mycelial growth was observed on the fruit surface at day one, and mummified fruits were observed at seven days after inoculation (Figure 1D) in all evaluated fruits. The control fruits showed no symptoms. *Neofusicoccum* spp. was successfully reisolated from the symptomatic fruits.

To our knowledge, this is the first report of *N. kwambonambiense* in Brazil and the first report of *Neofusicoccum* spp. causing postharvest rot and mummification of strawberries. The presence of both species represents new threats to strawberries crop in tropical areas where the climate favors their development. Therefore, control strategies should be investigated, especially for *N. parvum*, which causes serious damage to others important crops (Pavlic et al., 2009a, 2009b; Sakalidis et al., 2011; Farr & Rossman, 2013).

Acknowledgements

The authors wish to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support of the work.

2 REFERENCES

Cai L, Udayanga D, Manamgoda DS, Maharachchikumbura SSN, McKenzie EHC, Guo LD, Liu XZ, Bahkali A, Hyde KD (2011) The need to carry out re-inventory of plant pathogenic fungi. *Tropical Plant Pathology* 36: 205-213.

Costa VSO, Michereff SJ, Martins RB, Gava CAT, Mizubuti ESG, Camara MPS (2010) Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *European Journal Plant Pathology* 127: 509-519.

Costa H, Zambolim L, Ventura JA (2003) Manejo integrado das doenças do morangueiro. In: Zambolim, L (Ed). *Manejo integrado de pragas e doenças: fruteiras tropicais*. Viçosa. pp.131-164

Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Phillips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55: 235-253.

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.

Farr DF, Rossman AY (2013) *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Available at <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Accessed 5 May 2013.

Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.

Gubler WD, Converse RH (1993) Diseases of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Available at <http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Strawberry.aspx> Accessed 23 May 2013.

Hall T (2012) BioEdit v7.0.9: Biological sequence alignment editor for Win95/98/2K/XP/7. Available at <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> Accessed 15 July 2012.

Jacobs K, Bergdahl DR, Wingfield MJ, Halik S, Seifert KA, Bright DE, Wingfield BD (2004) *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research* 108: 411-418.

Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799-1808.

Lopes UP (2011) Podridões em pós-colheita de morango: Etiologia e efeito de produtos alternativos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, Brazil.

Lopes UP, Zambolim, Lopes UN, Pereira OL, Costa H (2010) First report of *Pilidium concavum* causing tan-brown rot in strawberry fruits in Brazil. *Plant Pathology* 59:1171–1172.

Maas JL (1998) Compendium of strawberry diseases, American Phytopathological Society. APS Press.

Marques MW, Lima NB, Morais Jr MA, Michereff SJ, Phillips AJL & Marcos, Câmara PS (2013) *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and

Pseudofusicoccum species associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61:195–208.

Mendes MAS, Urban AF (2013) Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Available at: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp> Accessed 5 May 2013.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010). "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans. pp. 1–8.

O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103-116.

Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ (2009a) Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: A case study on the *Neofusicoccum parvum/N. ribis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 259-268.

Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ (2009b) Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum/N. ribis* complex. *Mycologia* 101: 636-647.

Pinho DB, Dutra DC, Pereira OL (2013) Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 38:152-157.

- Pinho DB, Firmino AL, Pereira OL, Ferreira Junior WG (2012) An efficient protocol for DNA extraction from *Meliolales* and the description of *Meliola centellae* sp. nov. *Mycotaxon* 122: 333-345.
- Posada D, Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53:793-808.
- Ronquist F, Heulsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Sakalidis ML, Hardy GESJ, Burgess T (2011) Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum*–*Neofusicoccum ribis* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 333-344.
- Shoemaker RA (1964) Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany* 42:1297-1301.
- Sung GH, Sung JM, Hywel Jones NL, Spatafora JW (2007) A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1204-1223.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Tanaka MAS, Betti JA, Kimati H (2005) Doenças do morangueiro. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) *Manual de*

fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres. pp.489-499.

Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4239-4246.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (Eds.) *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, California, USA. Academic Press. pp. 315-322.

Table 1. GenBank accession numbers of *Neofusicoccum* spp. DNA sequences used in the phylogenetic analysis.

Species	Isolate	ITS*	BT**	EF***	RPB2****
<i>N. parvum</i>	CMM1846	KC507812	KC507806	KC507809	KC507803
<i>N.kwambonambiense</i>	CMM1842	KC507813	KC507807	KC507810	KC507804
<i>N. parvum</i>	CMM1845	KC507814	KC507808	KC507811	KC507805
<i>N. parvum</i>	CMW9071	AY236938	AY236909	AY236880	EU339571
<i>N. parvum</i>	MUCC676	EU339545	EU339482	EU339519	EU339568
<i>N. parvum</i>	CMW9080	AY236942	AY236916	AY236887	EU339572
<i>N. parvum</i>	MUCC211	EU301017	EU339480	EU339517	EU339566
<i>N. parvum</i>	MUCC673	EU339553	EU339483	EU339520	EU339570
<i>N.kwambonambiense</i>	MUCC210	EU301016	EU339478	EU339515	EU339564
<i>N.kwambonambiense</i>	MUCC157	EU339522	EU339479	EU339516	EU339522
<i>N.kwambonambiense</i>	CMW14123	EU821924	EU821864	EU821894	EU821954
<i>N. cordaticola</i>	CMW14124	EU821925	EU821865	EU821895	EU821955
<i>N. cordaticola</i>	CMW14056	EU821903	EU821843	EU821873	EU821933
<i>N. cordaticola</i>	CMW14054	EU821906	EU821846	EU821876	EU821936
<i>N. batangarum</i>	CMW28320	FJ900608	FJ900635	FJ900654	FJ900616
<i>N. batangarum</i>	CMW28637	FJ900609	FJ900636	FJ900655	FJ900617
<i>N. umdonicola</i>	CMW14079	EU821915	EU821855	EU821885	EU821945
<i>N. umdonicola</i>	CMW14127	EU821926	EU821866	EU821896	EU821956
<i>N. umdonicola</i>	CMW14096	EU821913	EU821853	EU821883	EU821943
<i>N. ribis</i>	CMW7772	AY236925	AY26906	AY236877	EU339554
<i>N. ribis</i>	CMW7773	AY236936	AY236907	AY236878	EU339555
<i>N. occulatum</i>	MUCC232	EU301031	EU339473	EU339510	EU339559
<i>N. occulatum</i>	MUCC270	EU339529	EU339471	EU339508	EU339557
<i>N. occulatum</i>	MUCC296	EU301034	EU339475	EU339512	EU339561
<i>N. karanda</i>	MUCC247	EU301028	EU339476	EU339513	EU339562
<i>N. karanda</i>	MUCC125	EU339525	EU339477	EU339514	EU339563
<i>N. australe</i>	CMW6837	AY339262	AY339254	AY339270	EU339573
<i>N. australe</i>	CMW9072	AY339260	AY339252	AY339268	

*Internal transcribed spacers; ** β -tubulin; ***Transcription elongation factor 1- α regions; **** RNA polymerase subunit II.

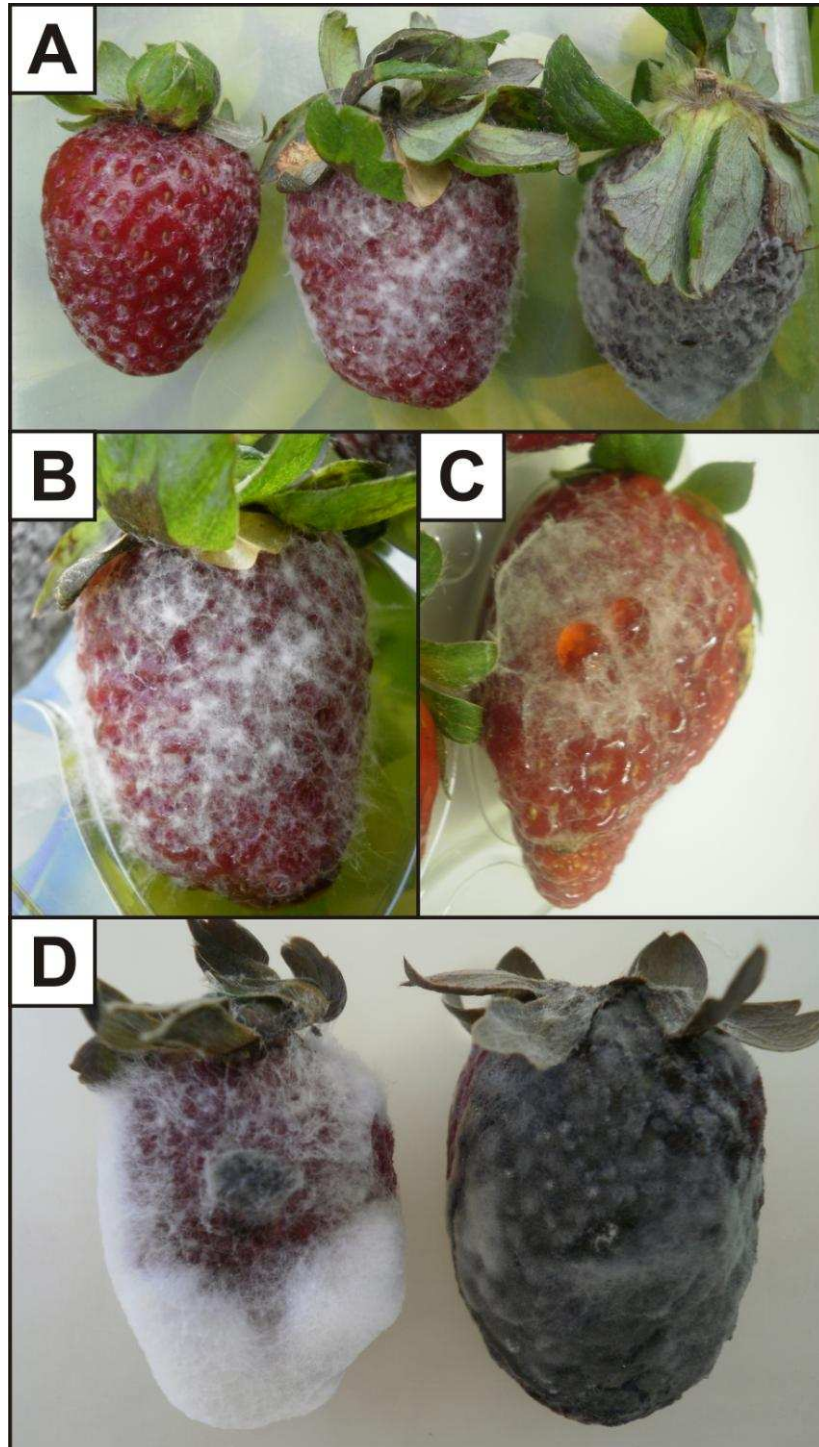


Figure 1: Symptoms of rot caused by *Neofusicoccum* spp. at various stages of development (A). Mycelium of *Neofusicoccum* spp. under the surface of fruits (B). Extravasation of the cell liquid (C). Pathogenicity test showing rot at an early stage of development (left) and mummified fruit (right) (D).

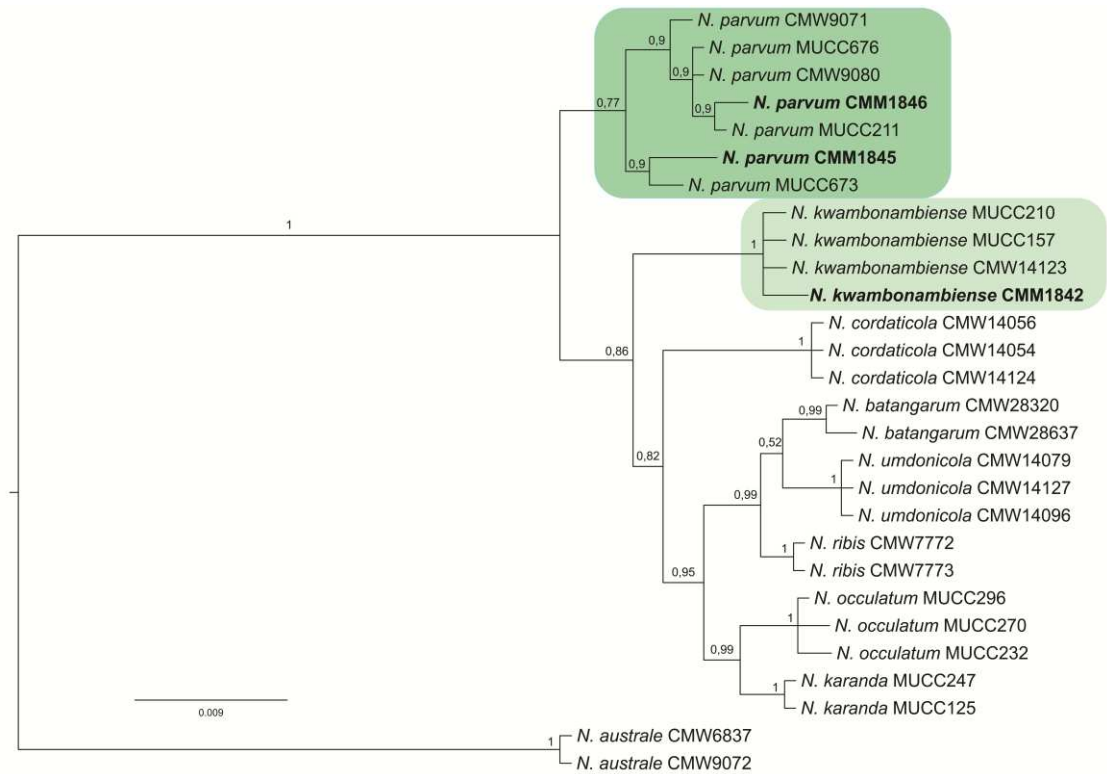


Figure 2: Multilocus phylogenetic tree inferred from Bayesian analysis using the ITS, β -tubulin, EF-1 α and RPB2 regions. Bayesian posterior probability values are indicated at the nodes. Strain numbers are indicated after species names, and the specimens used in this study are highlighted in bold. *Neofusicoccum australe* represents the outgroup taxon.

CAPÍTULO II

Análise temporal e espacial do vermelhão do morangueiro

RESUMO

O vermelhão do morangueiro (VM) é uma doença de etiologia desconhecida que vem comprometendo a produção de morango no Brasil. Visando gerar mais informações acerca da doença, foi realizado um estudo em quatro diferentes áreas de plantio comercial no estado do Espírito Santo, com objetivo de estudar o padrão de distribuição temporal e espacial da doença. A área I foi analisada aos 78, 90, 99, 106 e 120 dias após o plantio (dap), a área II aos 78, 90, 99 e 106 dap e as áreas III e IV, aos 120 dap. A cada avaliação foram quantificados o número de plantas doentes na linha e o número total de plantas. Estes valores foram usados para a elaboração de mapas de dispersão da doença e o cálculo do padrão de distribuição de plantas doentes, pelo método de ordinário runs. Foi verificado, pela análise de mapas de dispersão, que plantas de morangueiro com sintomas do VM se concentraram em focos, que seguiam principalmente o sentido da linha de plantio, conforme também mostrado pela análise de ordinário runs. A agregação tendeu a ser maior à medida que a incidência da doença aumentou. O padrão de distribuição das plantas apresentando sintomas do VM se assemelha ao de doenças já conhecidas, sugerindo que a doença é causada por um patógeno que se dissemina principalmente ao longo das linhas de plantio.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do morangueiro, *Fragaria x ananassa* Duch, é suscetível a diversas doenças causadas por fungos, vírus, nematoides, bactérias e fitoplasmas (Maas, 1998, Costa et al., 2003). Nos últimos anos, uma doença conhecida popularmente como vermelhão do morangueiro (VM), de etiologia indefinida, tem sido relatada como uma das principais doenças na cultura do morangueiro no Brasil, com ocorrência nos estados do Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, e no Distrito Federal (Henz et al., 2009).

Plantas com VM apresentam, inicialmente, folhas baixas com coloração vermelha intensa, que progride para as folhas mais novas. Além disso, pode ser observada necrose em folhas mais novas e no cálice de frutos em formação e adultos. O crescimento da parte aérea e do sistema radicular fica comprometido, reduzindo a produção e muitas vezes levando à morte das plantas, com danos que ultrapassam os 80% (Henz et al., 2009).

Os sintomas da doença têm sido associados aos mais diversos patógenos, como fungos (*Pestalotia longisetula* Guba, *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp.), nematoides e vírus. No entanto, os diversos ensaios visando identificar o agente causal biótico para a doença fracassaram, sendo que até o momento não se pode afirmar nada a respeito desta doença. Devido à falta de informação sobre o VM e considerando o agravamento do problema nas regiões onde o VM tem sido relatado, uma nova abordagem tem sido feita com estudos de epidemiologia. A análise do desenvolvimento da doença tanto no tempo como no espaço fornece uma ideia do comportamento da doença sob diferentes situações, mostrando diferentes padrões de desenvolvimento, que podem ser reflexos do

agente causal ou da interação entre agente causal, ambiente, hospedeiro e a atuação do homem no manejo da cultura (Jesus Junior et al., 2004, Bergamin Filho et al., 2004).

Um aspecto importante quando se estuda doenças em plantas é o padrão de distribuição de plantas infectadas nos campos de cultivo, ou seja, como as plantas doentes encontram-se dispostas em relação às demais (Gilligan, 1982). A análise de padrões espaciais permite fazer inferências acerca do comportamento da doença ao longo da estação de cultivo, presença de vetores e influência de fatores ambientais (Madden et al., 1995, Bergamin Filho et al., 2004). Entretanto, o estudo do padrão de distribuição da doença para inferir sobre a natureza do agente causal, biótico ou abiótico, é ainda pouco discutido.

Doenças de causas bióticas possuem padrão de distribuição bem definido, principalmente no que diz respeito ao padrão espacial e temporal. No entanto, é preciso ter em mente que um padrão agregado nem sempre implica em causa biótica, pois vários outros fatores podem estar interferindo na distribuição da doença em campos de cultivo (Laranjeira et al., 1998).

Tendo a premissa de que doenças bióticas de causas desconhecidas se comportam de forma semelhante a doenças de causas bióticas amplamente conhecidas na literatura, o estudo da epidemiologia de doenças desconhecidas nos permite fazer inferências antes mesmo de desvendar sua etiologia. Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar a dinâmica espacial e temporal de plantas de morangueiro com sintomas do VM em plantios comerciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização das áreas

Foram avaliadas quatro áreas de cultivo comercial de morango, localizadas no município de Santa Maria do Jetibá - ES (área I: 20° 12' 25,54" S e 40° 58' 58,43" O; área II: 20° 12' 20,34" S e 40° 31' 17,32" O; área III: 20° 12' 45,43" S e 40° 25' 37,33" O; área IV: 20° 11' 55,89" S e 41° 0' 4,35" O).

Nas quatro áreas foram cultivadas plantas de morangueiro, com espaçamento de 0,35m entre plantas, 0,35m entre linhas e 0,30m entre canteiros. Nas áreas I e III foi plantada a cultivar 'Oso Grande' e nas áreas II e IV a cultivar 'Camarosa'. Na área I foram avaliados 15 canteiros com duas linhas de 82 plantas cada, totalizando 2460 plantas. Nesta área, cada canteiro foi coberto com um plástico leitoso, no sistema de cultivo protegido em túnel baixo. Nas áreas II, III e IV foi utilizado o sistema de cultivo em campo aberto. Na área II foram avaliadas 200 plantas distribuídas em seis linhas de plantio; na área III, 1800 plantas em oito linhas; e na área IV, 570 plantas distribuídas em quatro linhas. Os tratamentos culturais como adubação, irrigação, controle de pragas e doenças e colheita foram realizados de acordo com a necessidade da cultura.

2.2 Análise da dinâmica da doença

Análise temporal do VM - Visando avaliar a dinâmica temporal da doença foram realizadas avaliações da incidência do VM aos 78, 90, 99, 106 e 120 dias após o plantio (dap) na área I, e aos 78, 90, 99 e 106 dap na área II.

Análise espacial do VM - Para avaliação da dinâmica espacial da doença foram realizadas avaliações da incidência do VM aos 78, 90, 99, 106 e 120 dap na área I, aos 78, 90, 99 e 106 dap na área II, e aos 120 dap nas áreas III e IV. Foi quantificado o

número total de plantas na linha de plantio e, em seguida, o número de plantas apresentando o sintoma do VM na mesma linha de plantio. O padrão de distribuição espacial de plantas infectadas foi estudado pela análise de mapas de dispersão e de ordinário runs.

Mapas de dispersão - Para estudar o padrão espacial e temporal de plantas com VM na área I, foram gerados mapas de dispersão aos 78, 90, 99, 106 e 120 dap, utilizando a extensão *Spatial Analysis* do software Arcgis®.

Ordinário Run - Um Run é definido como uma sucessão de um ou mais símbolos idênticos, que são seguidos e precedidos por um símbolo diferente, em uma sequência ordenada de dois tipos de símbolos (neste caso, plantas doentes e sadias). De acordo com essa análise, é possível avaliar a agregação das plantas em determinada área, pelo cálculo do número de runs observado (U), número de runs esperado (U (E)) e desvio padrão para a distribuição normal (σ^2). Após estes cálculos, foi aplicado o teste normal Z, sob a hipótese de que plantas doentes foram distribuídas aleatoriamente. Valores de Z_r menores do que -1,64 ($p = 0,05$) indicam a rejeição da hipótese de aleatoriedade, em favor de uma hipótese alternativa, onde plantas doentes encontram-se agregadas (Rao et al., 2007, Madden et al., 1982).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 78 dap, 7,6% das plantas da área I apresentavam sintomas do VM, chegando a 49,5% aos 120 dap (Figura 1A). Na área II, 38,5% das plantas já apresentavam sintomas da doença aos 78 dap, alcançando 80% de incidência aos 106 dap (Figura 1B).

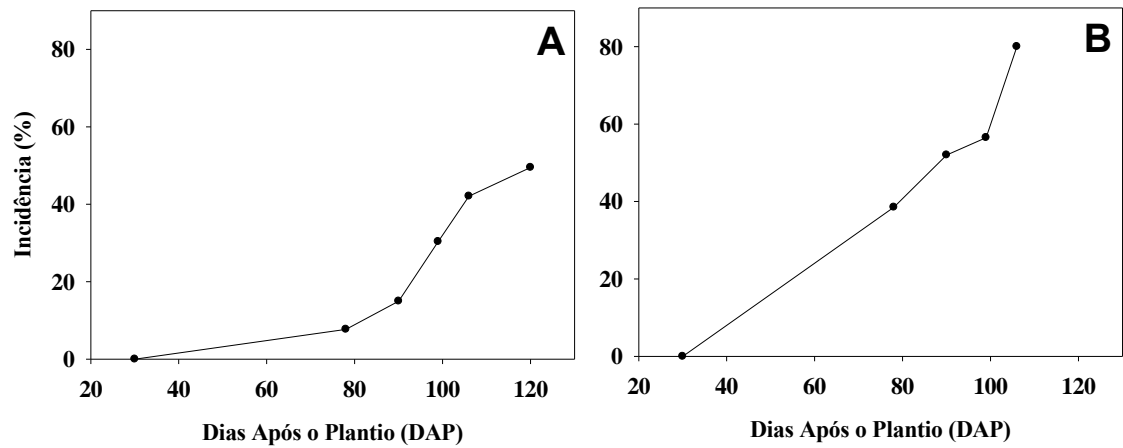


Figura 1: Curva de progresso do vermelhão do morangueiro nas áreas I (A) e II (B).

Pela análise do mapa de dispersão da doença na área I (Figura 2) foram observados focos de plantas doentes, os quais seguiram principalmente o sentido das linhas de plantio, sendo mais definidos a partir dos 99 dap (Figura 2C). A maior concentração de plantas doentes foi observada no centro do foco, diminuindo em direção à borda. Foi possível definir dois focos principais, um passando pelo meio da área e outro na borda inferior.

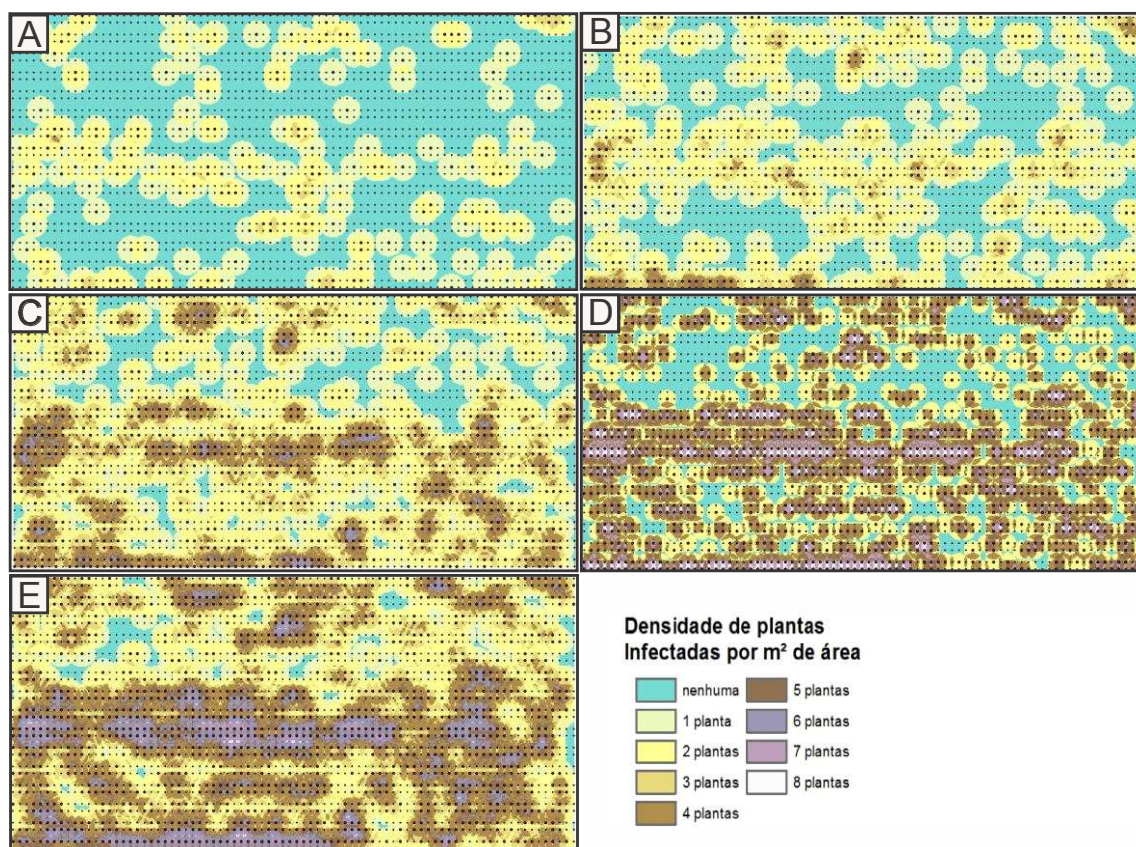


Figura 2: Densidade (plantas/m²) de plantas de morangueiro com sintomas do VM, aos 78 (A), 90 (B), 99 (C), 106 (D) e 120 (E) dias após o plantio na área I.

Foram constatados agrupamentos significativos de plantas doentes ao longo das linhas de plantio aos 78, 90, 99, 106 e 120 dap na área I, aos 78, 90, 99 e 106 dap na área II e aos 120 dap nas áreas III e IV, como pode ser observado pelos valores de $Z_r < -1,64$ (tabela 1). A maior agregação foi verificada na área III, cujos valores de Z_r foram em torno de -10,0, indicando que as plantas doentes estavam fortemente agregadas.

O número de linhas de plantio com distribuição agregada aumentou à medida que se aumentou a incidência da doença, conforme o esperado. Na área I, 10% das linhas apresentaram agrupamentos significativos quando a incidência foi de 7,8%. Esse valor aumentou para mais de 20% quando a incidência foi de 49,5% (Figura 3A). Comportamento similar foi observado na área II, na qual 16% das linhas apresentaram

agrupamentos significativos quando a incidência foi de 38,5%, passando para 33% quando a incidência foi de 80% (Figura 3C).

Além do aumento do número de linhas apresentando plantas com distribuição agregada, as plantas doentes se apresentaram mais fortemente agregadas dentro da linha, à medida que a incidência foi aumentando. Isto foi observado na área I, onde os valores médios de Zr passaram de -2,5 (quando a incidência foi de 7,8%) para -3,16 (quando a incidência foi de 49,5%). Da mesma forma, na área II o valor de Zr passou de -1,9 para -2,4 quando a incidência aumentou de 38,5% para 56,5% (Figura 3 B e D).

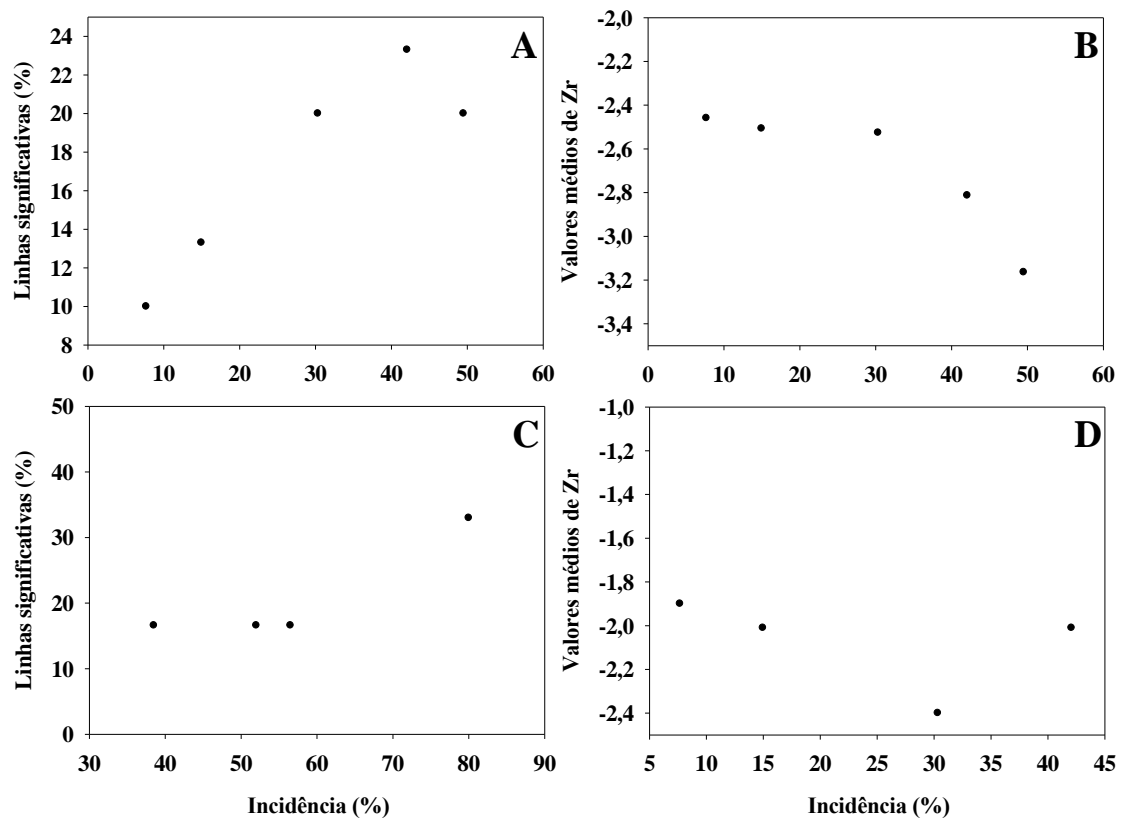


Figura 3: Porcentagem de linhas de plantio apresentando agrupamentos significativos de plantas com VM nas áreas I (A) e II (C) e valores médios de Zr nas linhas com agrupamentos significativos nas áreas I (B) e II (D), em diferentes níveis de incidência .

A agregação de plantas doentes no campo é comum, independente de sua causa (Upton & Fingleton, 1985). No caso de doenças abióticas, a agregação ocorre em função do microclima, enquanto que nas doenças bióticas, a causa da agregação é a presença de plantas doentes ao lado de plantas saudáveis, servindo como fonte de inóculo. A agregação entre plantas de morangueiro apresentando sintomas do VM foi observada nas linhas de plantio nas quatro áreas avaliadas. Esta agregação tende a ser maior à medida que se aumenta a incidência de plantas doentes. De fato, para que a agregação seja detectada, é necessário que ocorra um número de indivíduos doentes lado a lado. Doenças de causas bióticas necessitam de um limiar de incidência maior para que seja possível detectar a agregação, enquanto que doenças de natureza não infecciosa requerem baixos valores de incidência para essa detecção (Laranjeira et al., 1998). Isso foi observado em trabalhos com *Phytomonas* em dendezeiro (Van De Lande, 1993) e em estudos do *Plum pox virus* em pessegueiros, sendo que neste caso foi verificada a agregação somente quando a incidência se encontrava em valores em torno de 23 a 52% (Gottwald, 1995).

Áreas com maior densidade de plantas doentes são observadas principalmente no sentido da linha de plantio, onde são feitos os tratamentos culturais e onde estão instalados os túneis plásticos sobre os canteiros, como é o caso da área I. Este padrão de distribuição ao longo das linhas é semelhante ao observado com a melecra do mamoeiro, que tende a ser fortemente agregada no sentido das linhas de plantio, onde os tratamentos culturais são realizados (Vidal et al., 2004).

Neste estudo foram detectadas a formação e a expansão dos focos da doença ao longo da linha de plantio. Como não foi detectada a presença de nenhum microclima ou condição ambiental que pudesse estar associada à alteração destas plantas, acredita-se que os sintomas apresentados sejam devido à infecção causada por algum patógeno

disperso principalmente no sentido das linhas de plantio, levando à formação do padrão de agregação observado. Tal dispersão pode ser feita por insetos ou pelo próprio homem, por meio dos tratos culturais como limpeza, pulverização, colheita ou mesmo pela simples passagem entre os canteiros. Além disso, o uso do túnel baixo em cultivos de morangueiro favorece a dispersão ao longo da linha de plantio, pois tende a dificultar a dispersão do inóculo ou do vetor para as linhas de outros canteiros.

Sintomas semelhantes aos observados no VM tais como vermelhidão, desenvolvimento reduzido do sistema radicular e baixa produção levando à morte das plantas foram observados em diversas cultivares analisadas nos Estados Unidos, as quais se encontravam infectadas por vírus (Martin & Tzanetakis, 2013).

De acordo com nosso estudo, o padrão de distribuição temporal e espacial de plantas de morangueiro com sintomas de VM se assemelha ao de doenças de etiologia já conhecida, sugerindo que a doença é causada por um patógeno que se dissemina principalmente no sentido das linhas de plantio.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bergamin Filho A, Hau B, Amorim L, Jesus Junior WC, 2004. Análise espacial de epidemias. In: Vale FXR, Jesus Junior WC, Zambolim L, eds. *Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas*. Belo Horizonte: Perfil, 127-191.

Costa H, Zambolim L, Ventura JA, 2003. Manejo integrado das doenças do morangueiro. In: Zambolim L, ed. *Manejo integrado de pragas e doenças: fruteiras tropicais*. 131-164.

Gilligan C, 1982. Statistical analysis of the spatial pattern of *Botrytis fabae* on *Vicia faba*: A methodological study. *Transactions of the British Mycological Society* **79**, 193-200.

Gottwald T, 1995. Spatio-temporal analysis and isopath dynamics of citrus scab in nursery plots. *Phytopathology* **85**, 1082-1092.

Henz GP, Araújo TM, Pereira SF, 2009. *Produção de Morango no Distrito Federal*. Brasília: Embrapa Hortaliças.

Jesus Junior WC, Pozza EA, Vale FXR, Mora-Aguilera G, 2004. Análise temporal de epidemias. In: Vale FXR, Jesus Junior WC, Zambolim L, eds. *Epidemiologia Aplicada ao Manejo de Doenças de Plantas*. Perfil, Belo Horizonte, 127-88.

Laranjeira F, Amorim L, Berger R, Hau B, 1998. Análise espacial do amarelecimento fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. *Fitopatologia brasileira* **23**, 397-403.

Maas JL, 1998. *Compendium of strawberry diseases*. American Phytopathological Society (APS Press).

Madden L, Nault L, Murrall D, Apelt M, 1995. Spatial pattern analysis of the incidence of aster yellows disease in lettuce. *Researches on Population Ecology* **37**, 279-289.

Madden LV, Louie R, Abt JJ, Knoke JK, 1982. Evaluation of Tests for Randomness of Infected Plants. *Phytopathology* **72**, 195-198.

- Martin RR, Tzanetakis IE, 2013. High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: implications for certification, nurseries and fruit production. *Plant Disease* **97**, 1358-1362.
- Rao AS, Mukherjee A, Mohapatra N, Nayak P, 2007. Spatial Distribution of Rice Blast Disease Under Natural Field Epidemics. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* **3**, 615-620.
- Upton G, Fingleton B, 1985. *Spatial data analysis by example. Volume 1: Point pattern and quantitative data*. John Wiley & Sons Ltd.
- Van De Lande H, 1993. Spatio-temporal analysis of spear rot and 'marchitez sorpresiva' in African oil palm in Surinam. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **99**, 129-138.
- Vidal CA, Laranjeira FF, Nascimento AS, Habibe TC, 2004. Distribuição espacial da meleira do mamoeiro em zonas de trópico úmido e trópico semi-árido. *Fitopatol. bras* **29**, 3. 276-281.

Tabela 1: Valores de Z calculados para análise de Runs (Zr) em diferentes linhas de plantio (LP) nas áreas I, II, III e IV.

Área I							Área II						Área III			Área IV		
<i>LP</i>	<i>N</i>	Zr(78)	Zr(90)	Zr(99)	Zr(106)	Zr(120)	<i>LP</i>	<i>N</i>	Zr(78)	Zr(90)	Zr(99)	Zr(106)	<i>LP</i>	<i>N</i>	Zr(120)	<i>LP</i>	<i>N</i>	Zr(120)
1	82	-2.22**	-2.26	-0.17	0.11	-0.92	1	45	-0,37	-0,9	-0,9	-1,79	1	211	-7.87	1	138	1,38
2	82	-2.93	-3.20	-2.17	-3.05	-4.94	2	45	-0,04	1,24	1,71	1,41	2	211	-10.21	2	138	-3,73
3	82	-0.90*	0.37	0.11	0.54	-1.18	3	35	-0,49	-2,01	-1,63	-2,22	3	230	-10.64	3	147	-2,44
4	82	1.13	-0.03	-2.27	-2.43	-2.82	4	35	-1,9	-0,93	-2,4	-1,6	4	230	-11.69	4	147	-3,91
5	82	1.13	-0.56	-0.58	0.13	-1.44	5	20	0,28	0,23	-0,3	0,71	5	220	-11.55			
6	82	1.60	0.69	-1.47	-0.53	0.66	6	20	-1,15	-1,15	-0,19	2,71	6	220	-9.38			
7	82	1.13	1.55	0.13	-1.05	-1.60							7	239	-12.45			
8	82	1.13	1.13	-0.88	-1.27	-1.47							8	239	-12.32			
9	82	3.40	1.13	0.28	0.01	-0.15												
10	82	1.60	1.23	1.13	-0.90	-1.08												
11	82	1.23	-0.90	-0.27	0.41	0.25												
12	82	0.00	1.13	0.11	-1.12	-1.44												
13	82	-1.24	-0.68	-2.83	-1.67	-0.88												
14	82	1.13	0.01	-0.24	-3.09	-2.77												
15	82	1.68	1.21	-0.43	0.93	0.78												
16	82	1.13	1.81	-0.49	-1.52	-1.08												
17	82	1.89	-0.07	0.70	-1.68	-1.52												
18	82	0.01	-0.48	-0.78	-3.46	-2.27												
19	82	0.32	-1.00	0.70	1.95	1.15												
20	82	-2.22	-2.04	0.34	0.81	0.25												
21	82	1.13	-1.25	-0.58	0.08	-1.12												
22	82	1.13	-0.03	-1.83	-1.15	-0.77												
23	82	-1.24	-0.90	0.15	-1.44	-0.96												

24	82	1.13	1.13	-1.62	-0.30	0.36
25	82	-0.14	-0.56	0.37	0.25	-0.14
26	82	1.13	1.24	-1.95	-0.55	-0.51
27	82	-0.22	-0.29	-0.68	-0.76	-1.89
28	82	1.23	1.17	-1.27	-0.22	-1.28
29	82	0.75	0.11	0.12	0.00	-0.09
30	82	-1.62	-2.52	-4.12	-4.31	-4.31

* Padrão de distribuição aleatório; ** Padrão de distribuição agregado

N – Número total de plantas na linha de plantio;

Zr - Valores < -1,64 indicam padrão agregado pelo teste de ordinário runs ($p < 0,05$)

CAPÍTULO III

Prevalência de espécies de *Botrytis* em campos de produção de morango no Brasil

RESUMO

O fungo *Botrytis cinerea* tem sido relatado como o agente causal do mofo cinzento do morangueiro no Brasil. No entanto, uma outra espécie denominada *B. caroliniana* foi identificada nos Estados Unidos (EUA), causando esta doença. Visando verificar a ocorrência e prevalência destas espécies de *Botrytis* em lavouras de morangueiro no Brasil, foi realizado um levantamento em 18 cidades, nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo. Amostras de folha, fruto ou flor com sintomas do mofo cinzento foram coletadas e levadas ao laboratório, onde foi feito o isolamento monospórico e o armazenamento em sílica, obtendo-se um total de 200 isolados. A observação morfológica revelou uma grande variabilidade entre os isolados, no que diz respeito à cor da colônia, quantidade de esporulação e produção de escleródios. A fim de confirmar as espécies, foi realizada a extração do DNA dos isolados e a amplificação por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando *primers* específicos para as espécies *B. cinerea* e *B. caroliniana*. Apesar da grande variabilidade morfológica observada entre os isolados, todos perteceram à espécie *B. cinerea*, que possui prevalência de 100% das áreas avaliadas. A espécie *B. caroliniana* não foi encontrada em nosso estudo.

1 INTRODUÇÃO

O mofo cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, é uma doença muito comum, afetando cerca de 200 espécies de diversas famílias botânicas, dentre as quais se encontram fruteiras, hortaliças, ornamentais e plantas silvestres (Staats et al., 2005, Williamson et al., 2007, Elad et al., 2007a). O mofo cinzento do morangueiro (*Fragaria x Ananassa*), é considerado a principal doença da cultura no Brasil, causando danos significativos, desde a fase de produção no campo até a fase de pós-colheita (Lopes, 2011, Costa et al., 2011, Costa et al., 2003).

Além da sua agressividade, o patógeno se destaca pela alta adaptabilidade, sendo encontrado em áreas tropicais, subtropicais, temperadas secas e úmidas (Elad et al., 2007b). Uma grande variabilidade tem sido observada entre isolados de *B. cinerea* no que diz respeito à aparência da colônia, esporulação em meio de cultura, sensibilidade a fungicidas, produção de escleródios, dentre outras. A variabilidade genética dentro da espécie *B. cinerea* já foi observada em diversos trabalhos, sendo considerada uma variabilidade natural da espécie, inclusive sugerindo, em alguns casos, a separação em grupos dentro da espécie (Fournier et al., 2005, Giraud et al., 1999, Giraud et al., 1997).

No entanto, a variabilidade observada também pode estar relacionada à existência de outras espécies, até então de ocorrência desconhecida. No Brasil, até o momento, a única espécie conhecida causando o mofo cinzento do morangueiro é *B. cinerea*. Em trabalhos realizados na Carolina do Sul e do Norte (EUA) foi verificada, por meio de análises morfológicas e moleculares, a presença de outra espécie, *Botrytis caroliniana*, causando mofo cinzento em amora (Li et al., 2012a). Esta espécie foi também relatada em frutos de morangueiro, mostrando sintomas idênticos ao mofo cinzento causado por *B. cinerea* na cultura (Fernández-Ortuño et al., 2012). Trabalhos

avaliando a prevalência de *B. caroliniana* em plantios de morango e amora na Carolina do Norte e do Sul demonstraram a ocorrência deste fungo infectando as duas culturas, embora sua ocorrência seja mais generalizada em campos de cultivo de amora (Li et al., 2012b).

Portanto, acredita-se que a variabilidade observada entre isolados de *Botrytis* causando o mofo cinzento do morangueiro pode ser devido à ocorrência de outra espécie. Diante disso, o nosso objetivo foi verificar a prevalência das espécies de *Botrytis* causando mofo cinzento em morangueiros em diferentes regiões produtoras no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Os isolados de *Botrytis* foram obtidos de morangueiros com sintomas do mofo cinzento, provenientes de plantios comerciais em diferentes cidades dos estados do Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP), nos anos de 2011, 2012 e 2013 (tabela 1). Em cada lavoura, foi coletada uma amostra de folha, fruto ou flor. As amostras foram colocadas em sacos plásticos devidamente identificados e levadas ao laboratório para posterior isolamento. Três isolados de *B. cinerea* (CA25, CB17 e WM6) e três de *B. caroliniana* (CA3, CB15 e WM4), obtidos originalmente de amora (Li et al., 2012a), e um isolado de *B. caroliniana* (BC11HP33) obtido de morango (Li et al., 2012b) foram incluídos neste trabalho. Estes isolados, previamente identificados (Li et al., 2012a), foram utilizados em nosso trabalho como "isolados referência".

Tabela 1: Relação e origem dos isolados de *Botrytis* analisados.

Estado	Cidade	Número de isolados
Espírito Santo	Domingos Martins	5
	Santa Maria do Jetibá	4
	Venda Nova do Imigrante	7
Minas Gerais	Alfredo Vasconcelos	44
	Barbacena	4
	Ressaquinha	20
	Carandaí	5
	Senador Amaral	31
	Bom Repouso	33
	Pouso Alegre	12
	Estiva	13
	Cambuí	4
	Coimbra	2
	Ervália	1
	Viçosa	2
	São Miguel do Anta	1
São Paulo	Atibaia	5
	Jarinu	7

2.2 Isolamento e armazenamento dos isolados

Para isolamento monospórico, conídios foram coletados na superfície do material infectado apresentando intensa esporulação e colocados em 1 mL de água destilada estéril contendo 1% Tween 60. Cerca de 200 µL da suspensão de conídios foram espalhados em uma placa de petri (90 mm de diâmetro) contendo meio ágar-água e estreptomicina (100 µg/mL). Após incubação a 22 °C por 24-36 h, três esporos germinados foram coletados e transferidos para placas de petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Das três colônias obtidas, uma foi escolhida e armazenada para estudos posteriores. Os isolados de *Botrytis* foram armazenados em sílica e mantidos a 5 °C (Alfenas & Mafia, 2007).

2.3 Extração do DNA e amplificação por PCR

O DNA genômico foi extraído e as amostras quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop), diluídas para a concentração final de $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e estocadas a -20°C para uso posterior. A identificação das espécies foi feita por meio de PCR, utilizando *primers* cujo alvo é uma sequência parcial do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), G3PDH-F1 (5'- GGACCCGAGCTAATTTATGTCACGT-3') e G3PDH-F2 (5'- GGGTGTCAACAACGAGACCTACACT-3'), específicos para *B. caroliniana* e *B. cinerea*, respectivamente, em combinação com o *primer reverse* G3PD-R (5'- ACCGGTGCTCGATGGGATGAT-3') (Li et al., 2012b).

A amplificação foi realizada em um volume total de reação de 25 μL , contendo tampão de reação, dNTPs, *primers forward* e *reverse*, Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA fúngico. O programa para amplificar o fragmento de G3PDH foi: 94°C por 3 min (1 ciclo); 94°C por 30 s, 56°C por 30 s e 72°C por 1 min (32 ciclos); e 72°C durante 5 min (1 ciclo). Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 200 isolados de *Botrytis* provenientes de 18 cidades nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo. Os diferentes isolados, crescidos em meio de cultura BDA a 22°C , apresentaram grande variabilidade, conforme mostrado na Figura 1. Diversas variações foram observadas, sendo a maioria enquadrada nas seguintes descrições: i) Isolados apresentando micélio claro e ausência de esporulação, podendo ser acompanhado da produção de escleródios; ii) Isolados apresentando pouca até intensa produção de escleródios, com presença ou ausência de esporulação; iii) Isolados apresentando de escassa até intensa esporulação.

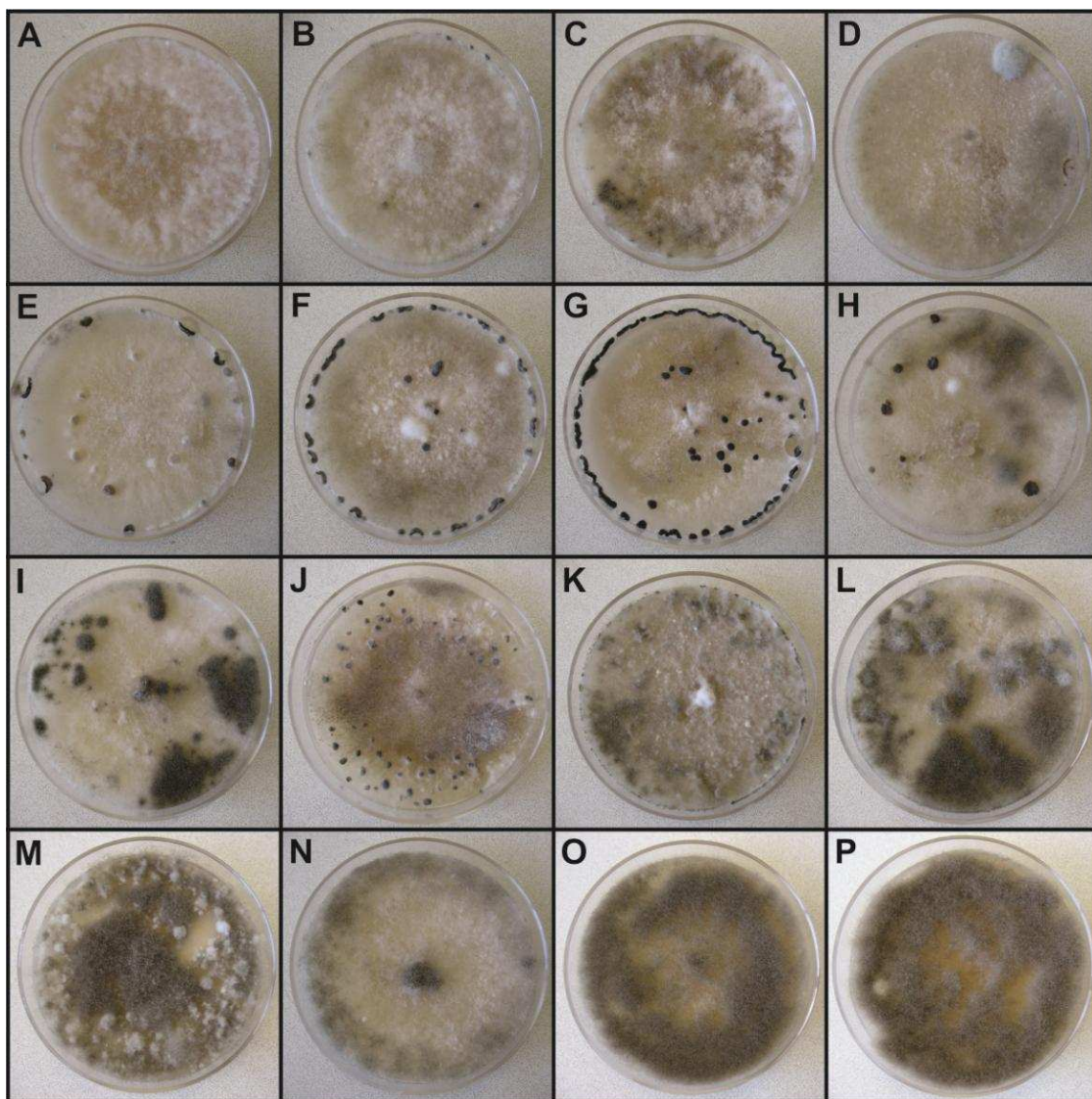


Figura 1: Isolados de *Botrytis* com 20 dias de idade em meio BDA a 22 °C ilustrando a variabilidade morfológica observada entre eles. (A) LPP-B116; (B) LPP-B128; (C) LPP-B123; (D) LPP-B112; (E) LPP-B122; (F) LPP-B130; (G) LPP-B107; (H) LPP-B103; (I) LPP-B115; (J) LPP-B106; (K) LPP-B117; (L) LPP-B105; (M) LPP-B121; (N) LPP-B102; (O) LPP-B119; (P) LPP-B110.

A análise molecular, realizada por meio da amplificação do fragmento do gene G3PDH, utilizando *primers* específicos, revelou a presença de um fragmento de 238

pares de bases (pb) para todas as 200 amostras avaliadas, correspondendo à espécie *B. cinerea* (Fig. 2).

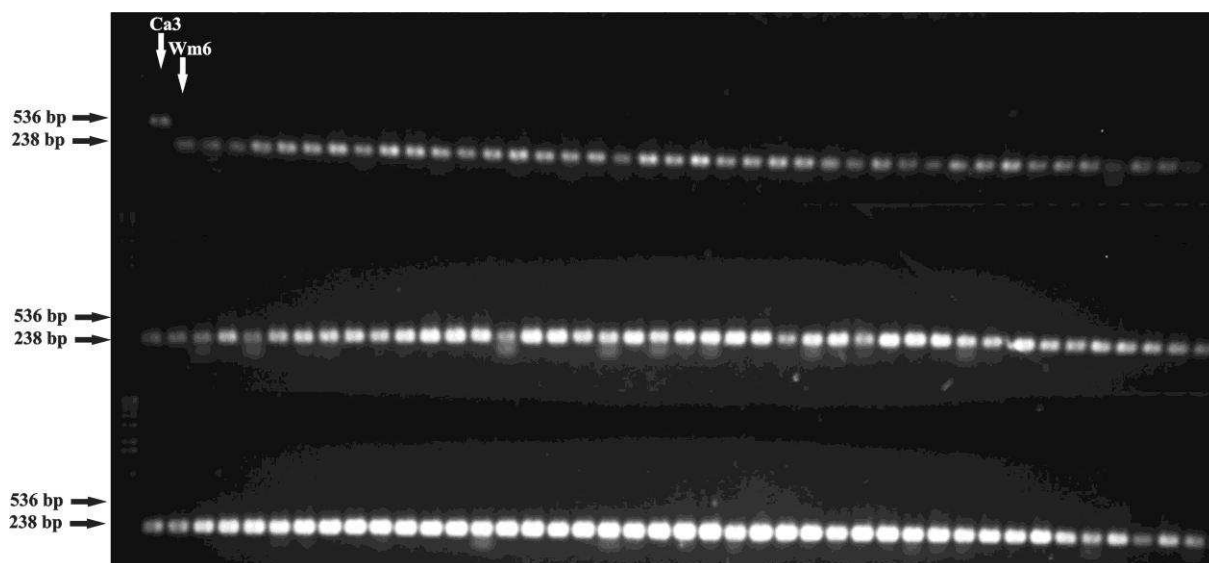


Figura 2: Amplificação do fragmento do gene G3PDH com o conjunto de *primers* G3PDH-F1, G3PDH-F2 e G3PDH-R, seguido por uma eletroforese em gel de agarose a 1%. Ca3 (*B. caroliniana*) e Wm6 (*B. cinerea*) são os “isolados referência”. A figura mostra a análise de 124 isolados dos 200 obtidos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, apesar da grande variabilidade morfológica entre os isolados de *Botrytis*, todos pertencem à espécie *B. cinerea*. Li et al. (2012a) também observaram grande variabilidade morfológica dentro da espécie *B. cinerea* quando crescidos em meio BDA, principalmente com relação à abundante ou escassa esporulação.

Diversos trabalhos têm relatado a variabilidade genética em *B. cinerea*, que é expressa na forma de indivíduos com diferentes graus de sensibilidade a fungicidas, requerimentos climáticos diferenciados, diferentes capacidades de crescimento e reprodução, dentre outras (Fournier & Giraud, 2008, Giraud et al., 1997). Neste estudo, a alta variabilidade observada entre os isolados se deve a uma variabilidade natural da

espécie. Portanto, a prevalência da espécie *B. cinerea* é de 100% das áreas de cultivo de morango analisadas, uma vez que a espécie *B. caroliniana* não foi encontrada.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas AC, Mafia RG, eds, 2007. *Métodos em Fitopatologia*.

Costa H, Ventura JA, Lopes UP, 2011. Manejo integrado de doenças do morangueiro. In: *Horticultura Brasileira*. Viçosa, S5856-877. (29.)

Costa H, Zambolim L, Ventura JA, 2003. Manejo integrado das doenças do morangueiro. In: Zambolim L, ed. *Manejo integrado de pragas e doenças: fruteiras tropicais*. 131-164.

Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds, 2007a. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*.

Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, 2007b. Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems - An introduction. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis: biology, pathology and control*. 1-8.

Fernández-Ortuño D, Li X, Wang F, Schnabel G, 2012. First Report of Gray Mold of Strawberry Caused by *Botrytis caroliniana* in North Carolina. *Plant disease* **96**, 914.

Fournier E, Giraud T, 2008. Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 122-132.

Fournier E, Giraud T, Albertini C, Brygoo Y, 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* **97**, 1251-1267.

Giraud T, Fortini D, Levis C, et al., 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuina*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* **89**, 967-973.

Giraud T, Fortini D, Levis C, Leroux P, Brygoo Y, 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 1177-1185.

- Li X, Kerrigan J, Chai W, Schnabel G, 2012a. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* **104**, 650-658.
- Li XP, Fernández-Ortuño D, Chai W, Wang F, Schnabel G, 2012b. Identification and Prevalence of *Botrytis* spp. from Blackberry and Strawberry fields of the Carolinas. *Plant disease*. **96**:1634-1637
- Lopes UP, 2011. *Podridões em pós-colheita de morango: Etiologia e efeito de produtos alternativos*: Universidade Federal de Viçosa, Mestrado.
- Staats M, Van Baarlen P, Van Kan JaL, 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* **22**, 333-346.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JaL, 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**, 561-580.

CAPÍTULO IV

Levantamento do uso de fungicidas no controle do mofo cinzento do morangueiro

RESUMO

O controle químico é uma das estratégias mais utilizadas para manejo do mofo cinzento do morangueiro, causado pelo fungo *Botrytis cinerea*. No entanto, existem diversos problemas associados ao controle químico, como a contaminação de alimentos e falhas de controle. Visando evitar tais problemas e propor um melhor manejo desta doença, foi realizado um levantamento de informações acerca do controle químico do mofo cinzento em alguns estados brasileiros. Foram visitadas 200 propriedades, onde foi avaliada a prática de retirada de material doente da lavoura. Apenas 12,5% das propriedades aplicam esta prática de maneira adequada. O uso do controle químico da doença foi avaliado em 123 propriedades, sendo utilizado em 98,5% dos casos. O fungicida procimidona é utilizado em 66,0% das propriedades, seguido por iprodiona (37,4%), tiofanato-metílico (35,8%) e o formulado pirimetanil + iprodiona (0,8%). A rotação de fungicidas com diferentes princípios ativos é pouco utilizada, principalmente devido ao número restrito de princípios ativos registrados. Tais informações mostram que as técnicas de manejo do mofo cinzento que estão sendo aplicadas em cultivos comerciais não são adequadas, possivelmente em função do baixo nível de conhecimento dos produtores e de uma assistência técnica deficiente. Por essa razão, é necessário que sejam adotadas medidas de conscientização, além do treinamento de produtores e técnicos e, principalmente, o registro de novos fungicidas com diferentes

modos de ação, para que o manejo da doença possa ser realizado de maneira mais efetiva.

1 INTRODUÇÃO

O controle químico é utilizado nas mais diversas culturas, sendo uma das principais estratégias para controle de doenças de plantas. No caso do mofo cinzento do morangueiro causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, o controle químico é a principal estratégia de controle (Costa et al., 2011, Costa et al., 2003), visto que não existem cultivares de morangueiro resistentes ao patógeno, registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Mapa, 2014).

Uma das maiores preocupações relacionadas ao controle químico de doenças de plantas é a contaminação ambiental, de aplicadores e consumidores (Koler, 1998, Zambolim et al., 1970). O morangueiro tem sido apontado como uma das hortaliças com os maiores problemas de contaminação por agroquímicos, seja pelo uso de produtos não registrados para a cultura, ou por resíduos acima do limite máximo permitido (Anvisa, 2014).

Além dos problemas de contaminação dos alimentos por agroquímicos, a manutenção da eficiência dos fungicidas deve ser levada em consideração para se evitar danos severos à cultura, pois não existem outras estratégias com alta eficiência para controle desta doença (Brent, 1999, Brent et al., 1998, Elad et al., 2007). Dentre os fungicidas registrados no Brasil para controle do mofo cinzento do morangueiro estão os do grupo químico das dicarboxamidas, benzimidazóis e anilopirimidinas (MAPA, 2014). No entanto, o fungo *B. cinerea* já vem apresentando insensibilidade a estes fungicidas, conforme demonstrado em muitos trabalhos (Amiri et al., 2013, LaMondia

& Douglas, 1997, Myresiotis et al., 2007, Yourman & Jeffers, 1999, Yourman et al., 2000).

Diversas pesquisas têm mostrado casos de insensibilidade de *B. cinerea* a fungicidas e contaminação de alimentos com estes produtos. No entanto, não existe nenhuma pesquisa relacionada à forma como é feito o controle químico da doença em condições comerciais e como estas ações podem a ineficiência do controle. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento sobre os produtos utilizados para controle do mofo cinzento do morangueiro e os possíveis problemas envolvidos no controle da doença no campo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram visitadas 200 propriedades comerciais, em 18 cidades nos estados do Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP). Nestas propriedades foi avaliada a prática de retirada de material doente (folhas e frutos) da lavoura, visto que esta é uma prática cultural indicada para reduzir a incidência da doença e, conseqüentemente, o número de aplicações de fungicidas.

As propriedades foram classificadas de acordo com a prática ou não de retirada do material doente. Assim, propriedades isentas ou com pouco material doente nos canteiros e entrelinhas foram consideradas como "propriedades que realizavam a prática de retirada de material doente"; propriedades onde não eram realizadas práticas de retirada ou onde o material doente era deixado nas entrelinhas foram consideradas como "propriedades sem retirada de material"; e propriedades onde era retirada parte do material doente, porém de forma pouco eficiente, foram consideradas como "propriedades com retirada inadequada".

Em 123 das 200 propriedades visitadas, foi realizada uma entrevista com o produtor e/ou dono da propriedade. Dentre os assuntos abordados estavam o uso ou não de fungicidas, os produtos utilizados na cultura durante o período produtivo para o controle do mofo cinzento do morangueiro e possíveis falhas de controle dos fungicidas. Com estes dados, foram calculadas as porcentagens de propriedades que aplicam a prática de retirada de material doente, propriedades que utilizam o controle químico, propriedades que utilizam um, dois, três ou mais ingredientes ativos diferentes para controle do mofo cinzento e possíveis casos de insensibilidade a fungicidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 200 propriedades visitadas, 50,5% não fazem a retirada de material doente da lavoura, 37,0% realizam a retirada, porém de forma inadequada, e 12,5% das lavouras fazem a retirada adequadamente. A prática de retirada de material doente é altamente indicada, pois reduz a concentração de inóculo do patógeno, que em última análise reduzirá o número de aplicações de fungicidas (Mizubuti & Maffia, 2007, Cota et al., 2009). Além disso, nesta situação, o controle químico é mais eficiente e o risco de seleção de populações do fungo insensíveis aos fungicidas é menor (Brent, 1999).

Com relação ao tipo de controle realizado, foi verificado que em 98,4% das propriedades é realizado o controle químico do mofo cinzento do morangueiro e em 1,6% é utilizado o controle biológico (Tabela 1). Este resultado confirma a ampla utilização do controle químico na cultura do morangueiro, uma vez que a cultura é muito suscetível ao mofo cinzento e não existem outras estratégias facilmente disponíveis para seu controle (Elad et al., 2007, Maas, 1998).

Dentre os fungicidas registrados no MAPA para o controle do mofo cinzento do morangueiro, os mais utilizados são os pertencentes ao grupo químico das dicarboxamidas, sendo que em 66,0% das propriedades analisadas é utilizado o fungicida procimidona e em 37,4% o fungicida iprodiona. O fungicida tiofanato-metílico, do grupo químico dos benzimidazóis, é utilizado em 35,8% das propriedades, enquanto que o produto formulado contendo os fungicidas pirimetanil + iprodiona, do grupo químico anilinopirimidina + dicarboxamida, é utilizado em apenas 0,8% das propriedades avaliadas.

O uso de fungicidas com alto período de carência não é recomendado durante o período de produção. Apesar disso, foi verificado que 35,8% das propriedades utilizam o fungicida tiofanato-metílico para controle do mofo cinzento. Este produto não é adequado, pois seu período de carência na cultura do morango é de 14 dias (MAPA, 2014) e as colheitas são realizadas diariamente ou a cada 2-3 dias.

A rotação de fungicidas com diferentes princípios ativos é pouco utilizada entre os produtores entrevistados. Em 38,8% das propriedades que realizam o controle químico, utiliza-se apenas um princípio ativo; 32,2% utilizam dois; e apenas 11,0% utilizam três ou mais princípios ativos. Embora o uso de fungicidas de diferentes princípios ativos seja altamente recomendável, no caso do mofo cinzento do morangueiro esta estratégia é difícil de ser aplicada pelo fato de existirem apenas quatro fungicidas registrados, os quais pertencem a três grupos químicos. Além disso, o fungicida tiofanato-metílico, do grupo dos benzimidazóis, não pode ser utilizado durante o período produtivo devido ao seu alto período de carência.

Além da rotação de fungicidas, outra estratégia é o uso de produtos formulados em conjunto, como o pirimetanil + iprodiona, disponíveis no mercado. Estes produtos atuam em diferentes sítios de ação na célula fúngica, reduzindo os riscos de

desenvolvimento de populações insensíveis do patógeno (Zambolim et al., 2007). No entanto, no Brasil, os produtores têm optado por utilizar sempre o mesmo fungicida, e com um único princípio ativo, conforme mostrado em nossa pesquisa.

Outro fato observado foi a utilização de diversos fungicidas registrados para a cultura, porém não registrados para o controle do mofo cinzento no morangueiro. É o caso de alguns fungicidas pertencentes ao grupo químico das fenilpiridinilaminas, triazóis e estrobilurinas. Foram também constatados casos de uso de fungicidas não registrados no MAPA para a cultura do morango, como os fungicidas à base de procloraz (1,6%) e Cloridrato de Propamocarbe + Fluopicolide (1,6%).

A ineficiência dos fungicidas foi relatada por 8,2% dos produtores, sendo que 4,9% associaram o problema ao fungicida iprodiona e 3,3% ao procimidona. O relato de produtores sobre a ineficiência de fungicidas que são recomendados para o controle do mofo cinzento pode sugerir casos de insensibilidade. No entanto, isto deve ser observado com cautela, pois diversos outros fatores estão associados com o controle ineficiente da doença, como quantidade de doença na área, qualidade do produto, época e tecnologia de aplicação adequadas, dentre outros. Além disso, o controle eficiente requer a correta identificação da doença, seguida pela recomendação de estratégias de controle. A aplicação de produtos inadequados, devido à diagnose incorreta ou ao desconhecimento do fungicida mais indicado, resulta em falhas de controle. Com isso, são necessárias novas aplicações de fungicidas, o que pode aumentar o risco de contaminação de alimentos e a seleção de indivíduos insensíveis (Zambolim et al., 2007).

As técnicas de manejo do mofo cinzento que estão sendo aplicadas em cultivos comerciais têm mostrado o baixo nível de conhecimento dos produtores, associado a uma assistência técnica deficiente. Estas irregularidades podem levar, em curto prazo, à

ineficiência de controle da doença e à contaminação de consumidores. Portanto, medidas de conscientização devem ser adotadas e o treinamento de produtores e técnicos deve ser realizado, visando reduzir estes problemas e evitar a perda da eficiência dos fungicidas em uso. Além disso, é necessário o registro de novos fungicidas com diferentes modos de ação, favorecendo o uso da rotação de fungicidas de diferentes ingredientes ativos bem como a formulação conjunta, para que o manejo da doença possa ser realizado de maneira mais efetiva.

Tabela 1: Porcentagem de propriedades que utilizam os diferentes fungicidas (registrados para o controle do mofo cinzento; registrados para a cultura, mas não registrados para controle do mofo cinzento no morangueiro; não registrados para a cultura) e agentes de controle biológico.

	Fungicidas	Propriedades (%)
Fungicidas registrados para o controle do mofo cinzento no morangueiro	Procimidona	66,0
	Iprodiona	37,4
	Tiofanato-metílico	35,8
	Pirimetamil + Iprodiona	0,8
Fungicidas registrados para o morangueiro, mas não registrados para o controle do mofo cinzento na cultura	Fluazinan	65,0
	Azoxistrobina	51,2
	Pirimetamil	3,3
	Difenoconazol	3,3
	Imibenconazole	2,4
Fungicidas não registrados para o morangueiro	Tebuconazol	0,8
	Procloraz	1,6
	Cloridrato de Propamocarbe + Fluopicolide	1,6
Controle Biológico	<i>Bacillus pumilus</i>	0,8
	<i>Clonostachys rosea</i>	0,8

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anvisa, 2014 - <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em Janeiro de 2014.

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

Brent K, 1999. Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como manejá-la. *Global crop protection federation*.

Brent KJ, Hollomon DW, Federation GCP, 1998. *Fungicide resistance: the assessment of risk*. Global Crop Protection Federation.

Costa H, Ventura JA, Lopes UP, 2011. Manejo integrado de doenças do morangueiro. In. *Horticultura Brasileira*. Viçosa, S5856-77. (29.)

Costa H, Zambolim L, Ventura JA, 2003. Manejo integrado das doenças do morangueiro. In: Zambolim L, ed. *Manejo integrado de pragas e doenças: fruteiras tropicais*. 131-64.

Cota L, Maffia L, Mizubuti E, Macedo P, 2009. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control* **50**, 222-30.

Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds, 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*.

Koler W, 1998. Chemical approaches to managing plant pathogens. In: Ruberson JR, ed. *Handbook of Pest Management*. New York: Marcel Dekker, 337-76.

Lamondia J, Douglas S, 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant disease* **81**, 729-32.

Maas JL, 1998. *Compendium of strawberry diseases*. American Phytopathological Society (APS Press).

MAPA, 2014. www.agricultura.gov.br/. Acesso em Janeiro de 2014.

Mizubuti ESG, Maffia LA, 2007. *Introdução à Fitopatologia*. Viçosa: Editora UFV.

- Myresiotis C, Karaoglanidis G, Tzavella-Klonari K, 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant disease* **91**, 407-13.
- Yourman L, Jeffers S, 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant disease* **83**, 569-75.
- Yourman L, Jeffers S, Dean R, 2000. Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* **90**, 851-9.
- Zambolim L, Vale FXR, Cruz Filho J, Chaves GM, 1970. *Emprego da calda Viçosa na cultura do tomateiro (L. esculentum) para o controle de doenças da parte aérea*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (Informe Técnico, 66).
- Zambolim L, Venâncio WS, Oliveira SHFD, 2007. *Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas*.

CAPÍTULO V

Sensibilidade de isolados de *Botrytis cinerea* aos fungicidas dicarboxamidas e benzimidazóis

RESUMO

O mofo cinzento do morangueiro causado pelo fungo *Botrytis cinerea* é controlado principalmente por meio da aplicação de fungicidas do grupo químico das dicarboxamidas e benzimidazóis. No entanto, a eficiência de controle destes fungicidas não tem sido satisfatória. Diante disto, este trabalho objetivou avaliar a sensibilidade de isolados de *B. cinerea* a três fungicidas mais utilizados para controle desta doença na cultura do morangueiro. Foram utilizados 100 isolados oriundos de áreas de cultivo comercial nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Destes isolados, oito foram provenientes de áreas onde o controle químico tem sido ineficiente. Os isolados foram crescidos, por dois dias, em meio BDA contendo fungicida em diferentes concentrações: 0,0 (controle); 0,1; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ingrediente ativo (i.a.). Em seguida, foi quantificado o crescimento da colônia e calculada a porcentagem de inibição, tomando como base o tratamento controle. Com estes dados, foi determinada a concentração efetiva do fungicida capaz de inibir o crescimento da colônia em 50% (EC_{50}). Os isolados foram divididos em seis classes, de acordo com os valores de EC_{50} : < 0,1; 0,1-1; 1-10; 10-100; 100-1000; >1000. A maioria dos isolados se mostrou insensível ao tiofanato-metílico (89%), 54% foram insensíveis ao procimidona e 36% ao iprodiona. Foram observados diversos casos de resistência múltipla e resistência cruzada. Cinco dos oito isolados coletados em áreas relatadas com falhas de controle foram confirmados como insensíveis. Com este levantamento foi possível detectar

insensibilidade de isolados de *B. cinerea* aos três fungicidas mais utilizados para o controle do mofo cinzento do morangueiro.

1 INTRODUÇÃO

O mofo cinzento do morangueiro, causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., é uma doença amplamente distribuída nas regiões onde se cultiva o morango no mundo (Maas, 1998). No Brasil, é considerada a principal doença da cultura, causando danos severos em todas as regiões produtoras (Costa et al., 2003).

O patógeno *B. cinerea* pode causar lesões em folhas, pecíolos, flores e frutos em qualquer estágio de desenvolvimento do morangueiro (Bristow et al., 1986, Maas, 1998, Elad et al., 2007). Porém é mais problemático no período de produção, quando o patógeno infecta as flores. Nesta etapa, é necessário o manejo adequado para que sejam minimizados os danos causados pela doença.

Atualmente, a principal estratégia utilizada para manejo do mofo cinzento é o controle químico, sendo que em condições favoráveis à ocorrência da doença, diversas aplicações de fungicidas são realizadas. No Brasil, são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para controle do mofo cinzento do morangueiro os fungicidas procimidona e iprodiona (grupo das dicarboxamidas), tiofanato-metílico (grupo dos benzimidazóis) e o pirimetanil (grupo das anilino pirimidinas) (Mapa, 2014).

Os fungicidas pertencentes ao grupo das dicarboxamidas e dos benzimidazóis têm sido utilizados em grande escala, desde as décadas de 60 e 70, enquanto que fungicidas do grupo das anilino pirimidinas começaram a ser utilizados a partir de meados da década de 90 (Rosslenbroich & Stuebler, 2000). Atualmente, no Brasil, os fungicidas iprodiona, procimidona e tiofanato-metílico são os mais aplicados para controle do mofo cinzento na cultura do morangueiro.

Embora o controle químico seja a estratégia mais utilizada para o controle do mofo cinzento do morangueiro, os produtores vêm enfrentando problemas com a perda de eficiência dos fungicidas, devido ao surgimento de populações do fungo insensíveis aos fungicidas. Diversos mecanismos pelos quais *B. cinerea* se torna insensível a fungicidas já foram identificados, sendo que o mais comum é o surgimento de mutações nos sítios-alvo dos fungicidas (Leroux et al., 2002).

Vários trabalhos têm relatado casos de insensibilidade de *B. cinerea* aos fungicidas. LaMondia & Douglas (1997) verificaram que 70% dos isolados foram insensíveis aos fungicidas benzimidazóis (benomyl e tiofanato-metílico) e 35% dos isolados foram insensíveis à iprodiona. Outro trabalho, avaliando uma população de *B. cinerea* oriunda de cultivo de ornamentais, em casa de vegetação, mostrou que mais de 80% dos isolados foram insensíveis ao fungicida tiofanato-metílico (Yourman & Jeffers, 1999). Diversos isolados obtidos de pêra também apresentaram insensibilidade aos fungicidas iprodiona e tiabendazole (Lennox & Spotts, 2003). Yoon and Yeoung (2008), estudando doses de diversos fungicidas (de 2 a 5000 µg i.a/mL), verificaram que mais de 50% dos isolados foram insensíveis.

No Brasil, são escassas as pesquisas sobre o perfil de populações de *B. cinerea* frente aos fungicidas registrados para a cultura. Esta informação é de extrema importância, pois a partir dela é possível traçar estratégias para manter a eficiência de controle da doença e evitar a perda de eficiência dos produtos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade de isolados de *B. cinerea*, provenientes de lavouras de cultivo comercial, aos fungicidas procimidona, iprodiona e tiofanato-metílico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Os isolados de *B. cinerea* foram obtidos de morangueiros com sintomas do mofo cinzento, provenientes de plantios comerciais de diferentes cidades dos estados do Espírito Santo (Venda Nova do Imigrante, Domingos Martins e Santa Maria do Jetibá) e Minas Gerais (Alfredo Vasconcelos, Barbacena, Ressaquinha, Carandaí, Senador Amaral, Cambuí, Pouso Alegre, Bom Repouso, Ervália e Coimbra), nos anos de 2011, 2012 e 2013. Em cada lavoura, foi coletada uma amostra de folha, fruto ou flor apresentando sintomas da doença. As amostras foram colocadas em sacos plásticos devidamente identificados e levadas ao laboratório para posterior isolamento do fungo.

2.2 Isolamento e armazenamento dos isolados

Para isolamento monospórico, conídios foram coletados na superfície do material infectado apresentando intensa esporulação e colocados em 1 mL de água destilada estéril contendo 1% Tween 60. Cerca de 200 µL da suspensão de conídios foram espalhados em uma placa de petri (90 mm de diâmetro) contendo meio ágar-água e estreptomicina (100 µg/mL). Após incubação a 22 °C por 24-36 h, três esporos germinados foram coletados e transferidos para placas de petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar). Das três colônias obtidas, uma foi escolhida e armazenada. Os isolados foram armazenados em sílica e mantidos a 5 °C (Alfenas & Mafia, 2007). No total, foram obtidos 100 isolados, sendo oito deles provenientes de áreas onde os produtores relataram ineficiência dos fungicidas iprodiona (quatro isolados) ou procimidona (quatro isolados).

2.3 Avaliação da sensibilidade dos isolados aos fungicidas

Os fungicidas iprodiona, procimidona e tiofanato-metílico foram testados em diferentes concentrações de ingrediente ativo (i.a), utilizando os produtos comerciais Rovral SC (iprodiona), Sumilex 500 WP (procimidona) e Cercobin 700 WP (tiofanato-metílico). Estes fungicidas foram selecionados por serem os mais aplicados na cultura do morangueiro para controle do mofo cinzento, conforme observado em levantamentos prévios. O fungicida foi adicionado em meio BDA fundente, obtendo-se as concentrações de 0,0 (controle); 0,1; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de i.a. Um disco de BDA (7 mm de diâmetro) contendo micélio do fungo foi depositado no centro de placas de petri (60 mm de diâmetro) contendo 8 mL de meio BDA + fungicida nas diferentes doses. os discos de BDA foram obtidos de colônias aos três dias após a repicagem. Para cada combinação de dose e fungicida foram utilizadas três placas de petri, sendo que cada uma correspondeu a uma repetição.

As placas de petri foram mantidas em BOD a temperatura de 22 °C, no escuro, por dois dias. Após esse período, o diâmetro da colônia foi aferido em duas direções perpendiculares com auxílio de um paquímetro digital, obtendo-se em seguida o diâmetro médio da colônia. Usando o tratamento controle (sem a presença de fungicida) como padrão, foi calculada a porcentagem de crescimento da colônia nas diferentes doses avaliadas. Os dados de porcentagem de crescimento foram subtraídos de 100, obtendo-se a porcentagem de inibição do crescimento em cada dose do fungicida. Com estes dados, foi determinada a concentração efetiva do fungicida capaz de inibir o crescimento da colônia em 50% (EC_{50}).

Para discriminar os isolados em sensíveis ou insensíveis aos fungicidas, foram considerados trabalhos anteriores onde esta relação tem sido bem definida. Para os fungicidas dicarboxamidas (iprodiona e procimidona) foi usada a dose discriminatória

de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LaMondia & Douglas, 1997, Myresiotis et al., 2007) e para o fungicida do grupo dos benzimidazóis (tiofanato-metílico) foi considerada a dose de $10,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LaMondia & Douglas, 1997, Lennox & Spotts, 2003).

Os isolados foram divididos em seis classes, de acordo com os valores de EC_{50} : $<0,1$; $0,1-1$; $1-10$; $10-100$; $100-1000$; >1000 . Para os fungicidas iprodiona e procimidona, foram classificados como insensíveis os isolados com $EC_{50}>1,0$ e como sensíveis os que apresentaram $EC_{50}<1,0$. Para o fungicida tiofanato-metílico, os isolados com $EC_{50}>10,0$ foram classificados como insensíveis, e com $EC_{50}<10,0$ foram considerados sensíveis.

Os dados de sensibilidade foram convertidos em valores binários, onde os isolados sensíveis foram representados por zero (0) e os insensíveis, por um (1). Após a conversão, foi realizada a análise de correlação de Person entre os dados de sensibilidade à iprodiona e procimidona, a fim de verificar a existência de resistência cruzada, e entre iprodiona ou procimidona e tiofanato-metílico, para verificar a ocorrência de resistência múltipla.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos isolados de *B. cinerea* (64%) foi sensível ao fungicida iprodiona, sendo que 16% apresentaram $EC_{50}<0,1\mu\text{g mL}^{-1}$. Os demais isolados (36%) apresentaram $EC_{50} >1,0\mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando-se insensíveis ao fungicida, embora os valores de EC_{50} não tenham ultrapassado $10,0\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1).

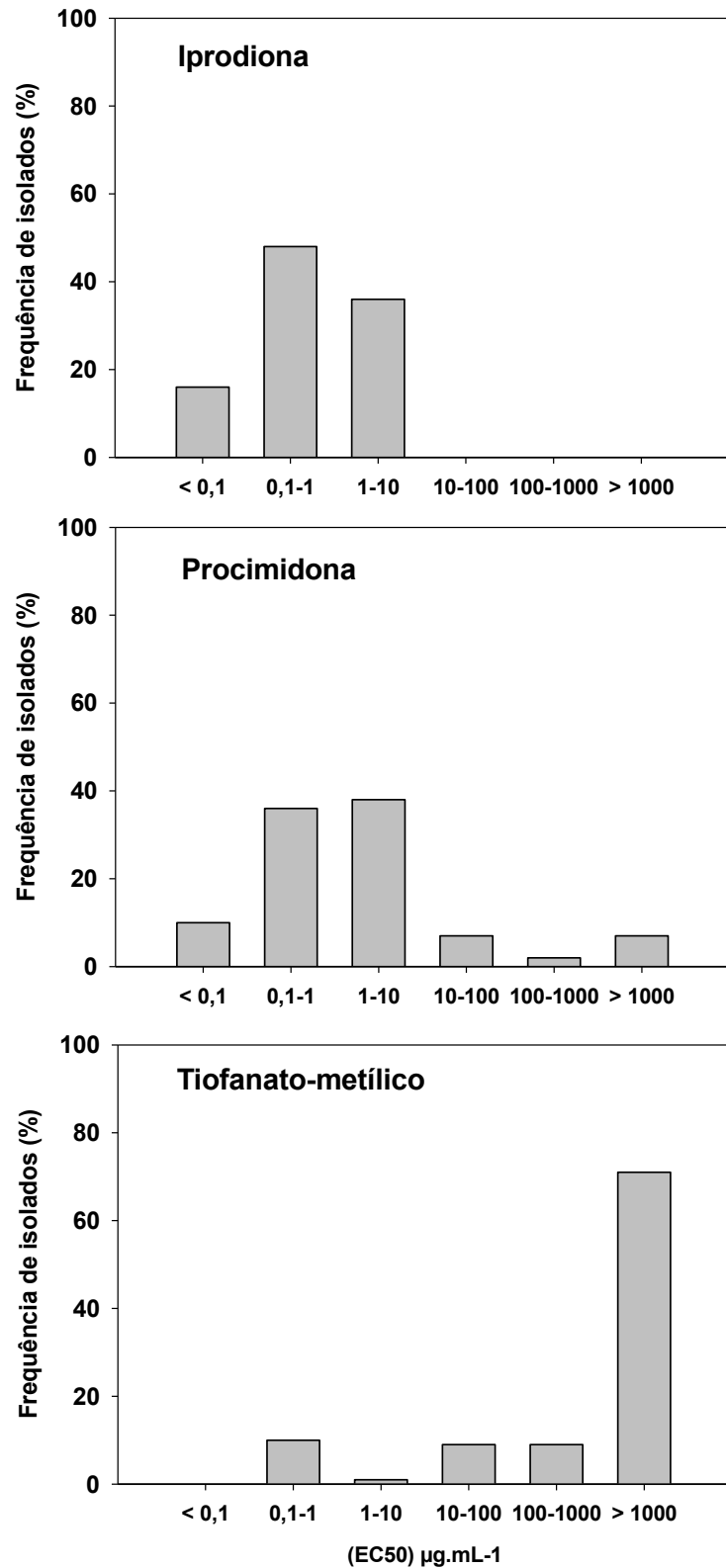


Figura 1: Frequência de distribuição de valores de concentração efetiva para inibir 50% do crescimento (EC_{50}) para os diferentes isolados quando crescidos em meio contendo os fungicidas iprodiona, procimidona e tiofanato-metílico.

No caso do fungicida procimidona, 46% dos isolados foram sensíveis, sendo que destes, 10% apresentaram $EC_{50} < 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os demais isolados (54%) foram considerados insensíveis ($EC_{50} > 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), em alguns casos (7%) com valores de EC_{50} que ultrapassaram $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Quando se avaliou a sensibilidade dos isolados ao fungicida tiofanato-metílico, foi observado comportamento bem diferente, com 89% dos isolados insensíveis ($EC_{50} > 10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que em 71% dos casos os valores de EC_{50} foram maiores que $1000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Baseado nas respostas de sensibilidade e insensibilidade, os isolados foram agrupados em seis diferentes fenótipos (SIS, SSI, ISI, SII, III e SSS), dentre os oito possíveis (Figura 2), onde I representa insensível e S, sensível, e as letras seguidas referem-se à resposta aos fungicidas iprodiona, procimidona e tiofanato-metílico, respectivamente. O fenótipo SSI, cujos isolados são insensíveis apenas ao tiofanato-metílico, foi o mais comum (39%), seguido pelo fenótipo de insensibilidade aos três fungicidas (III), com 38%. Isolados insensíveis a procimidona e tiofanato-metílico (SII) também foram encontrados em alta frequência (24%), enquanto que os fenótipos ISI, SSS e SIS foram representados apenas por 8, 9 e 2%, respectivamente. Os fenótipos ISS e IIS não foram encontrados.

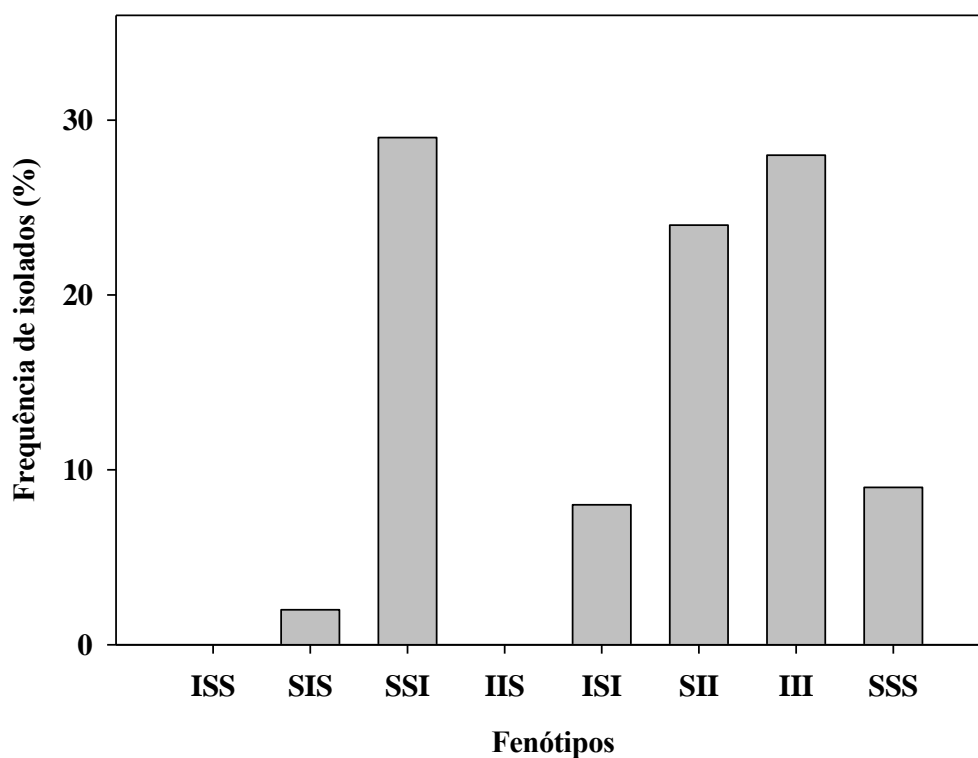


Figura 2: Frequência de isolados apresentando os fenótipos de insensibilidade (I) ou sensibilidade (S) aos fungicidas iprodiona, procimidona e tiofanato-metílico, respectivamente.

Com base na análise de correlação foi possível observar correlação significativa ($p < 0,05$) entre a insensibilidade a um fungicida e aos demais (Tabela 1). Isso foi verificado nas três possíveis combinações, onde isolados insensíveis a um fungicida foram também insensíveis a outro.

Tabela 1: Correlação entre a insensibilidade dos isolados aos fungicidas iprodiona, procimidona e tiofanato-metílico.

Fungicida	Iprodiona	Procimidona	Tiofanato-metílico
Iprodiona	-	0,0002	0,0080
Procimidona	0,0002*	-	0,0112
Tiofanato-metílico	0,0080	0,0112	-

* p-valor $< 0,05$ indica correlação significativa.

Foi verificado que dos oito isolados coletados em áreas com problemas de ineficiência dos fungicidas, cinco foram insensíveis ao fungicida sob suspeita (Tabela 2). Isso demonstra que populações do fungo insensíveis já estão bem estabelecidas em áreas de cultivo, o que pode justificar a ocorrência de falhas de controle, embora outros fatores possam interferir no sucesso do controle químico.

Tabela 2: Análise da sensibilidade de oito isolados coletados em áreas com suspeita de insensibilidade aos fungicidas iprodiona ou procimidona.

Isolado	Fungicida com suspeita de insensibilidade	Valor de EC₅₀	Resultado	Confirmação
LPP-B24	Iprodiona	1,0-10,0	I	+
LPP-B26	Procimidona	0,1-1,0	S	-
LPP-B30	Procimidona	0,1-1,0	S	-
LPP-B43	Iprodiona	1,0-10,0	I	+
LPP-B46	Procimidona	1,0-10,0	I	+
LPP-B48	Iprodiona	1,0-10,0	I	+
LPP-B51	Procimidona	0,1-1,0	S	-
LPP-B54	Iprodiona	1,0-10,0	I	+

I (insensível); S (sensível); + (Confirmação da suspeita dos produtores)

O fungo *B. cinerea* pertence a um grupo denominado de “alto risco” para o desenvolvimento de insensibilidade a fungicidas, devido à sua alta capacidade reprodutiva, facilidade de dispersão, extensa gama de hospedeiros e alta variabilidade genética, que pode ser ainda maior por possuir elementos transponíveis, que podem aumentar a taxa de mutação (Samuel et al., 2012, Brent et al., 1998, Brent, 1999). O presente trabalho mostrou que a população de *B. cinerea* analisada foi insensível ao fungicida tiofanato-metílico. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos estudando este fungo em cultivo de ornamentais, em casa de vegetação, onde mais de 80% dos isolados mostraram-se insensíveis a este fungicida (Yourman & Jeffers, 1999).

A sensibilidade de *B. cinerea* a fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis ocorre comumente, como vem sendo verificado em diversos trabalhos (Fernandez-Ortuno et al., 2014, LaMondia & Douglas, 1997, Lennox & Spotts, 2003, Moorman & Lease, 1992, Yoon & Yeoung, 2008, Myresiotis et al., 2007).

Neste estudo, os isolados foram mais sensíveis aos fungicidas procimidona e iprodiona, quando comparado ao tiofanato-metílico, o que mostra que os fungicidas do grupo das dicarboxamidas têm apresentado menor número de casos de insensibilidade em relação ao grupo dos benzimidazóis. LaMondia and Douglas (1997), estudando a sensibilidade de *B. cinerea* aos fungicidas benzimidazóis (benomyl e tiofanato metílico) e dicarboxamidas (iprodiona) observaram que 70% dos isolados foram insensíveis aos benzimidazóis e cerca de 35% insensíveis à dicarboxamida, semelhante ao encontrado neste estudo.

Foi observado que muitos isolados apresentaram insensibilidade simultânea aos fungicidas iprodiona e procimidona, caracterizando o que se denomina de resistência cruzada, onde o surgimento de insensibilidade a um fungicida leva ao surgimento de insensibilidade a outro fungicida do mesmo grupo químico. Isto ocorre devido ao fato de os dois fungicidas possuírem o mesmo modo de ação, de forma que a insensibilidade do isolado a um fungicida do grupo pode levar facilmente à insensibilidade a outro fungicida do mesmo grupo (Zambolim et al., 2007).

Muitos isolados avaliados neste trabalho apresentaram insensibilidade simultânea aos fungicidas iprodiona e tiofanato-metílico ou procimidona e tiofanato metílico. Neste caso, trata-se de resistência múltipla, ou seja, o mesmo indivíduo (isolado) é insensível a dois fungicidas de diferentes modos de ação. Este tipo de comportamento já foi relatado para o fungo *B. cinerea* frente aos fungicidas benzimidazóis e dicarboxamidas (LaMondia & Douglas, 1997). Além disso, *B. cinerea*

pode apresentar insensibilidade a diversos fungicidas ao mesmo tempo, conforme verificado por Amiri et al. (2013) com isolados obtidos de morangueiros na Flórida-EUA. A insensibilidade simultânea de isolados de *B. cinerea* a até seis classes de fungicidas tem sido relatada, em diferentes regiões nos Estados Unidos (Fernandez-Ortuno et al., 2014).

O presente trabalho mostrou que o fungo *B. cinerea* é insensível aos três fungicidas mais utilizados para seu controle na cultura do morangueiro. Além disso, o problema de insensibilidade, detectado a campo pelos produtores por meio de falhas de controle, foi confirmado em nossas análises, mostrando que populações insensíveis de *B. cinerea* já estão bem estabelecidas no campo. Portanto, são necessárias medidas de conscientização dos produtores para o uso correto dos produtos, além do registro de novos fungicidas para o manejo da doença.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas AC, Mafia RG, eds, 2007. *Métodos em Fitopatologia*.

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

Brent K, 1999. Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como manejá-la. *Global corp protection federation*.

Brent KJ, Hollomon DW, Federation GCP, 1998. *Fungicide resistance: the assessment of risk*. Global Crop Protection Federation.

Bristow P, Mcnicol R, Williamson B, 1986. Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to grey mould development. *Annals of Applied Biology* **109**, 545-554.

Costa H, Zambolim L, Ventura JA, 2003. Manejo integrado das doenças do morangueiro. In: Zambolim L, ed. *Manejo integrado de pragas e doenças: fruteiras tropicais*. 131-164.

Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds, 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*.

Fernandez-Ortuno D, Grabke A, Bryson PK, Amiri A, Peres NA, Schnabel G, 2014. Fungicide Resistance Profiles in *Botrytis cinerea* from Southern State Strawberry Fields. *Plant disease*. First Look.

Lamondia J, Douglas S, 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant disease* **81**, 729-732.

Lennox CL, Spotts RA, 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* **87**, 645-649.

Leroux P, Fritz R, Debieu D, *et al.*, 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* **58**, 876-888.

Maas JL, 1998. *Compendium of strawberry diseases*. American Phytopathological Society (APS Press).

Mapa, 2014 . <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em janeiro de 2014.

Moorman G, Lease R, 1992. Benzimidazole-and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. *Plant disease* **76**, 477.

Myresiotis C, Karaoglanidis G, Tzavella-Klonari K, 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant disease* **91**, 407-413.

Rosslenbroich H-J, Stuebler D, 2000. *Botrytis cinerea* — history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* **19**, 557-561.

Samuel S, Veloukas T, Papavasileiou A, Karaoglanidis GS, 2012. Differences in frequency of transposable elements presence in *Botrytis cinerea* populations from several hosts in Greece. *Plant disease* **96**, 1286-1290.

Yoon CS, Yeoung YR, 2008. Survey of fungicide resistance for chemical control of *Botrytis cinerea* on Paprika. *The Plant Pathology Journal* **24**, 447-452.

Yourman L, Jeffers S, 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant disease* **83**, 569-575.

Zambolim L, Venâncio S, Oliveira S, 2007. Manejo da resistência de fungos a fungicidas. *Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora*, 168.

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Este é o primeiro relato da ocorrência de *Neofusicoccum kwambonambiense* no Brasil e o primeiro relato de *Neofusicoccum* spp. causando podridão em frutos de morangueiro.
- ✓ Os resultados mostraram que o comportamento de plantas com sintomas do vermelhão do morangueiro é semelhante ao de doenças de causa biótica que se dispersa no sentido da linha de plantio.
- ✓ Foi possível observar diversos problemas relacionados ao controle químico do mofo cinzento do morangueiro, destacando-se o uso reduzido de medidas de controle cultural, o uso de produtos não recomendados para a cultura e o baixo nível de conhecimento dos produtores.
- ✓ Apesar da variação morfológica observada entre os isolados obtidos de plantas com sintomas do mofo cinzento, todos foram identificados como *Botrytis cinerea*.
- ✓ Os resultados mostraram que 89% dos isolados de *B. cinerea* foram insensíveis ao fungicida tiofanato-metílico, 36% ao iprodiona e 54% ao procimidona.