

ANA ELISA SILVERA PÉREZ

**VARIABILIDADE DE *Botrytis cinerea* DE ROSEIRAS E DETECÇÃO
DA MUTAÇÃO ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS PELO
MÉTODO DE DISSOCIAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO**

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
2013

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

T

S587v
2013

Silvera Pérez, Ana Elisa, 1967-

Variabilidade de *Botrytis cinerea* de roseiras e detecção da
mutação associadas à resistência a fungicidas pelo método de
dissociação de alta resolução / Ana Elisa Silvera Pérez. – Viçosa,
MG, 2013.

vi, 58 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Mofo-cinzento. 2. Rosa - Doenças e pragas.
3. Fungicidas. 4. Epidemiologia. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.478

ANA ELISA SILVERA PÉREZ

**VARIABILIDADE DE *Botrytis cinerea* DE ROSEIRAS E DETECÇÃO
DA MUTAÇÃO ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS PELO
MÉTODO DE DISSOCIAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO**

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: 16 de julho de 2013.

Cleide Maria Ferreira Pinto

Rosa María Valdebenito-Sanhueza

Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Coorientador)

Sergio Herminio Brommonschenkel
(Coorientador)

Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça de sua presença em minha vida, ajudando-me a transitar os caminhos que vou percorrendo.

A meus pais, irmãos, cunhados, sobrinhos e a toda minha grande família, pelo carinho e apoio.

À Faculdade de Agronomia da Universidade da República do Uruguai pela liberação para realizar o Curso de Doutorado.

À Faculdade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade da realização do Curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Programa de Estudantes, Convênio de Pós-Graduação pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Luiz Antonio Maffia, pelo ensinamento, a orientação, correção da tese e oferecer as melhores condições para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Eduardo S. G. Mizubuti, pelo ensinamento, orientação, correção da tese e por disponibilizar a infraestrutura para a realização da parte molecular do trabalho.

Ao Prof. Sergio H. Brommonschenkel, pelo ensinamento, orientação, as correções e sugestão na tese e habilitar o serviço de sequenciamento.

À Dra. Rosa María Veldebenito-Sanhueza, pelo aceite na participação na banca, as correções e sugestões na tese, ter-me facilitado o caminho para o Doutorado.

À Dra. Cleide Maria F. Pinto pelo aceite na participação na banca, as correções e sugestões na tese.

Ao Prof. Cosme Da Cruz pela orientação e disponibilizar equipamentos para as análises estatísticas.

Aos Profs. José Rogério de Oliveira, Acelino Alfnas, Maria Catarina M. Kasuya, Fabrício De Ávila Rodrigues, Olinto L. Pereira, Francisco Murilo Zerbini Junior por disponibilizar equipamentos e materiais permanentes para a realização do trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFRV pela atenção, ensinamentos e auxílio prestado.

A Denizard A. S. Bueno, Vinicius C. Garnica e Isabel A. Neves, pelo compromisso e apoio que assumiram com o trabalho.

Ao Prof. Robson do Nascimento e Dr. Braz Junior pelos ensinamentos e apoio no trabalho.

Aos integrantes da Unidade de Controle Biológico e Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia da UFV em especial a Gilcianny, Marcos, Filipe, Wanderson, Álefe, Renata, Vinicius, pela colaboração no trabalho e companheirismo.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia de Populações do Departamento de Fitopatologia da UFV pelo companheirismo e apoio.

Aos meus colegas e amigos da Unidade de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia da Universidade da República, pelo apoio recebido que possibilitou concretizar meus estudos.

A comunidade da Paróquia de Fátima pela excelente acolhida e apoio.

As amigas e amigos brasileiros e uruguaios pela constante presença e apoio.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	4
CAPÍTULO I	
1. <i>Botrytis cinerea</i> : variabilidade quanto à agressividade em pétalas de rosas e à sensibilidade a fungicidas.....	10
1.1 Resumo	10
1.2 Introdução	11
1.3 Material e métodos	12
1.4 Resultados.....	15
1.5 Discussão	23
1.6 Agradecimentos	28
1.7 Referências	29
CAPÍTULO II	
2. Detecção de mutação associada à resistência a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida em isolados de <i>Botrytis cinerea</i> de rosa pela análise de dissociação de alta resolução	37
2.1 Resumo	37
2.2 Introdução	38
2.3 Material e métodos	40
2.4 Resultados.....	43
2.5 Discussão	48
2.6 Agradecimentos	51
2.7 Referências	51
CONCLUSÕES	58

RESUMO

SILVERA PÉREZ, Ana Elisa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Variabilidade de *Botrytis cinerea* de roseiras e detecção da mutação associadas à resistência a fungicidas pelo método de dissociação de alta resolução.** Orientador: Luiz Antonio Maffia. Coorientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Botrytis cinerea está amplamente distribuído no mundo e causa o mofo cinzento em várias culturas. Em roseiras, o manejo da doença baseia-se na aplicação intensiva de fungicidas. Em outros países, constatou-se haver alta variabilidade em populações de *B. cinerea*. Tal variabilidade pode comprometer a eficiência do controle químico. Porém, há escassez de estudos com populações brasileiras de *B. cinerea*. Assim, objetivou-se caracterizar isolados de *B. cinerea* obtidos de roseiras cultivadas em estufas de Barbacena - MG, em 2011 e 2012, e de Holambra - SP, em 2011, quanto à agressividade em pétalas de roseiras e à sensibilidade a fungicidas. Da região de Holambra também caracterizaram-se isolados de roseiras de lavouras conduzidas no campo, gérbera e lisianthus. Obtiveram-se 308 isolados (quatro de gérbera, seis de lisianthus e 298 de roseiras) os quais diferiram quanto à agressividade. Considerando-se espécies de flores, coloração das pétalas, tipo de sistema de produção e fungicidas, os isolados não se diferenciaram quanto ao diâmetro de lesão e à esporulação. Quanto à sensibilidade a fungicidas, os isolados foram resistentes a tiofanato metílico, e variaram de sensíveis a resistentes a iprodiona ($0,1 < CE_{50} < 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e boscalida ($0,001 < CE_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Não houve correlação entre os componentes de agressividade e a resistência as fungicidas. Considerando-se as variáveis analisadas, a população não foi estruturada por região. Caracterizou-se a mutação associada à resistência a fungicidas pela análise de dissociação em alta resolução (“high-resolution-melting”- HRM) em isolados coletados em Barbacena em 2012. Nas sequências parciais dos genes analisados, detectaram-se mutações em *BenA* (E198A), *BcOSI* (I365S/N, Q369P, N373S) e *SdhB* (H272Y/R), associadas à resistência a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida, respectivamente. Os resultados da HRM e das análises das sequências dos genes *BenA*, *BcOSI* e *SdhB* foram concordantes. Considera-se que a HRM seja ferramenta potencial para monitorar, no campo, a resistência de *B. cinerea* a fungicidas.

ABSTRACT

SILVERA PÉREZ, Ana Elisa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2013. **Variability of *Botrytis cinerea* from roses and detection of mutation associated with resistance to fungicides by the method of high-resolution-melting.** Advisor: Luiz Antonio Maffia. Co-advisors: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Botrytis cinerea is widely distributed throughout the world and causes the gray mold in several crops. In roses, the disease management is based on intensive application of fungicides. This application is not always effective, given the high variability of *B. cinerea*, particularly regarding sensitivity to fungicides. In Brazil, studies on the variability of the pathogen are demanded. Therefore we aimed at characterizing isolates of *B. cinerea* gotten from roses grown in greenhouses located in Barbacena - MG, in 2011 and 2012, and in Holambra - SP, in 2011, regarding aggressiveness on rose petals and sensitivity to fungicides. We obtained 308 isolates, which differed in aggressiveness. Considering the sensitivity to fungicides, the isolates were resistant to methyl thiophanate and varied from sensitive to resistant to iprodione ($0.1 < EC_{50} < 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and boscalid ($0.001 < EC_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). There was no correlation between the components of aggressiveness and the resistance to the fungicides. The population was not structured by region regarding the variables analyzed. High variability in aggressiveness and sensitivity to fungicides highlight the problem of chemical control of gray mold. We also attempted to characterize the mutation associated with resistance to fungicides and to detect it by the "high-resolution melting" (HRM) analysis in isolates collected in Barbacena in 2012. In the partial sequences of genes analyzed, mutations were detected in *BenA* (E198A), *BcOS1* (I365S/N, Q369P, N373S) and *SdhB* (H272Y/R) genes associated with resistance to methyl thiophanate, iprodione and boscalid, respectively. The results of HRM and analysis of sequences of *BenA*, *BcOS1* and *SdhB* were concordant. It is considered that the HRM is a potential tool for monitoring, in the field, the resistance of *B. cinerea* to fungicides.

INTRODUÇÃO GERAL

Botrytis cinerea Pers. ex Fr., anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, agente causal do mofo cinzento, encontra-se amplamente distribuída no mundo, e ocorre em várias espécies vegetais (Jarvis 1989). Em rosas, o patógeno causa principalmente lesões em pétalas que reduzem o rendimento e qualidade dos botões nas regiões produtoras (Volpin e Elad 1991, Tatagiba et al 1998). O fungo tem alta variabilidade genética, em decorrência do estado heterocariótico das hifas e conídios e da aneuploidia no núcleo, presença de elementos transponíveis, que se evidencia em diferenças fenotípicas entre e dentro de isolados. Estas diferenças afetam o tipo de crescimento, esporulação e a agressividade do fungo (Phillips et al 1987, McDonald 1993, Büttner et al 1994, Levis et al 1997, Chardonnet et al 2000). O manejo do mofo cinzento baseia-se na eliminação do tecido doente das plantas, alteração da temperatura e umidade relativa do ambiente, uso de agentes de biocontrole, produtos químicos e de fungicidas (Jarvis 1989, Hausbeck e Moorman 1996, Sutton et al 1997). A aplicação dos fungicidas sintéticos é a principal forma de controle do mofo cinzento (Wilson 1997). Nas regiões produtoras de roseiras realizam-se pulverizações preventivas a cada 7-10 dias, que resulta no uso excessivo dos fungicidas (Barbosa et al 2005). Inicialmente, aplicaram-se fungicidas multi-sítio de ação (ditiocarbamatos, ftalamidas) no controle químico do mofo cinzento. Nos anos 1960 e 1970, introduziram-se fungicidas sítio-específico, benzimidazóis (benomil e tiofanato metílico) e dicarboximidas (iprodisa e vinclozolina), mais eficientes no controle do mofo cinzento que os protetores, mas rapidamente detectou-se a ocorrência de resistência na população do patógeno. De meados dos anos 1990 à década passada, introduziram-se fungicidas dos grupos anilino-pirimidinas (ciprodinil, pyrimethanil, mepanipyrim), fenilpirroles (fludioxonil), hidroxianilidas (fenehexamida), inibidores da quinona externa (estrobirulinas), inibidores da enzima succinato desidrogenase (boscalida), mas também detectaram-se isolados resistentes (Brent e Hollomon 2007, Topolovec-Pintarić 2011). Assim, há relatos de resistência a iprodiona e tiabendazol (Lennox e Spotts 2003) bem como a boscalida e piraclostrobina (Kim e Xiao 2010).

A alta variabilidade de *B. cinerea* e a alta frequência de aplicação de fungicidas de sítio de ação específico podem ocasionar mudanças na sensibilidade da população do fungo a estes produtos (Elad 2004). Constatou-se resistência a benzimidazóis e dicarboximidas em populações de *B. cinerea* obtidas de plantas ornamentais sob cultivo

protegido (Ghini 1996, LaMondia e Douglas 1997, Yourman et al 2001); a anilino pirimidinas em vinhedos no Chile e em cultivos protegidas de pepino, feijão, tomate, abóbora, berinjela e pimenta na Espanha (Latorre et al 2002, Moyano et al 2004); a tebuconazole e fenexamida, em locais onde foram mal usados ou o foram em subdosagem (Elad 1992); a fenilpirrol, anilino pirimidina e hidroxianilida em vinhedos na Suécia (Baroffio et al 2004); resistência múltipla a tiofanato metílico, iprodiona, fenexamida, trifloxystrobina, boscalida, ciprodinil e fludioxonil (Weber 2011); e quádrupla a carbendazim, dietofencarbe, procimidona e pirimetanil, em tomate e pepino, em cultivos protegidos na China (Yin et al 2011).

Quando se busca associar a resistência à adaptabilidade, observaram-se isolados de *B. cinerea* resistentes a benzimidazóis e tão agressivos como os sensíveis (Moorman e Lease 1992, Raposo et al 1996, Yourman e Jeffers 1999, Zhang et al 2010). Há casos em que a perda de sensibilidade pode estar associada à redução na adaptabilidade, o que faz diminuir a frequência dos isolados resistentes (Damicone e Smith 2013). Isolados de *B. cinerea* resistentes e sensíveis as dicarboximidas tiveram adaptabilidade similar (Moorman e Lease 1992, Raposo et al 1996, Oshima et al 2006, Korolev et al 2011). Também já se observaram isolados de *B. cinerea* resistentes a dicarboximidas menos agressivos e estáveis que os sensíveis (Pommer e Lorenz 1982, Beever e Brien 1983, Leroux e Clerjeau 1985, Fraile et al 1986, Fourie e Holz 2002). Recentemente, detectaram-se isolados com múltipla resistência sem alteração na adaptabilidade. Isolados quádruplo-resistentes (pirimetanil, carbendazim, dietofenocarb e procimidona) não se diferenciaram dos sensíveis quanto ao crescimento micelial, produção de esporos, germinação de conídios, sensibilidade osmótica e na agressividade e esporulação em cotiledone de pepineiro (Sun et al 2010).

Em fungos fitopatogênicos, o mecanismo mais comum de resistência a fungicidas é a alteração bioquímica do sítio alvo do fungicida (Ma e Michailides 2005). Em *B. cinerea*, mutação nos genes *BenA*, *Cyp51*, *BcOS1*, *Erg27* e *SdhB* confere resistência a benzimidazóis, inibidores da demetilação do C14, dicarboximidas, hidroxianilidas e carboxamidas, respectivamente (Oshima et al 2002, Fournier et al 2005, Fillinger et al 2008, De Miccolis et al 2010, Zhang et al 2010). Outro mecanismo de resistência, que pode originar fenótipos com resistência múltipla, é a redução da penetração do fungicida com a super-expressão do transportador de cassete de ligação de ATP (ABC) e superfamília dos facilitadores majoritários (MFS) (Leroux 2002). Há relatos de diferentes regiões de resistência tripla e quádrupla que se associam ao mecanismo de resistência multi-droga (MDR) (Leroch et al 2011, Weber 2011, Yin et al

2011).

Comumente, avalia-se a sensibilidade de patógenos a fungicidas, medindo-se crescimento micelial em meio de cultura contendo os produtos. Além desta mensuração, é possível caracterizar a sensibilidade de *B. cinerea* a fungicidas usando métodos moleculares (Luck et al 1995, Oshima et al 2006). Com a alteração no gene que codifica a proteína que contém o sítio-alvo do fungicida, detectaram-se genótipos provenientes de diferentes hospedeiros e regiões resistentes a benzimidazóis e dicarboximidas. (Yardan e Katan 1993, Cui et al 2004, Banno et al 2008, Malandrakis et al 2010). Assim, com as técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR), *PCR-restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (Malandrakis et al 2011), *primer-introduced restriction analysis-PCR* (PIRA-PCR) (Luo et al 2009), PCR alelo-específico (Bardas et al 2010) e PCR alelo-específico em tempo real (RT-PCR) (Fraaije et al 2002), detectaram-se genótipos de diferentes fitopatógenos resistentes a fungicidas. Recentemente, aplicou-se a análise de dissociação em alta resolução (*high-resolution melting* - HRM) para detecção de patógenos humanos resistentes a fármacos (Ramirez et al 2010, Li et al 2012). A técnica é ainda pouco usada na fitopatologia, e se identificam formas especiais de *Fusarium oxysporum* pela análise das curvas de HRM baseada em sequências do ITS (Ganopoulos et al 2012), bem como detectaram-se isolados de *Colletotrichum magna* resistentes a tiofanato metílico, com a mutação E198A na sequência parcial do gene *BenA* (R.J do Nascimento, com. pers.). Acredita-se que a técnica tenha potencial de uso no monitoramento da resistência de *B. cinerea* a fungicidas.

No Brasil, como no restante do mundo, usam-se fungicidas intensivamente em lavouras. Excluindo-se o trabalho de Ghini (1996), pouco se conhece acerca da variabilidade de *B. cinerea* no Brasil, quanto à agressividade e à sensibilidade a fungicidas. Como este conhecimento é fundamental para auxiliar a definir estratégias de manejo do mofo cinzento, objetivou-se caracterizar isolados de *B. cinerea* coletados em 2011 e 2012, em roseiras cultivadas em estufas em Barbacena - MG e Holambra - SP, quanto à agressividade e à sensibilidade a fungicidas. Buscou-se, também, caracterizar a mutação no sítio alvo dos fungicidas, bem como otimizar e validar o método RT-PCR-HRM na detecção de mutação associada à resistência a fungicidas.

REFERÊNCIAS

- Banno, S., Fukumori, F., Ichiishi, A., Okada, K., Kimura, M., and Fujimura, M. 2008. Genotyping of benzimidazoles-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* 98:397-404.
- Barbosa, J. G., Grossi, J. A. S., Pivetta, K. F. L., Finger, F. L., e Santos, J. M. D. 2005. Cultivo de rosas. *Inf. Agropec. Floric.* 26:20-29.
- Baroffio, C. A., Siegfried, W., and Hilber, U. W. 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, and hydroxanilide fungicides in Switzerland. *Plant Dis.* 87:662-666.
- Beever, R. E., and Brien, H. M. R. 1983: A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. *New Zeal. J. Agr. Res.* 26: 391-400.
- Brent, K., and Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph N° 1. Online: <http://www.frac.info/frac/index.htm>.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B., and Tudzynski, P. 1994. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Curr. Genet.* 25:445-50.
- Chardonnet, C. O., Sams, C. E., Trigiano, R. N., and Conway, W. S. 2000. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology* 90:769-774.
- Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S. L., and Templeton, M. 2004. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. *Phytopathology* 94:1129-1135.
- Damicone, J., and Smith, D. Oklahoma cooperative extension. Fungicide resistance management. Online: <http://osufacts.okstate.edu>.

- De Miccolis, A. R. M., Habib, W., Rotolo, C., Pollastro, S., and Faretra, F. 2010. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. *Eu. J. Plant Pathol.* 128: 185-199.
- Elad, I., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N. *Botrytis: Biology, pathology and control*. 2004. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. The Netherlands. 428p.
- Elad, Y., and Volpin, H. 1988. The involvement of ethylene and calcium in gray mold of pelargonium, *Ruscus*, and rose plants. *Phytoparasitica* 16:119-132.
- Fillinger, S., Leroux, P., Auclair, C., Barreau, C., Al Hajj, C., and Debieu, D. 2008. Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Anti. Agents Chemo.* 52: 3933-3940.
- Fourie, P. R., and Rolz, G. 2003. Fitness on grape berries of *Botrytis cinerea* isolates belonging to different dicarboximide sensitivity classes. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 24:1-10.
- Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C., and Brygoo, Y. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97:1251-1267.
- Fraaijea, B. A., Buttersb, J. A., Coelhoa, J. M., Jonesc, D. R., and Hollomonb, D. W. 2002. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol.* 51:45-54.
- Fraile, A., Alonso, A., and Sagasta, E. M. 1986. Some characteristics of *Botrytis cinerea* isolates tolerant to procymidone. *Plant Pathol.* 35:82-85.
- Ganopoulos, I., Madesis, P., Zambounis, A., and Tsaftaris, A. 2012. High-resolution melting analysis allowed fast and accurate closed-tube genotyping of *Fusarium oxysporum* formae speciales complex. *FEMS Microbiol. Lett.* 334:6-21.
- Ghini, R. E. 1996. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no estado de São Paulo. *Fitopatol. Bras.* 21:285-288.

Hausbeck, M. K., and Moorman, G. W. 1996. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. *Plant Dis.* 80:1212-1219.

Jarvis, W. R. 1989. Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Dis.* 73:190-194.

Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cinerea* from stored apples in Washington State. *Plant Dis.* 94:604-612.

Korolev, N., Mamiev, M., Zahavi, T., and Elad, Y. 2011. Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. *Eur. J. Plant Pathol.* 129:591-608.

LaMondia, J. A, and Douglas, S. M. 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 81:729-732.

Latorre, B. A., Spadaro, I., and Riojas, M. E. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Prot.* 21:957-961.

Lennox, C. L., and Spotts, R. A. 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 87:645-649.

Leroch, M., Kretschmer, M., and Hahn, M. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in south west Germany. *J. Phytopathol.* 159:63-65.

Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* 58:876-888.

Leroux, P., and Clerjeau, M. 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. and de Toni to fungicides in French vineyards. *Crop Prot.*

4:137-160.

Levis, C., Fortini, D., and Brygoo, Y. 1997. Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Mol. Gen. Genet.* 254:674-680.

Li, W., Matsuoka, M., Kai, M., Thapa, P., Khadge, S., Hagge, D. A., Brennan, P. J., and Vissa, V. 2012. Real-time PCR and high-resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. *J. Clin. Microbiol.* 50:742-753.

Luck, J. E., and Gillings, M. R. 1995. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycol. Res.* 99:1483-1488.

Luo, Q. Q., Xu, J. Q., Hou, Y. P., Chen, C. J., Wang, J. X., Zhou, and M. G. 2009. PIRA-PCR for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with moderate resistance to carbendazim. *Plant Pathol.* 58:882-887.

Malandrakis, A. A., Markoglou, A. N., and Ziogas, B. N. 2011. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *Botrytis cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. *Pest Biochem. Physiol.* 99:118-124.

McDonald, J. 1993. Evolution and consequences of transposable elements. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:855-864.

Moorman, G. W., and Lease, R. J. 1992. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. *Plant Dis.* 76:477-480.

Moyano, C., Gómez, V., and Melgarejo, P. 2004. Resistance to pirimetanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *J. Phytopathol.* 152:484-490.

Oshima, M., Fujimura, M., Banno, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A., and Yamaguchi, I. 2002. A point mutation in the two-component histidine kinase *BcOSI* gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*.

Phytopathology 92:75-80.

Oshima, M., Banno, S., Okada, K., Takeuchi, T., Kimura, M., Ichiishi, A., Yamaguchi, I., and Fujimura, M. 2006. Survey of mutations of a histidine kinase gene *BcOS1* in dicarboximide resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Plant Pathol. 72:65-73.

Phillips, D. J., Margosan, D. A., and MacKey, B. E. 1987. Size, nuclear number and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. Phytopathology 77:1606-1608.

Pommer, E.-H., and Lorenz, G. 1982. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides - a literature review. Crop Prot. 1:221-230.

Ramirez, M. V., Cowart, K. C., Campbell, P. J., Morlock, G. P., Sikes, D., Winchell, J. M., and Posey, J. E. 2010. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. J. Clin. Microbiol. 48:4003-4009.

Raposo, R., Delcán, J., Gomez, V., and Melgarejo, P. 1996. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. Plant Pathol. 45: 497-505.

Sun, H.-Y., Wang, H.-C., Chen, Y., Li, H.-X., Chen, C.-J., and Zhou, M.-G. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. Plant Dis. 94:551-556.

Sutton, J.C., Li, D., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., and Valdebenito-Sanhueza, R.M. 1997. A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. Plant Dis. 81:316-328.

Topolovec-Pintarić, S. 2011. Resistance to Botryticides. Pages 19-42 in: Fungicides - beneficial and harmful aspects. N. Thajuddin eds. InTech, Online: <http://www.intechopen.com/books/fungicides-beneficial-and-harmful-aspects/resistance-to-botryticides>

Volpin, H., and Elad, Y. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose

flowers to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 81:1390-1394.

Weber, R. W. S. 2011. Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in Northern German small-fruit production. *Plant Dis.* 95:1263-1269.

Wilson, M. 1997. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:188-191.

Yarden, O., and Katan, T. 1993. Mutation leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83:1478-1483.

Yin, Y. N., Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101:986-995.

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

Yourman, L. F. Jeffers, S. N, and Dean, R. A. 2001. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* 91:307-315.

Zhang, C. Q., Liu, Y. U., and Zhu, G. N. 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. *Eur. J. Plant Pathol.* 126:509–515.

1. *Botrytis cinerea*: variabilidade quanto à agressividade em pétalas de rosas e à sensibilidade a fungicidas.

1.1 Resumo

Botrytis cinerea causa o mofo cinzento, doença destrutiva em plantas ornamentais, hortaliças e fruteiras no mundo. Em roseiras, as perdas podem atingir 80%. O fungo tem alta variabilidade, inclusive quanto à sensibilidade a fungicidas. Considerando a escassez de estudos sobre a diversidade fenotípica de *B. cinerea* no Brasil, objetivou-se caracterizar isolados obtidos de roseiras cultivadas nas localidades de Barbacena - MG, em 2011 e 2012, e Holambra - SP, em 2011, quanto à agressividade e à sensibilidade a fungicidas. Caracterizaram-se também isolados de gérbera e lisianthus da região de Holambra. Obtiveram-se 308 isolados (quatro de gérbera, seis de lisianthus e 298 de roseiras), os quais diferiram quanto à agressividade. Porém, não se identificaram grupos de isolados segundo espécies de flores, cor de pétala, sistema de produção e resistência a fungicida quando se analisaram as variáveis diâmetro de lesão e esporulação. Avaliou-se a sensibilidade dos isolados a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida com o método de microplacas. Os indivíduos das três populações foram resistentes a tiofanato metílico, mas variaram de sensível a resistente a iprodiona ($0,1 < CE_{50} < 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e boscalida ($0,001 < CE_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Não se observou correlação entre as variáveis de agressividade e as de resistência a fungicidas. Considerando-se as variáveis fenotípicas, não houve agrupamento dos isolados segundo localidade e ano. Em vista da variação na agressividade e na resistência a fungicidas na população do patógeno, evidencia-se a problemática do controle químico do mofo cinzento com ingredientes ativos sitio-específico e a necessidade de adoção de medidas de manejo anti-resistência nas lavouras de roseiras.

1.2 Introdução

O fungo *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) infecta mais de 200 espécies vegetais e causa o mofo cinzento, doença de ocorrência frequente em várias regiões do mundo (Elad 2004). O patógeno é importante na maioria das regiões produtoras de rosas (*Rosa hybrida*). Há diferenças entre variedades de rosas quanto à resistência ao mofo cinzento. As cvs. Sonya, Madelon e Medoly foram mais suscetíveis que 'Caramboie', 'Gabriella', 'Pasadena' e 'Rubinette' (Pie e Brower 1993). Em outro trabalho, 'Golden Celebration' e 'Katharina Zeimet' foram altamente suscetíveis, enquanto 'English Sacht', 'Eterna', 'San Francisco' e 'Maxim', menos suscetíveis (Friedman et al 2010). Populações de *B. cinerea* geralmente apresentam alta variabilidade, evidenciada em diferenças na morfologia de colônia, crescimento de micélio, intensidade de esporulação, sensibilidade a fungicida, quantidade e qualidade de produção de enzimas relacionadas à invasão do tecido hospedeiro, patogenicidade ou desenvolvimento do fungo (Yourman et al 2001, Martinez et al 2003, Valiuskaite et al 2010, González-Fernández et al 2013) e na agressividade (Chardonnet et al 2000). A variabilidade do patógeno decorre da presença de conídios e hifas heterocarióticas, aneuploidia no núcleo (Büttner et al 1994, Chardonnet et al 2000) da ocorrência de mutações (Chardonnet et al 2000), e da presença de fatores citoplasmáticos como os elementos transponíveis (Diolez et al 1995, Levis et al 1997) ou vírus de dupla fita de RNA (Castro et al 2003, Wu et al 2007).

A alta variabilidade de *B. cinerea*, associada à alta intensidade do controle químico, pode levar à perda da sensibilidade a fungicidas (Elad 2004). Vários fungicidas adotados no controle, como benzimidazóis, dicarboximidas, anilino-pirimidinas, fenilpirroles, estrobilurinas e carboxamidas (Leroux 2004), têm sítios específicos de ação, e rapidamente pode haver seleção de indivíduos com mutação no sítio-alvo. Portanto, estes fungicidas são classificados como de alto risco de resistência (Brent e Hollomon 2007). A resistência aos benzimidazóis e dicarboximidas é amplamente relatada em diferentes culturas e regiões (Ghini 1996, La Mondina e Douglas 1997, Yourman et al 2001, Moyano et al 2004, Leroch et al 2011, Korolev et al 2011, Weber 2011, Gepp et al 2012). Já se constatou, também, a resistência a anilino-pirimidinas (Topolovec-Pintaric 2009, Zhang et al 2009, Korolev et al 2011), carboxamidas (Bardas et al 2010, Yin et al 2011) e estrobilurinas (Jiang et al 2009, Bardas et al 2010).

A evolução da resistência a fungicidas na população do patógeno depende da

adaptabilidade da fração resistente; isolados insensíveis podem ser tão adaptados quanto os sensíveis e podem persistir na população após a retirada do fungicida. Em lavouras não tratadas com benzimidazóis por 34 anos, detectaram-se 40% de isolados resistentes a tiofanato metílico (Weber 2011). A perda de sensibilidade também pode estar ligada à redução na adaptabilidade, com redução da frequência dos isolados resistentes (Damicone e Smith 2013). Para dicarboximidas, relatou-se associação negativa da resistência a componentes de adaptabilidade (Pommer e Lorenz 1982, Beever e Brien 1983, Leroux e Clerjeau 1985, Fraile et al 1986, Fourie e Holz 2003). Entretanto, há resultados contraditórios, em que a perda de sensibilidade não representou um custo na adaptabilidade (Raposo et al 1996, Oshima et al 2006, Korolev et al 2011). Isolados resistentes a piraclostrobina e boscalida foram similares aos sensíveis quanto à agressividade em maçãs, e a resistência foi estável na ausência de ambos os fungicidas (Kim e Xiao 2011). Isolados com resistência quádrupla foram similares aos sensíveis quanto à agressividade, esporulação, taxa de crescimento micelial, germinação de conídios e sensibilidade osmótica (Sun et al 2010).

A variabilidade na agressividade e na sensibilidade a fungicidas, fundamental para o manejo de doenças, é pouco conhecida na população de *B. cinerea* no Brasil. Portanto, neste trabalho objetivou-se caracterizar isolados de *B. cinerea* de roseiras quanto aos componentes de agressividade e quanto à sensibilidade a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida.

1.3 Material e métodos

1.3.1 Amostragem e isolamento de *Botrytis cinerea*

Coletaram-se botões de rosas com sintomatologia do mofo cinzento, na localidade de Alfredo Vasconcelos, Barbacena - MG, em 2011 e 2012, e em Holambra - SP, em 2011. As amostras de Barbacena provieram de casa vegetação, as de Holambra também incluíram lavouras a campo. Coletaram-se flores de outras espécies com sintomas da doença para a comparação entre isolados.

Nas propriedades amostradas, o manejo da doença baseia-se, predominantemente, em pulverizações preventivas a cada 7 e 10 dias. Em uma propriedade, registrou-se o uso de formulado comercial de *Clonostachys rosea* associado ao fungicida. Para complementar realiza-se a alteração da temperatura e umidade relativa do ambiente das estufas. Registraram-se os fungicidas utilizados no

controle da doença nos locais amostrados (Tabela 1).

A partir das amostras com esporulação do patógeno ou após mantidas em câmara úmida por 48h a 20°C e 12h de fotoperíodo, visualizaram-se os conídios sob lupa estereoscópica (Leica Zoom 2000). Coletaram-se os conídios com agulha de dissecação e, para cada amostra, preparou-se uma suspensão de 10^4 conídios.mL⁻¹ em água destilada esterilizada (ADE) e Tween 80 (0,01%). Colocaram-se 20µL da suspensão mediante estria em placa com ágar-água com 0,02 % cloranfenicol, incubando-se a 20°C no escuro por 24h. Transferiu-se um conídio germinado para meio de batata dextrose ágar (BDA) em placa e incubou-se por 5 dias a 20°C e 12h de fotoperíodo. De cada amostra, obteve-se um isolado monospórico e preservou-se em ADE a 5°C e em tiras de papel filtro esterilizado a 20°C (Figueiredo e Pimentel 1975, Morales 2008).

Tabela 1. Fungicidas utilizados no controle do mofo cinzento em Holambra - SP e Barbacena - MG.

Região	Propriedades	Fungicidas
Holambra	Geraldo	Iprodiona e Kamoi ^a
	Van Skaik	-
Barbacena	Adriano, Tropical	Tiofanato metílico
	Shangri-lá	Propinebe, Procimidona, Mancozebe, Clorotalonil, Piraclostrobina, Enxofre e Difenconazol
	Candeias	Tiofanato metílico
	São Sebastião	Tiofanato metílico e Captan
	São Sebastião	Diclorana, Procimidona, Captan
	Sagrado Coração	Captan com Cálcio

^a Formulado comercial à base de *Clonostachys rosea*

1.3.2 Variabilidade de *Botrytis cinerea* quanto à agressividade

Semanalmente, avaliou-se a agressividade de 28 a 30 isolados, durante 165 dias, por meio da inoculação em pétalas de roseira 'Chá' provenientes de floricultura. Colocaram-se 20 discos de pétalas de 14mm de diâmetro em caixa gerbox com papel-toalha umedecido com ADE. No meio de cada disco, colocou-se uma gota de 10µl de suspensão de 10^4 conídios.mL⁻¹ ou ADE com Tween 80 (0,01%). Colocaram-se os discos de pétalas em câmara de crescimento a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com 12h de fotoperíodo. Avaliou-se o período de incubação das 8 às 48h da inoculação. Completado o período, mediram-se dois diâmetros perpendiculares da lesão em cada disco, com um paquímetro

digital (Zaas Precision), e calculou-se o valor médio. Após 4 dias de incubação, colocaram-se cinco discos de pétalas com esporulação em um tubo com 5mL de álcool 50% e homogenizou-se no vortex por 5s. Colocaram-se alíquotas da suspensão de conídios na câmara de Neubauer e determinou-se a esporulação, dada pelo número de conídios.mL⁻¹. Todos os 308 isolados foram avaliados e o experimento foi conduzido por duas vezes, cada uma em delineamento inteiramente casualizado e três repetições (uma unidade experimental = cinco discos). Foram necessários avaliar 22 conjuntos de (28 a 30) isolados. Em cada execução, incluiu-se um isolado obtido em Barbacena de 2011 como controle interno.

1.3.3 Variabilidade de *Botrytis cinerea* quanto à sensibilidade a fungicidas

Avaliaram-se os fungicidas tiofanato metílico (Cercobin 700) (Iharabras S.A), iprodiona (Rovral 500) (Bayer CropScience Ltda) e boscalida (Cantus 500) (BASF S.A.). Prepararam-se as soluções-estoque e as diluições seriadas, para tiofanato metílico e iprodiona, em dimetil sulfóxido (DMSO) (Kretschmer et al 2009) e, para boscalida, em água deionizada (Stammler e Speakman 2006). Mantiveram-se suspensões com 2×10^4 conídios.mL⁻¹, a 20°C, em meio de extrato de malte (Kretschmer et al 2009) ou extrato de levedura bacto peptona e acetato de sódio (Stammler e Speakman 2006) por 1h antes de serem incorporados aos fungicidas. Microplacas tipo ELISA, com suspensão de 10^3 conídios.mL⁻¹ de cada isolado, meio de cultura e concentrações crescentes de tiofanato metílico (0; 0,02; 0,2; 0,5; 1,5; 5; 20; 100 e 500µg.mL⁻¹), iprodiona (0; 0,002; 0,02; 0,2; 0,5; 1,5; 5; 10 e 20µg.mL⁻¹) ou boscalida (0; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100µg.mL⁻¹), foram mantidas a 20°C, por 48h, para tiofanato metílico e iprodiona (Kretschmer et al 2009), e 120h, para boscalida (Stammler e Speakman 2006). Este método é recomendado pelo Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) para o estudo da sensibilidade do patógeno a boscalida, fenexamida, ciprodinil e fludioxonil (FRAC 2013). Outros autores adotaram o teste da microplaca para os fungicidas benzimidazóis e dicarboximidas (Raposo et al 1995, Kretschmer et al 2009). Determinou-se a absorbância em leitor de ELISA Multiskan FC Thermo (Version 2,5), com filtro de 405nm. Para iprodiona, classificou-se cada isolado como sensível ($CE_{50} \leq 1\mu\text{g.mL}^{-1}$) e resistente ($CE_{50} > 1\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Raposo et al 1996). Para a classificação de boscalida, seguiu-se a recomendação de Leroux et al (2010).

Por fungicida, executou-se o experimento por duas vezes, cada uma em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições (uma unidade experimental

= um poço da placa de Elisa).

1.3.4 Análise de dados

Submeteram-se os dados das variáveis de agressividade (período de incubação, diâmetro de lesão e esporulação) à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Scott-Knott ($\alpha=0,05$). Para comparação de isolados, definiram-se cinco contrastes: gérbera e lisianthus versus roseiras, estufa versus campo, rosas com pétalas claras versus com pétalas escuras, isolados sensíveis versus resistentes a iprodiona, e isolados sensíveis versus resistentes a boscalida. Analisou-se a dispersão gráfica das variáveis período de incubação, diâmetro de lesão e esporulação de cada região. Efetuou-se a análise discriminante de Anderson para as variáveis de agressividade e hierarquizada por região ou por anos para Barbacena (Anderson 1958). Calculou-se a distância generalizada de Mahalanobis (D^2). Realizou-se a análise de trilha entre as variáveis de agressividade e os valores médios das CE_{50} de iprodiona e boscalida dos isolados sensíveis e resistentes. Realizaram-se as análises no programa Genes, versão 2006 (Cruz 2006). No programa SAS v9.1, estudaram-se os contrastes de médias e estimou-se a concentração efetiva de cada fungicida capaz de inibir 50% do crescimento do patógeno (CE_{50}), por meio de regressão linear da inibição de crescimento micelial em função do log da concentração dos produtos.

1.4 Resultados

1.4.1 Amostragem e isolamento de *Botrytis cinerea*

Obtiveram-se 308 isolados monospóricos das amostras de roseiras, 222 da região de Barbacena, 103 em 2011 e 119 em 2012, e 86 de Holambra (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados de *Botrytis cinerea* coletados na região de Barbacena - MG, em 2011 e 2012, e na região de Holambra - SP, em 2011.

Região / Ano	Coordenadas geográficas		Variedade	Isolado	Coordenadas geográficas		Variedade	solado
Barbacena / 2011	21° 13' 32"S	43° 53' 18"O	Rosa	01 - 10	21° 18' 05"S	43° 51' 45"O	Rafaela	41 - 55
	21° 13' 27"S	43° 53' 02"O	Amarela	16 - 25	21° 18' 05"S	43° 51' 45"O	Ana	56 - 60
	21° 18' 05"S	43° 51' 45"O	Nicoli	26 - 40	21° 24' 30"S	43° 56' 25"O	Ana	61 - 103
Barbacena / 2012	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Amarela	90, 91, 93	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Osiana	18, 19, 53, 54
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Avalanche	104 - 106	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Red	11 - 13
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Bibby	01, 26, 27	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Pink	43 - 46, 107, 108
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Burdin	86 - 88	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Polar	94 - 97
	21° 17' 21"S	43° 51' 29"O	Carola	08	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Ravel	23 - 25
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O		09, 10, 37 - 39, 72 - 74, 112, 113, 120 - 124	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Samurai	75 - 77
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Chá	109 - 111	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Sandra	62 - 64, 117, 119
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Coffee Break	83 - 85	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Sky Line	50 - 52
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Free	47 - 49	21° 18' 10"S	43° 51' 39"O	Tinic	02
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Grand Gala	14 - 16, 66 - 68	21° 17' 32"S	43° 51' 27"O		03
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Greta	20 - 22, 34 - 36, 101 - 103	21° 17' 30"S	43° 51' 29"O		04
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Hollywood	98 - 100	21° 17' 23"S	43° 51' 32"O		05
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Konfetti	56 - 58	21° 17' 29"S	43° 51' 27"O		06
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Laranja	30, 31	21° 17' 26"S	43° 51' 29"O		07
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Love Head	114 - 116	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O		32, 33, 78, 79, 89, 92
Holambra / 2011	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Miracle	28, 29	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Vânia	80 - 82
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Morgana	69 - 71	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Vegha	40 - 42
	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Nicole	17	21° 17' 40"S	43° 51' 49"O	Versilia	59, 61
	22° 39' 30"S	47° 40' 08"O	Gérbera	01 - 04	22° 48' 09"S	47° 09' 19"O	Rosa	15 - 20, 22, 24 - 30, 33 - 36, 39, 41 - 44
	22° 51' 34"S	47° 41' 03"O	Lisianthus	06 - 11	22° 47' 24"S	47° 06' 07"O		45, 47 - 59, 62 - 66, 68 - 83, 85 - 90, 92 - 104

1.4.2 Variabilidade de *Botrytis cinerea* quanto à agressividade

Houve homogeneidade entre as variâncias dos erros das duas execuções experimentais para cada componente de agressividade, para os isolados obtidos nos dois locais. Portanto, apresentar-se-ão os dados médios obtidos nas duas execuções experimentais.

Considerando-se os anos e locais de amostragem, obtiveram-se grupos de isolados de *B. cinerea* em termos de período de incubação, diâmetro de lesão e esporulação (Tabelas 3, 4 e 5). O período de incubação variou de 25 a 46h, o diâmetro de lesão de 4 a 13mm e a esporulação de 0 a 10^7 conídios.mL⁻¹. Em geral, os coeficientes de variação associados ao período de incubação e ao diâmetro de lesões foram menores (entre 10 e 15) que os associados ao número de conídios (entre 40 e 44).

Obtiveram-se diferenças significativas entre contrastes de médias associadas apenas aos isolados de Holambra e ao período de incubação, que foi maior ($P=0,0002$) para os isolados de pétalas claras (34h) que para os de pétalas escuras (31,5h) e também maior ($P=0,001$) para os isolados obtidos de roseiras de campo (34,6h) que para isolados de roseiras de estufa (32h). Nas demais comparações, inclusive para os isolados de Barbacena, não se obtiveram diferenças significativas.

Obtiveram-se coeficientes de correlação negativos e significativos entre período de incubação e diâmetro de lesão para os isolados de Barbacena-2011 (-0,20; $P=0,048$) e 2012 (-0,56; $P<0,001$) e os de Holambra-2011 (-0,49; $P<0,001$). Quanto ao período de incubação e esporulação, obteve-se correlação negativa para os isolados de Barbacena-2011 (-0,25; $P=0,018$) e 2012 (-0,21; $P=0,019$). Obteve-se correlação significativa (0,27; $P<0,006$) da esporulação e diâmetro de lesão para os isolados de Barbacena-2011.

Com as funções discriminantes, obtiveram-se taxas de erro de 33% na classificação entre as duas regiões e de 26% entre os dois anos em Barbacena. Classificaram-se de forma incorreta 29% dos isolados de Holambra-2011 e 36% dos isolados de Barbacena-2011. Dos isolados de Barbacena-2011, 34,5% não foram congruentes na classificação e, dos de Barbacena-2012, 19% não o foram. A D^2 foi de 0,85 para as análises entre regiões e de 0,98 para as análises entre anos.

Tabela 3. Isolados de *Botrytis cinerea*, coletados na região de Barbacena-MG em 2011, agrupados (teste de Scott & Knott, $\alpha=0,05$) segundo o período de incubação, diâmetro de lesão do mofo cinzento e esporulação em pétalas de roseira. O experimento foi executado por duas vezes, cada uma com 103 isolados.

Período de incubação (h)		Diâmetro de lesão (mm)		Esporulação (conídios x 10 ⁶ .mL ⁻¹)	
Grupo/ Amplitude	Isolados	Grupo/ Amplitude	Isolados	Grupo/ Amplitude	Isolados
A	04, 19, 20-22, 24, 30, 32, 33, 37, 52,	A	03, 09, 18, 23, 25, 27, 31, 38, 45, 46, 55,	A	28
39,6-44,0	70, 76, 77, 79, 88, 94, 95, 97	11,1-9,2	72, 73, 84, 89, 99, 100, 103	1,7	
B	07, 09, 13, 14, 17, 23, 25-27, 31, 34,	B	05, 07, 08, 22, 26, 37, 48, 51, 53, 54, 64,	B	14, 15, 39, 81
36,4,-39,4	35, 42, 43, 47-50, 54, 56-59, 61-65, 68,	7,8-9,1	66-68, 85-88, 90, 92, 94, 97, 98, 101, 102	1,2-1,3	
	71, 74, 78, 85, 87, 91-93,98				
C	03, 10-12, 16, 18, 29, 36, 38, 44-46, 51,	C	02, 04, 06, 10-12, 15, 16, 19, 21, 24, 28,	C	09, 11, 21, 98
33,4-36,1	53, 55, 60, 67, 69, 72, 73, 75, 80, 84,	6,3-7,7	29, 32-34, 36, 39, 40, 42, 44, 47, 52, 57,	1,0-1,1	
	89, 90, 99, 101-103		58, 60, 62, 70, 75-83, 91, 93, 96		
D	01, 02, 05, 06, 08, 15, 28, 39, 40,	D	01, 13, 14, 17, 20, 30, 35, 41, 43, 49, 50,	D	02, 03, 05-07, 16, 18, 19, 22, 23-25, 27,
27,8-33,0	41,66, 81-83, 86, 96, 100	4,4-6,2	56, 59, 61, 63, 65, 69, 71, 74, 95	0,6-0,9	31, 40, 44, 46-48, 52, 55, 58, 65, 66, 68,
					70, 72, 75, 76, 78, 82-86, 89-91, 94,
					101-103
				E	02, 03, 05-07, 16, 18, 19, 22, 23-25, 27,
				0,3-0,5	31, 40, 44, 46-48, 52, 55, 58, 65, 66, 68,
					70, 72, 75, 76, 78, 82-86, 89-91, 94,
					101-103
				F	01, 10, 12, 13, 17, 20, 35, 38, 41-43, 49,
				0-0,2	56, 60, 62, 63, 67, 69, 73, 74, 79, 92, 95,
					96, 100

Tabela 4. Isolados de *Botrytis cinerea*, coletados na região de Barbacena-MG em 2012, agrupados (teste de Scott & Knott, $\alpha=0,05$) segundo o período de incubação, diâmetro de lesão do mofo cinzento e esporulação em pétalas de roseira. O experimento foi executado por duas vezes, cada uma com 119 isolados.

Período de incubação (h)		Diâmetro de lesão (mm)		Esporulação (conídios x 10 ⁶ .mL ⁻¹)	
Grupo/ Amplitude	Isolados	Grupo/ Amplitude	Isolados	Grupo/ Amplitude	Isolados
A 32,7-39,5	05, 07-10, 13-15, 17-20, 22, 23, 27, 32, 33, 40, 44, 46-51, 56, 57, 59, 61, 63, 68, 70, 71, 73, 77, 78, 81, 83, 88, 94, 98, 100, 105, 106, 110, 112, 113, 116, 118, 120, 122, 123	A 9,36-11,13	10, 19, 24, 27-30, 34, 37, 38, 49, 51, 52, 69, 75, 82, 93, 95, 97, 109	A 1,2-1,4	34, 48, 87, 88, 99, 115, 118
B 25,2-32,5	01-04, 06, 11, 12, 16, 21, 24-26, 28-31, 34-39, 41-43, 45, 52-54, 58, 62, 66, 67, 69, 75, 76, 79, 80, 82, 84-87, 89-93, 95-99, 101-104, 107-109, 111, 114, 115, 117, 119, 121, 124	B 8,1-9,2,	01, 02, 05, 11, 15, 18, 21, 23, 31, 33, 35, 36, 40, 46, 54, 57, 59, 61-63, 67, 76, 80, 84, 85, 90, 91, 101, 103, 107, 108, 110, 112, 119	B 1,0-1,1	14, 21, 26-28, 36, 38, 45, 76, 91, 119, 122, 124
		C 6,9-7,9	03, 04, 07, 17, 20, 22, 25, 26, 32, 41, 43-45, 47, 50, 53, 63, 66, 70, 73, 79, 81, 83, 86-88, 92, 96, 99, 100, 102, 104-106, 115, 116, 121-124	C 0,7-0,9	01-03, 06, 08, 11, 16, 18, 19, 20, 30, 35, 41, 43, 44, 49, 50, 53, 54, 58, 63, 66-71, 75, 78-80, 83, 92, 93, 95-97, 100, 103, 105, 110, 112, 116, 117, 120, 121
		D 5,0-6,7	06, 08, 09,12-14, 16, 39, 42, 48, 56, 58, 68, 71, 77, 78, 89, 94, 98, 111, 113, 114, 117, 118, 120	D 0,5-0,6	04, 07, 15, 17, 22, 23, 25, 29, 31, 32, 39, 40, 42, 47, 51, 52, 56, 57, 59, 62, 63, 73, 77, 82, 85, 86, 94, 98, 104, 106, 109, 113, 114
				E 0,1-0,4	05, 09, 10, 12, 13, 24, 33, 37, 46, 61, 81, 84, 89, 90, 101, 102, 107, 108, 111, 123

Tabela 5. Isolados de *Botrytis cinerea*, coletados na região de Holambra-SP em 2011, agrupados (teste de Scott & Knott, $\alpha=0,05$) segundo o período de incubação, diâmetro de lesão do mofo cinzento e esporulação em pétalas de roseira. O experimento foi executado por duas vezes, cada uma com 85 isolados.

Período de incubação (h)		Diâmetro de lesão (mm)		Esporulação (conídios x 10 ⁶ .mL ⁻¹)	
Grupo/ Amplitude	Isolados	Grupo/ Amplitude	Isolados	Grupo/ Amplitude	Isolados
A 32,2-38,5	02-04, 06-08, 10, 11, 16, 18, 20, 22, 24-31, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 51, 52, 54, 56-59, 63, 65, 66, 69, 70, 72, 74-77, 79-81, 92, 93, 96	A 9,1-11,1	16, 31, 47, 52, 53, 64, 88, 92, 104	A 1,0-1,4	01, 03, 04, 35, 38, 39, 47, 49, 58, 59, 62, 66, 69, 73, 81, 82, 86-88, 98, 99
B 29,1-31,8	01, 09, 34, 42, 44, 47, 50, 53, 55, 62, 64, 68, 71, 73, 83, 85, 88-90, 94, 98-101, 103	B 7,4-8,79	01, 07, 22, 24, 25, 28, 30, 34, 35, 42, 44, 50, 51, 55, 57, 58, 62, 65, 72, 73, 74, 76, 77, 80, 82, 86, 87, 95, 97, 98, 100, 101, 102	B 0,7-0,9	16, 20, 22, 24, 25, 28, 29, 41, 43, 51, 52, 57, 63, 68, 71, 74, 85, 92, 101, 104
C 24,7-28,3	82, 86, 94, 95, 97, 102, 104	C 4,9-7,2	02-04, 06, 08-11, 18, 20, 26, 27, 29, 33, 36, 38, 39, 41, 43, 45, 48, 49, 54, 56, 59, 63, 66, 68, 69, 70, 71, 75, 79, 81, 83, 85, 89, 90, 93, 94, 96, 99, 103	C 0,35-0,6	06, 07, 10, 11, 18, 30, 31, 42, 45, 48, 50, 53, 54, 56, 64, 65, 70, 72, 75, 76, 77, 79, 83, 90, 93-95, 100, 102, 103
				D 0,005-0,3	02, 08, 09, 26, 27, 33, 34, 36, 44, 55, 80, 89, 96, 97

1.4.3 Variabilidade de *Botrytis cinerea* quanto à sensibilidade a fungicidas

Os 308 isolados das três populações foram insensíveis a tiofanato metílico, e houve crescimento micelial mesmo a $500\mu\text{g.mL}^{-1}$. Por outro lado, os isolados diferiram quanto à sensibilidade a iprodiona e boscalida.

Para iprodiona, avaliaram-se 295 isolados. Dos 98 de Barbacena-2011, 86,7% foram sensíveis ($\text{CE}_{50} < 1\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 13% resistentes ($\text{CE}_{50} > 1\mu\text{g.mL}^{-1}$). Dos 117 isolados de Barbacena-2012, 58% foram sensíveis e 42% resistentes. Dos 82 isolados de Holambra-2011, 65% foram sensíveis e 35,4% resistentes. A distribuição dos isolados foi unimodal nas três populações, com maior frequência de isolados sensíveis (Figura 1A).

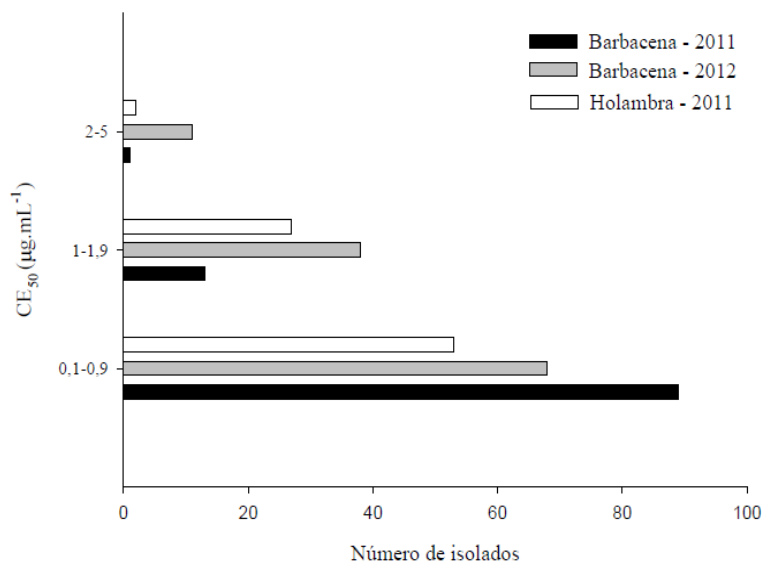
Para boscalida, avaliaram-se 305 isolados. Dos 103 isolados de Barbacena-2011, 22% foram altamente sensíveis ($\text{CE}_{50} < 0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 2,9% altamente resistentes ($\text{CE}_{50} > 1000\mu\text{g.mL}^{-1}$). Dos 119 isolados de Barbacena-2012, 10% foram altamente sensíveis e 23% moderadamente resistentes ($3,7 < \text{CE}_{50} < 23\mu\text{g.mL}^{-1}$). Dos 83 isolados de Holambra-2011, 54% foram altamente sensíveis e 14% pouco resistentes. A distribuição dos isolados foi bimodal nas amostras de Barbacena-2011 e predominantemente unimodal nas de Barbacena-2012 e de Holambra-2011. Nas populações de Barbacena, ocorreu a maior proporção de isolados resistentes, 63% em 2011 e 56% em 2012 (Figura 1B).

Detectou-se resistência tripla (tiofanato metílico, iprodiona e boscalida) nas populações de Holambra-2011 (4% dos isolados), Barbacena-2011 (9%) e Barbacena-2012 (27%).

Para iprodiona e boscalida, não se obtiveram coeficientes de correlação significativos entre os componentes de agressividade e os valores de CE_{50} . Na análise de trilha, também não se evidenciou relação significativa entre os componentes e CE_{50} de ambos os fungicidas, sempre com coeficientes de determinação menores que 10%.

Obtiveram-se diferenças significativas entre contrastes de médias associadas aos isolados de Holambra e ao período de incubação, que foi maior para os isolados resistentes (34h) que para os sensíveis (32h) a iprodiona ($P=0,028$) e a boscalida ($P=0,031$). Quanto aos isolados de Barbacena-2011, o período de incubação foi maior ($P=0,023$) para os resistentes (38h) que para os sensíveis (36h) a iprodiona. Nas demais comparações, inclusive para os isolados de Barbacena-2012, não se obtiveram diferenças significativas.

A



B

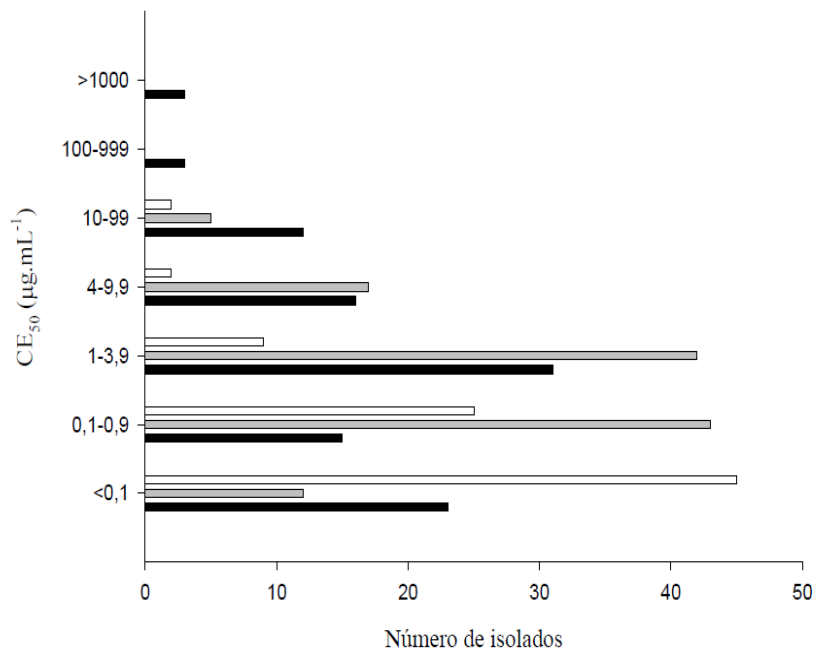


Figura 1. Frequência de isolados de *Botrytis cinerea*, separados quanto à concentração efetiva de (A) iprodiona e (B) boscalida capaz de inibir 50% de crescimento micelial (CE₅₀).

1.5 Discussão

Todos os isolados causaram lesão nos discos de pétalas e diferiram significativamente quanto aos componentes de agressividade. Portanto, similar ao obtido em estudos de populações com *B. cinerea* em outros países (Tanović et al 2009, Hosen et al 2010), há variabilidade na população do patógeno amostrada no Brasil. Apesar de ser uma tendência esperada, este trabalho é o primeiro conduzido para mensurar a variabilidade de isolados de *B. cinerea* mais densamente amostrados de áreas de produção de rosa. Diversos fatores, como as condições climáticas, densidade de lesão, estado fisiológico do hospedeiro e a variação genética podem contribuir para variações de agressividade em fungos fitopatogênicos (Pariaud et al 2009). Adicionalmente, a instabilidade fenotípica em *B. cinerea* conferida pela heterocariose (Chardonnet et al 2000), mutações e a presença de fatores citoplasmáticos como os elementos transponíveis (Diolez et al 1995, Levis et al 1997) ou vírus de dupla fita de RNA (Castro et al 2003, Wu et al 2007) também pode estar associada à variação observada para agressividade e sensibilidade a fungicidas. Portanto, não é possível apontar com segurança os fatores que afetam a variabilidade observada no conjunto de dados.

Não foi possível identificar grupos de isolados com base nas variáveis usadas para quantificar agressividade. A análise discriminante de Anderson, adotada em estudos relacionados ao melhoramento de plantas (Nogueira et al 2008), mas ainda não comumente usada na fitopatologia, foi ferramenta útil na tentativa de detecção de grupos. Entretanto, os altos valores de erro aparente (26 e 33%) e baixa congruência na classificação das amostras segundo localidade e ano demonstram haver grande variação quanto às características analisadas e distribuição aleatório dos indivíduos no tempo e no espaço. Na análise de contraste de médias, não houve diferença quanto ao diâmetro de lesão e à esporulação, segundo a região e hospedeiro. A dispersão aérea dos conídios favorece a migração de indivíduos, o que justificaria a ausência de diferenciação entre as populações do patógeno (Mirzaei et al 2009). Neste contexto, já se observou alta similaridade entre isolados amostrados dentro e fora de estufas durante a estação de cultivo de roseiras (Kerssies et al 1997). Em geral, considera-se haver alto risco de resistência a fungicidas de sítio de ação específico em populações de *B. cinerea*, em vista da variabilidade genética, abundante esporulação, vários ciclos de infecção e da inespecificidade de hospedeiros. Esta resistência é facilmente detectável em amostras de campo quando a frequência de isolados com mutação é maior que 1% (Brent e

Hollomon 2007). A resistência resulta da pressão de seleção exercida pelo uso de fungicidas na população do patógeno. Para isolados provenientes de lavouras comerciais de pereira os valores de CE_{50} referentes a tiabendazol (12,19 - $>100\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram maiores que em isolados de lavouras abandonadas (0,06 - $>25\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Lennox e Spotts 2003). Para os autores, a maior frequência de isolados com alta resistência a tiabendazol ocorreu em pomares tratados com benomil (16%) e a menor nos pomares sem pulverização de tiabendazol (0,59%). No presente estudo, os roseirais de onde os isolados foram obtidos têm histórico de pulverizações de benzimidazóis, dicarboximidas e isoftalonitrila, mas não de carboxamidas (boscalida). Tiofanato metílico, iprodiona, procimidona, e clorotalonil são registrados para controle do mofo cinzento da roseira no Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2013), onde há relato de isolados de *B. cinerea* de roseira, violeta, pimentão e morango resistentes a benzimidazóis e dicarboximidas (Ghini 1996). No presente trabalho, os 308 isolados do fungo estudados foram resistentes a tiofanato metílico, provavelmente pelo uso intensivo e contínuo do fungicida em roseirais. Fenótipos resistentes a benzimidazóis também foram registrados na Alemanha, com frequência de 40,5% (Weber 2011), e China, com frequências de 81,4% (Zhang et al 2009) e 100% (Sun et al 2010). Como já sugerido (Leroch et al 2011, Korolev et al 2011, Weber 2011, Gepp et al 2012), aparentemente, a resistência de *B. cinerea* a benzimidazóis é generalizada no mundo. Portanto, o uso de fungicidas do grupo deve ser restrito.

Estimar a CE_{50} para caracterizar a sensibilidade de isolados de *B. cinerea* a fungicidas é o primeiro passo para estabelecer um programa de monitoramento de resistência a fungicidas (Myresiotis et al 2007, Zhang et al 2010). Com o método da microplaca, para iprodiona, a CE_{50} variou de 0,3 e $0,6\mu\text{g.mL}^{-1}$ (isolados sensíveis) e de 1,5 a $4,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ (isolados resistentes); para benomil, a CE_{50} variou de 0,025 a $0,075\mu\text{g.mL}^{-1}$ (isolados sensíveis) e de 25 a $325\mu\text{g.mL}^{-1}$ (isolados resistentes) (Raposo et al 1996). Para boscalida, a CE_{50} variou de 0,9 a $5,2\mu\text{g.mL}^{-1}$ (isolados sensíveis) e foi maior que $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ para isolados resistentes (Bardas et al 2010). Considerando os resultados do presente trabalho, a maioria dos isolados foi sensível a iprodiona, mas detectaram-se indivíduos resistentes ($CE_{50}>1$ a $4\mu\text{g.mL}^{-1}$), com valores de CE_{50} semelhante ao obtido por Raposo et al (1996). Na Alemanha, em culturas de morango, framboesa, mirtilo e groselha, detectaram-se 34,8 e 29,2% de isolados com moderada e alta resistência, respectivamente, em frequências superiores às aqui obtidas (Weber 2011). Considerando-se a distribuição de resposta do tipo unimodal dos isolados com maior frequência de $CE_{50}<1\mu\text{g.mL}^{-1}$, depreende-se que a maioria da população ainda é

sensível a iprodiona, o que difere da distribuição bimodal observada em outros trabalhos, com indivíduos sensíveis e resistentes em frequências semelhantes (Raposo et al 1996, Myresiotis et al 2007). As dicarboximidas (iprodiona, procimidona), introduzidas no mercado em meados dos anos 1970, são adotadas no manejo do mofo cinzento em roseiras. Considerou-se que a população aqui estudada é sensível a iprodiona, tendo em vista: i. o tempo de uso das dicarboximidas, ii. que a mutação pontual pode levar à insensibilidade ao princípio ativo e iii. o alto risco de *B. cinerea* em desenvolver resistência a fungicidas sítio-específico. Provavelmente, a baixa frequência de indivíduos resistentes deve-se a um possível custo do valor adaptativo associado à resistência, conforme demonstrado por Fillinger et al (2012). A ausência de indivíduos com alta resistência a dicarboximida poderia ser resultado da menor adaptabilidade ou talvez da estratégia de manejo nas lavouras do estudo. Em Holambra, utilizaram-se iprodiona e *Clonostachys rosea* para o manejo do mofo cinzento, o que possivelmente poderia reduzir a pressão de seleção induzida por fungicidas na população do patógeno.

Detectaram-se isolados resistentes a boscalida, apesar de não haver histórico de aplicação do fungicida nas propriedades amostradas e de o princípio ativo não ser registrado para controlar o mofo cinzento no Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2013). Provavelmente, na população do patógeno ocorram indivíduos resistentes antes da aplicação do produto por causa da ocorrência de mutação espontânea, fato já sugerido anteriormente (Brent e Hollomon 2007). Adicionalmente, migrantes de *B. cinerea* resistentes, oriundos de outras espécies de plantas como videira, com antecedentes de aplicações de boscalida, podem ter atingido as roseiras. De qualquer forma, no presente trabalho obtiveram-se isolados altamente sensíveis provavelmente pela ausência de aplicação de boscalida em roseirais. Em outras regiões, com antecedentes de aplicações do produto, há relatos de perda da sensibilidade, como em kiwi, com 56,6% de isolados resistentes ($CE_{50} > 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Bardas et al 2009) e em macieiras, com 19% de isolados resistentes (CE_{50} entre 4,4 e $> 631 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Yin et al 2011). Na Alemanha, após a segunda aplicação de boscalida em lavouras de rosáceas de frutos pequenos, 21,5% dos isolados de *B. cinerea* apresentaram alta resistência (Weber 2011). Na amostragem de Holambra-2011, houve distribuição unimodal de isolados, com pico na $CE_{50} < 0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que caracteriza alta sensibilidade. Esta distribuição contrasta com a bimodal obtida em Barbacena-2011, onde ocorreram isolados sensíveis e resistentes. O risco de selecionar indivíduos resistentes associados aos fungicidas inibidores da enzima succinato desidrogenase (SDH) é alto (Veloukas et al 2011).

Mutações pontuais no gene que codifica a enzima SDH associam-se à perda de sensibilidade de *B. cinerea* a boscalida (Veloukas et al 2011). Considerando-se os resultados do presente estudo e os relatos existentes, há o risco de a população tornar-se resistente a boscalida após poucas aplicações. Portanto, quando aprovado para roseira, o uso do produto deveria ficar restrito a poucas aplicações e no momento de menor pressão da doença, para diminuir a seleção de indivíduos resistentes na população.

A ocorrência de indivíduos resistentes a fungicidas em estudos de laboratório não necessariamente está associada a falhas no controle de doenças no campo. Em videiras tratadas durante 10 a 15 anos com dicarboximidas, o incremento da frequência de isolados com baixa resistência a iprodiona e vinclozolina não evidenciou perdas na eficiência do controle do mofo cinzento (Latorre et al 1994). Assim, a menor sensibilidades dos isolados a boscalida não reduziu a eficiência do controle no campo. O efeito de boscalida pode diferir segundo o tipo de mutação na subunidade B do gene que codifica enzima SDH: a eficiência de controle é baixa para isolados com mutação no sítio H272L e P225F e de baixa a moderada naqueles com mutações em H272R/Y e N230I (Velouskas et al 2013). A eficiência de controle não se reduziu na Grécia, onde indivíduos com mutação em H272R predominaram nas lavouras de morango, provavelmente em vista da eficiência moderada de controle dos isolados com a mutação em H272R, o custo adaptativo associado à mutação em *SdhB* e/ou a baixa pressão da doença (Veloukas et al 2011). Nas populações analisadas no presente trabalho, predominaram isolados sensíveis (iprodiona 69%, boscalida 46%) e, dentro dos resistentes, as frequências predominaram os de baixa resistência (iprodiona 64%, boscalida 55%). Adicionalmente, com os isolados resistentes coletados de Barbacena em 2012, detectaram-se mutações nas sequências parciais dos genes *BcOSI* (I365S/N, Q369P e N373S) e *SdhB* (H272R e H272Y) que conferem resistência de baixa a moderada. Portanto, nas lavouras do estudo, com variação na sensibilidade a iprodiona e boscalida, possivelmente, ainda não se observa perda da eficiência no controle do mofo cinzento. De qualquer forma, deve-se reduzir o uso excessivo e exclusivo destes produtos.

Observou-se resistência dupla a tiofanato metílico e iprodiona. Provavelmente, o fenótipo de *B. cinerea* seja estável através de várias gerações, característica não avaliada no experimento. Obtiveram-se evidências de estabilidade em isolados resistentes a tiofanato metílico e vinclozolina após gerações sucessivas, mas não em isolados resistentes a vinclozolina, em que houve mudanças no fenótipo através de várias multiplicações (Yourman et al 2001). No presente trabalho, também se constataram

isolados com resistência dupla a tiofanato metílico e boscalida. Em outras regiões, observou-se resistência aos três ingredientes ativos, relacionada à resistência multidroga (Bardas et al 2009, Leroch et al 2011). Detectou-se resistência múltipla na Alemanha, com isolados resistentes a tiofanato metílico e iprodiona também resistentes a fenexamida, trifloxystrobina, boscalida, ciprodinil e fludioxonil (Weber 2011). Os riscos de isolados de *B. cinerea* com resistência múltipla ocorrerem em outras regiões no Brasil são altos, em vista da facilidade de dispersão aérea do patógeno. A permanência desses isolados na população dependerá da adaptabilidade dos mesmos. Os isolados com múltipla resistência coletados no Brasil podem permanecer na população, como relatado em outras regiões. Portanto, no manejo do mofo cinzento nas lavouras de roseiras dever-se-iam incluir ingredientes com sítios múltiplos de ação, o que reduziria a pressão de seleção na população do patógeno e limitaria o número de aplicações dos fungicidas sitio-específicos. A integração de medidas de manejo cultural, como o uso de *C. rosea*, sulfato de cálcio e eliminação de restos de cultura, podem contribuir para reduzir o risco de selecionar isolados resistentes e, principalmente, as perdas causadas pelo mofo cinzento.

Não houve correlação entre os componentes de agressividade do patógeno e a CE₅₀ de iprodiona e boscalida. Os isolados sensíveis e resistentes a ambos os ingredientes ativos também não diferiram quanto ao diâmetro de lesão nem esporulação. Já se observou relação entre resistência a fungicidas e adaptabilidade (Raposo et al 1996, Oshima et al 2006, Zhang et al 2010, Kim e Xiao 2011, Korolev et al 2011, Sun et al 2010). Na ausência de seleção exercida pela aplicação de fungicida, indivíduos resistentes se mantiveram na população, o que tornou o controle químico ineficaz. No presente estudo, não se efetuaram medidas sucessivas ao longo do tempo e não se quantificou a sobrevivência do patógeno. Em estudos futuros, recomenda-se avaliar estas variáveis e, principalmente, monitorar constantemente a população do patógeno.

No presente trabalho, com a caracterização da população de *B. cinerea* confirmou-se a alta variabilidade quanto à agressividade e à ocorrência de resistência a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida. A falta de efeito na adaptabilidade em tiofanato metílico e boscalida se traduz em alto de risco de os isolados resistentes prevalecerem na população, mesmo na ausência de fungicidas (Kim e Xiao 2011, Weber 2011). Em iprodiona, há resultados opostos sobre o efeito na adaptabilidade (Fillinger et al 2012, Korolev et al 2011). A resistência observada no laboratório não será necessariamente idêntica à que ocorre em condições de campo. Nas condições de campo, a pressão dos fungicidas sobre a população do patógeno não é homogênea, em

vista da insuficiente cobertura do produto na superfície das plantas e da lavagem pelas chuvas (Chang et al 2007). Com os resultados do presente trabalho, evidenciam-se os riscos do manejo do mofo cinzento baseado no uso frequente de princípios ativos de sítio específico de ação, que podem tornar o controle químico ineficaz. Ademais, em vista da ausência de diferenciação nas populações amostradas, é possível implementar medidas de manejo comuns em todas as regiões, o que facilitaria o manejo generalizado do mofo cinzento.

Segundo os resultados aqui obtidos, os isolados de *B. cinerea* são variáveis quanto à agressividade a pétalas de roseira e não se diferenciam segundo as regiões amostradas. A população de *B. cinerea* analisada é resistente a tiofanato metílico e, de maneira geral, sensível a iprodiona e a boscalida, apesar de incluir indivíduos resistentes aos dois fungicidas. Vale ressaltar que a última publicação científica relacionada à resistência a fungicidas data de 1996 (Ghini 1996). Portanto, o presente estudo vem preencher lacuna importante no conhecimento da população de *B. cinerea* no Brasil. Deve-se conduzir novos estudos, com isolados provenientes de outras culturas, incrementando ingredientes ativos, outras variáveis de adaptabilidade e testes de fungicidas *in vivo*, para conhecer mais a situação da população do fungo, principalmente quanto à resistência a fungicidas. Neste aspecto, a implementação de técnicas eficientes de monitoramento da resistência contribuirão para definir melhor as estratégias de manejo da doença.

1.6 Agradecimentos

Ao pesquisador da Embrapa-Ambiente, Dr. Marcelo A.B. Morandi, aos técnicos do Escritório Local da Emater - MG de Alfredo Vasconcelos, Tadeu C.G. Azevedo e Dione M.A.V. Moraes, aos produtores de roseiras de Alfredo Vasconcelos - MG, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

1.7 Referências

- Alfenas, A. C., Gonçalves, R. C., Ferreira, F. A., e Máfia, R. G. 2007. Isolamento de fungos fitopatogênicos. Pages 53-91 in: Métodos em fitopatologia. Vol 1. A. C. Alfena, R. G. Máfia, eds. Editora UFV Viçosa, MG.
- Anderson, T.W. An introduction to multivariate statistical analysis. New York: John Wiley & Sons, 1958. 242p
- Bardas, G. A., Veloukas, T., Koutitab, O., and Karaoglanidisa, G. S. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. Pest Manag. Sci. 66:967-973.
- Bardas, G. A., Veloukas, T., Koutitab, O., and Karaoglanidisa, G. S. 2009. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. Pest Manag. Sci. 66:967-973.
- Beever, R. E. 1983. Osmotic sensitivity of fungal variants resistant to dicarboximide fungicides. Trans. Brit. Mycol. Soc. 80: 327-331.
- Beever, R. E., Laracy, E. P., and Pak, H. A. 1989. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. Plant Pathol. 38:427-437.
- Brent, K., and Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph N° 1. Online: <http://www.frac.info/frac/index.htm>.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B., and Tudzynski, P. 1994. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. Curr. Genet. 25:445-50.
- Castro, M., Kramer, K., Valdivia, L., Ortiz, S., and Castillo, A. 2003. A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol. Letters 228: 87-91.
- Chang, K. F., Ahmed, H. U., Hwang, S. F., Gossen, B. D., Strelkov, S. E., Blade, S. F.,

and Turnbull, G. D. 2007. Sensitivity of field populations of *Ascochyta rabiei* to chlorothalonil, mancozeb, and pyraclostrobin fungicides, and effects of strobilurin fungicides on the progress of ascochyta blight of chickpea. *Can. J. Plant Sci.* 87:937-944.

Chardonnet, C. O., Sams, C. E., Trigiano, R. N., and Conway, W. S. 2000. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology* 90:769-774.

Cruz, C. D. 2006. Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG).

Damicone, J., and Smith, D. Oklahoma cooperative extension. Fungicide resistance management. Online: <http://osufacts.okstate.edu>.

Dioloz, A., Marches, F., Fortini, D., and Brygoo, Y. 1995. Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:103-108.

Elad, I., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N. 2004. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.

Figueiredo, M. B., and Pimentel, P. V. C. 1975. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da seção de micologia fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopatol.* 1:299-302.

Fillinger, S., Ajouz, S., Nicot, P.C., Leroux, P., Bardin, M. 2012. Functional and structural comparison of pyrrolnitrin- and iprodione-induced modifications in the class III histidine-kinase *Bos1* of *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* 7: e42520. doi:10.1371/journal.pone.0042520.

Fourie, P.R., and Rolz, G. 2003. Fitness on grape berries of *Botrytis cinerea* isolates belonging to different dicarboximide sensitivity classes. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 24:1-10.

Fraile, A., Alonso, A., and Sagasta, E. M. 1986. Some characteristics of *Botrytis cinerea* isolates tolerant to procymidone. *Plant Pathol.* 35:82-85.

Friedman, H., Agami, O., Vinokur, Y., Droby, S., Cohen, L., Refaeli, G., Resnick, N., and Umiel, N. 2010. Characterization of yield, sensitivity to *Botrytis cinerea* and antioxidant content of several rose species suitable for edible flowers. *Sci. Horticult.* 123:395-401.

Fungicide resistance action committee (FRAC). Monitoring methods status: January 2012. Online: http://www.frac.info/Monitoring_Methods.

Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M. E., Romero, G., Silvera, E., González, P., Rebellato, J., Ferreira, Y., and Bentancur, O. 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia* 16:97-107.

Ghini, R. E. 1996. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no estado de São Paulo. *Fitopatol. Bras.* 21:285-288.

González-Fernández, R., Aloria, K., Valero-Galván, J., Redondo, I., Arizmendi, J. M., and Jorrín-Novo, J. V. 2013. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. Online: www.elsevier.com/locate/jprot.

Hosen, M. I., Ahmed, A. U., and Islam, M. R. 2010. Variability and pathogenicity in bangladeshi isolates of *Botrytis cinerea* causing botrytis gray mold in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Pathol. J.* 9:129-134.

Jarvis WR. 1989. Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Dis.* 73:190-194.

Jiang, J., Ding, L., Michailides, T. J., Li, H., and Ma, Z. 2009. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 93:72-76.

Kerssies, A., Bosker-van Zessen, A. I., Wagemakers, C. A. M., and van Kan, J. A. L. 1997. Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Dis.* 81:781-786.

Kim, Y. K., and Xiao, C.L. 2011. Stability and fitness of pyraclostrobin- and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology*

101:1385-1391.

Korolev N, Mamiev M, Zahavi T, and Elad Y. 2011. Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. Eur. J. Plant Pathol. 129:591-608.

Kretschmer, M., Leroux, M., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.-J., Pradier, J.-M., Leroux, P., De Waard, M. A., and Hahn, M. 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. PLoS Pathog 5: e100069.

Online:

<http://www.plospathogens.org/article/info3Adoi2F10.13712Fjournal.ppat.1000696>.

doi:10.1371/journal.ppat.

LaMondia, J. A, and Douglas, S. M. 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. Plant Dis. 81:729-732.

Latorre, B. A., Flores, V., Sara, A. M., and Roco, A. 1994. Dicarboximide-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grape in Chile: Survey and characterization. Plant Dis. 78:990-994.

Lennox, C. L., and Spotts, R. A. 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. Plant Dis. 87:645-649.

Leroux, M., Kretschmer, M., and Hahn, M. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in south west Germany. J. Phytopathol. 159:63-65.

Leroux, P., and Clerjeau, M. 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. and de Toni to fungicides in French vineyards. Crop Prot. 4:137-160.

Leroux, P. 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides.

Pages 195-222 in: *Botrytis*: Biology, pathology and control. Y. Elad, P. Williamson, P. Tudzinski, and N. Delen eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., and Walker, A-S. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *App. Environ. Microbiol.* 76:6615-6630.

Levis C, Fortini D, and Brygoo Y. 1997. Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Mol. Gen. Genet.* 254:674-680.

Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., and Fermaud, M. 2003. Phenotypic differences between vacuina and transposon subpopulations of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:479-488.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT. Online: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.

Mirzaei, S., Mohammadi, G. E., Shams-Bakhsh, M., Safaie, N., and Chaichi, M. 2009. Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. *J. Phytopathol.* 157:474-482.

Morales A. 2008. A simple way to preserve fungal cultures. Cornell University. online: <http://blog.mycology.cornell.edu>.

Moyano, C., Gómez, V., and Melgarejo, P. 2004. Resistance to pirimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *J. Phytopathol.* 152:484-490.

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

Oshima, M., Banno, S., Okada, K., Takeuchi, T., Kimura, M., Ichiishi, A., Yamaguchi, I., and Fujimura, M. 2006. Survey of mutations of a histidine kinase gene *BcOS1* in

dicarboximide resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Plant Pathol. 72:65-73.

Nogueira, A. P. O., Sedyama, T., Cruz, C. D., Reis, M. S., Pereira, D. G., and Jangarelli, M. 2008. Novas características para diferenciação de cultivares de soja pela análise discriminante. Ciênc. Rural 38:2427-2433.

Pariaud, B., Ravigné, V. , Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., and Lannou, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. Plant Pathol. 58:409-424.

Pie, K., and Brouwer, Y. J. C. M. 1993. Susceptibility of cut rose flower cultivars to infections by different isolates of *Botrytis cinerea*. J. Phytopathol. 134:233-244.

Raposo, R., Colgam, R., Delcan, J., and Melgarejo, P. 1995. Application of an automated quantitative method to determine fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 79:294-296.

Raposo, R., Delcán, J., Gomez, V., and Melgarejo, P. 1996. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. Plant Pathol. 45:497-505.

Stammler, G., and Speakman, J. 2006. Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. J. Phytopathol. 154: 508-510.

Sun, H.-Y., Wang, H.-C., Chen, Y., Li, H.-X., Chen, C.-J., and Zhou, M.-G. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. Plant Dis. 94:551-556.

Tanović, B., Delibašić, G., Milivojević, J., and Nikolić, M. 2009 Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. Arch. Biol. Sci. 61:419-429.

Topolovec-Pintaric, S. 2009. Resistance risk to new botryticides in *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in winegrowing areas in Croatia. J. Plant Dis. Prot. 116:73-77.

Valiuskaite, A., Surviliene, E., and Baniulis, D. 2010. Genetic diversity and

pathogenicity traits of *Botrytis* spp. isolated from horticultural hosts. *Agriculture* 97: 85-90.

Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M., and Karaoglanidis, G. S. 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Dis.* 95:1302-1307.

Veloukas, T., Markoglou, A. N., and Karaoglanidis, G. S. 2013. Differential effect of *SdhB* gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 97:118-122.

Weber, R. W. S. 2011. Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in Northern German small-fruit production. *Plant Dis.* 95:1263-1269.

Wu, M. D., Zhang, L., Li, G. Q., Jiang, D. H., Hou, M. S., and Huang, H.-C. 2007. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 97:1590-1599.

Yin, Y. N., Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101:986-995.

Yourman, L. F., Jeffers, S. N., and Dean, R. A. 2001. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* 91:307-315.

Zhang, C. Q., Hu, J.L., Wei, F.L., and Zhu, G.N. 2009. Evolution of resistance to different classes of fungicides in *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables in eastern China. *Phytoparasitica.* 37:351-359.

Zhang, C. Q., Liu, Y. U., and Zhu, G. N. 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. *Eur. J. Plant Pathol.* 126:509-515.

Topolovec-Pintarić, S. 2011. Resistance to Botryticides. Pages 19-42 in: *Fungicides - Beneficial and harmful aspects.* N. Thajuddin eds. InTech, Online:

<http://www.intechopen.com/books/fungicides-beneficial-and-harmful-aspects/resistance-to-botryticides>.

2. Detecção de mutação associada à resistência a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida em isolados de *Botrytis cinerea* de rosa pela análise de dissociação de alta resolução.

2.1 Resumo

manejo do mofo cinzento da roseira, causado por *Botrytis cinerea*, principalmente sob cultivo protegido, envolve aplicações frequentes de fungicidas. Relatos de perda de sensibilidade a estes produtos são frequentes. A capacidade de detectar genótipos resistentes a fungicidas viabiliza o estudo da evolução da resistência a fungicidas nas populações do patógeno e, principalmente, permite a otimização das estratégias de manejo anti-resistência. A análise de dissociação de alta resolução (RT-PCR-HRM), adotada na detecção de patógenos humanos resistentes a fármacos, pode ser uma alternativa na detecção de isolados de *B. cinerea* resistentes a fungicidas. Assim, objetivou-se analisar as sequências parciais dos genes *BenA*, *BcOS1* e *SdhB* associados, respectivamente, à resistência aos fungicidas benzimidazóis, dicarboximidas e carboxamidas em isolados de *B. cinerea* de roseiras e validar a técnica de RT-PCR-HRM na detecção de isolados resistentes a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida. Selecionaram-se 87 isolados de *B. cinerea* oriundos de rosas e previamente caracterizados quanto à sensibilidade a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida e estabeleceu-se um protocolo para a RT-PCR-HRM capaz de detectar a mutação nas sequências dos referidos genes. Na sequência parcial de *BenA*, detectou-se uma mutação no sítio 198 (E198A), quatro no gene *BcOS1* (I365S/N, Q369P, N373S) e duas no *SdhB* (H272Y/R). Para cada fungicida, obtiveram-se curvas de dissociação diferenciadas para isolados sensíveis e resistentes. Os resultados da HRM e as análises das sequências do gene *BenA*, *BcOS1* e *SdhB* foram concordantes. Conclui-se que a técnica de HRM é ferramenta potencial no monitoramento da resistência de *B. cinerea* a fungicidas.

2.2 Introdução

Botrytis cinerea Pers ex Fr. (*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz.) causa o mofo cinzento em várias espécies de plantas (Elad et al 2004). Em roseiras, o patógeno produz lesões em pétalas e reduz a produtividade e qualidade da produção (Volpin e Elad 1991). O manejo do mofo cinzento baseia-se no uso de fungicidas benzimidazóis, dicarboximidas, anilino pirimidinas, fenilpirroles, estrobilurinas e carboxamidas (Leroux 2004). No Brasil, os produtos registrados para o manejo do mofo cinzento em roseiras são tiofanato metílico (benzimidazole), iprodiona e procimidona (dicarboximidas), e clorotalonil (isofalotril) (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2013). Apesar de amplamente usados, não há estudos recentes sobre a resistência de *B. cinerea* a fungicidas.

Em vários países, constatou-se a existência de linhagens de fungos resistentes a benzimidazóis (Beever et al 1989, Leroux et al 2002), dicarboximidas (Korolev et al 2011), anilino pirimidinas (Topolovec-Pintaric 2009, Zhang et al 2009, Korolev et al 2011), carboxamidas (Bardas et al 2010, Yin et al 2011) e estrobilurinas (Jiang et al 2009, Bardas et al 2010). O mecanismo de resistência mais comum nos fungos fitopatogênicos é a alteração bioquímica do sítio alvo do fungicida (Ma e Michailides 2005). Este mecanismo ocorre em isolados resistentes a benzimidazóis e dicarboximidas, com a alteração bioquímica do sítio alvo do fungicida na população de *B. cinerea* em diferentes hospedeiros e regiões (Yarden e Katan 1993, Cui et al 2004, Banno et al 2008, Malandrakis et al 2011). A mutação nos códons 198 e 200 do gene β tubulina (*BenA*) confere resistência aos benzimidazóis e fenilcarbamatos (Yarden e Katan 1993, Yourman e Jeffers 1999). A substituição de aminoácidos nos sítios 365, 368, 369, 373 e 447 do gene osmosensor histidina quinase (*BcOSI*) confere resistência a dicarboximidas (Yourman e Jeffers 1999, Leroux et al 2002, Oshima et al 2002, Cui et al 2004, Ma et al 2007) e nos sítios 272 e 225 do gene que codifica a subunidade B da enzima succinato desidrogenase (*SdhB*) (Leroux et al 2010, Yin et al 2011).

O reconhecimento destes mutantes por meio de técnicas moleculares facilita a detecção de resistência na população de patógenos. Atualmente, estas técnicas baseiam-se na reação em cadeia da polimerase (PCR), como o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição de produtos de PCR (PCR-RFLP), *primer-introduced restriction analysis*-PCR (PIRA-PCR), PCR alelo-específico e PCR alelo-específico em tempo real (RT-PCR) (Ma e Michailides 2005). Mais recentemente, na medicina, vem-se usando a análise de dissociação de alta resolução (*high resolution melting* - HRM)

para detectar patógenos resistentes a fármacos (Li et al 2012, Ramirez et al 2010), bem como para diferenciar subtipos de vírus (Lin et al 2008, Varillas et al 2010), espécies de bactérias (Simenc e Potocnik 2011) e tipos de fungos leveduriformes e filamentosos (Goldschmidt et al 2012). Na fitopatologia, aplicou-se esta técnica para identificar as formas especiais *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* e *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, com base na dissociação das sequências do ITS (Ganopoulos et al 2012).

A HRM é um método pós-PCR, e se baseia na análise das curvas de dissociação, em que cada sequência gera uma curva padrão e tem temperatura de dissociação específica, o que possibilita detectar as mutações nas sequências. A técnica implica no monitoramento da alteração na fluorescência causada pela liberação do corante intercalante localizado na dupla fita de DNA, a medida que aumenta a temperatura (Herrman et al 2007). Na detecção de mutação em genes associados a doenças humanas, a HRM foi altamente sensível e de baixo custo, especialmente em mutações com baixa incidência (Li et al 2011). Na detecção de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a antibióticos, a técnica foi 91% sensível e 98% específica a rifampicina e 87% sensível e 100% específica a isoniazida. Considerando-se a detecção da mutação para as duas drogas, detectaram-se 85% de sensibilidade e 98 % de especificidade (Ramirez et al 2010). A técnica poderia ser adotada para monitorar a resistência de *B. cinerea* a fungicidas, principalmente para possibilitar a detecção de mutantes que ainda estão em baixa frequência na população. Consequentemente, a técnica pode ser implementada para monitorar existência de indivíduos resistentes em uma área e rapidamente estabelecer programas de manejo para evitar a seleção de indivíduos resistentes.

A HRM é simples e rápida, quando comparada aos procedimentos convencionais de detecção de resistência a fungicidas (inibição de crescimento micelial e germinação de conídios), em particular quando se avalia grande número de isolados. A vantagem da técnica sobre outros métodos moleculares é que se executa a análise imediatamente após a amplificação. Os métodos que requerem a remoção dos produtos das PCR para análise posterior são mais trabalhosos e exigem precauções para evitar a contaminação. O alto custo do investimento é parcialmente compensado pelo baixo custo de funcionamento do ensaio (Bass et al 2007).

No Brasil, não se tem relato do uso da análise de HRM para a detecção de isolados de fungos resistentes a fungicidas. Assim, objetivou-se analisar as sequências parciais dos genes *BenA*, *BcOS1* e *SdhB* de isolados de *B. cinerea* de roseiras e validar a

técnica de RT-PCR-HRM para detectar aqueles resistentes a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Isolados de *Botrytis cinerea*

Usaram-se 88 isolados obtidos de roseiras, 87 da região de Barbacena-MG, coletados em 2012 (Tabela 1), um de Viçosa-MG, e um de morangueiro de Barbacena, resistente a tiofanato metílico. Previamente, caracterizaram-se os isolados quanto à concentração de tiofanato metílico, iprodiona e boscalida capaz de inibir 50% do crescimento micelial (CE_{50}). Calculou-se a CE_{50} de cada isolado relativo ao valor médio das CE_{50} dos isolados sensíveis (fator de resistência, Fr). Os isolados de Barbacena foram resistentes a tiofanato metílico, enquanto o de Viçosa foi sensível (CE_{50} de $1,3\mu\text{g}$ de i.a. mL^{-1}). Para iprodiona, a CE_{50} variou de 0,14 a $4,00\mu\text{g}$ de i.a. mL^{-1} (Fr=0,18 a 5,2); os isolados resistentes foram classificados como apresentando baixa ($CE_{50} > 1\mu\text{g}$ de i.a. mL^{-1}) e moderada resistência ($> 1,5\mu\text{g}$ de i.a. mL^{-1}). Para boscalida, a CE_{50} variou de 0,035 a $23,4\mu\text{g}$ de i.a. mL^{-1} (Fr=0,1 a 65); os isolados diferenciaram-se em altamente sensíveis ($CE_{50} < 0,19\mu\text{g}$ i.a. mL^{-1} , Fr=0,5), normais (CE_{50} de 0,19 - $0,6\mu\text{g}$ i.a. mL^{-1} , $0,5 < \text{Fr} < 2$), pouco resistentes (CE_{50} de 0,78 a $3,5\mu\text{g}$ de i.a. mL^{-1} , Fr=2 a 10) e moderadamente resistentes (CE_{50} de 3,73 a $23,4\mu\text{g}$ de i.a. mL^{-1} , Fr>10).

Tabela 1. Isolados de *Botrytis cinerea* obtidos de botões de diferentes variedades de roseiras na região de Barbacena-MG (21° 17' S, 43° 51' O) em 2012.

Variedade	Isolado
Amarela	90, 91, 93
Avalanche	104, 106
Bibby	1, 27
Bindine	86, 87, 88
Carola	8, 9, 38, 39, 73, 112, 113, 122, 123
Chá	110
Coffee Break	83, 84, 85
Fri	47, 48, 49
Grand Gala	16, 66, 67, 68
Greta	20, 21, 22, 35, 36, 102, 103
Hollywood	98, 99, 100
Konfetti	56, 57, 58
Laranja	30
Love Head	115, 116
Miracle	28, 29
Morgana	70
Osiana	18, 53, 54
Pink	43, 45, 46, 107, 108
Polar	95, 96
Ravel	23, 24, 25
Red	12, 13
Samurai	76
Sandra	62, 63, 64, 118, 119
Sky Line	50, 51
Tinic	3, 5, 6, 7, 33, 78, 79, 89, 92
Vânia	81, 82
Vegha	40, 41
Versilia	59, 61

2.3.2 Extração de DNA

Extraiu-se o DNA de micélio dos isolados de *B. cinerea* cultivados em 20mL de meio líquido de extrato de malte por 120h a 23°C, no escuro contínuo, submetido à agitação de 160 rpm. Lavou-se o micélio por três vezes em água destilada, e retirou-se o excesso de água com papel filtro esterilizado. Colocaram-se aproximadamente 2,5 µg de micélio em microtubos de 2mL junto a uma esfera de metal de 2mm de diâmetro e 600µL de solução de lise nucléica do kit de extração do DNA (Wizard Genomic DNA, purification Kit, Promega, Madison, WI). Homogeneizou-se o micélio em TissueLyser II (QIAGEN), durante 3min a 30Hz, e repetiu-se o procedimento em intervalo de 5min a

-20°C. Em seguida, as amostras foram processadas como recomendado pelo fabricante do kit de extração. Quantificou-se o DNA por espectrofotometria (NanoDrop 2000 Thermo Scientific), e ajustou-se a concentração de trabalho a 25 ng.µL⁻¹.

2.3.3 PCR

Usaram-se amostras de DNA de isolados sensíveis e resistentes aos fungicidas para as reações com os primers, TUB-F1/TUB-R1, BCOS1-F1/BCOS1-R2 e SDHB-F/SDHB-R (Invitrogen Carlsbad, California), para amplificar a sequência parcial dos genes *BenA*, *BcOS1* e *SdhB*, respectivamente (Tabela 2). A reação ocorreu na mistura de 25 µL com kit QIAGEN em termociclador PTC-100 (MJ Research). As condições de amplificação dos primers TUB e BCOS1 consistiram em desnaturação inicial de 95°C (2 min) seguido de 34 ciclos de 94°C (30 s), 60°C (30 s) e 72°C (30 s) e extensão final de 72°C (5 min). As condições da PCR com os primers SDHB seguiram o método descrito por Yin et al (2011). Cinco microlitros da reação separaram por eletroforese em gel TBE agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium) e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

Purificaram-se os produtos das reações dos genes *BenA* (12), *Bos1* (12) e *SdhB* (17) com ExoSapI (USB, Cleveland, Ohio) segundo recomendação do fabricante; posteriormente sequenciaram-se os amplicons. Para identificar a mutação associada à resistência, compararam-se as sequências parciais do gene *BenA* às sequências dos isolados sensível e resistente provenientes de trabalho prévio. Compararam-se as sequências parciais dos genes *BcOS1* e *SdhB* das amostras do estudo às sequências de referência AF435964,1 e B0510_1175T1 de estirpes sensíveis, respectivamente. Realizaram-se todos os alinhamentos com o algoritmo Muscle (Edgar 2004) implementado no programa MEGA 5.20 (Tamura et al 2011).

2.3.4 RT-PCR-HRM

Amplificou-se o DNA dos isolados em reações independentes com os pares de primers TUB-HPF1/TUB-HPR1, BCOS1-HPF1/BCOS1-HPR1 (Banno et al 2008) e SDHB-HRM-F5/SDHB-HRM-R6 (Invitrogen) (Tabela 2). Realizou-se a RT-PCR-HRM em 10 µL no Rotor-Gene Q (QIAGEN) com o kit específico para HRM (Type-it HRM PCR Kit, QIAGEN, Valencia, CA). As condições de amplificação consistiram de desnaturação inicial a 95°C (5 min) seguida de 45 ciclos de 95°C (30 s), 57°C (30 s) e

72°C (30 s). Processou-se a HRM entre 60 e 99°C, coletando-se os dados em intervalos 0,1°C.s⁻¹. Analisou-se o perfil de dissociação utilizando o programa do Rotor-Gene Q (Versão 2.0.2). Normalizaram-se as curvas de HRM entre as regiões pré e pós-dissociação com os valores 76,22 - 78,26°C e 79,84 - 81,74°C, 77,33 - 79,37°C e 82,47 - 84,15°C, 74,73 - 76,8°C e 80,79 - 82,61°C, para as reações dos primers TUB, BCOS1 e SDHB, respectivamente.

2.4 Resultados

2.4.1 PCR

A reação de PCR com os primers TUB-F1/TUB-R1, BCOS1-F1/BCOS1-R2, SDHB-F/SDHB-R produziu amplicons de aproximadamente 300, 1400 e 650 pb, respectivamente. Nas amostras amplificadas com os primers dos genes *BenA* e *SdhB* ocorreram amplicons monomórficos. Ocorreu variabilidade nos produtos das amostras analisadas com os primers do *BcOSI* quanto ao tamanho do fragmento (Figura 1).

2.4.2 Detecção de mutação pelo sequenciamento

A partir da análise das sequências parciais do gene *BenA*, detectou-se a mutação no códon E198A que confere resistência aos benzimidazóis (Tabela 3). Detectaram-se três mutações nas sequências parciais da região do gene *BcOSI*. Em seis isolados, houve uma substituição de aminoácido, cinco no códon I365S e um para o sítio I365N. Em quatro, o fenótipo era de resistência baixa e, em dois, moderada. Três amostras, com dupla mutação no sítio Q369P e N373S ou I365S, corresponderam aos isolados moderadamente resistentes a iprodiona (Tabela 4). Nas sequências parciais do *SdhB*, ocorreram oito amostras para cada mutação nos sítios H272R/Y. Ambos os genótipos conferiram resistência baixa e moderada a boscalida (Tabela 5).

2.4.3 Detecção de isolados resistentes pela análise de HRM

A partir da reação com os primers do gene *BenA*, diferenciou-se o isolado sensível dos resistentes. Os isolados insensíveis a tiofanato metílico agruparam-se com um isolado resistente, previamente caracterizado como portador da mutação E198A (Figura 2A). Pela análise HRM do gene *BcOSI*, formaram-se três grupos associados à

presença e ao número de sítios de mutação (Figura 2B). Os isolados sensíveis ($CE_{50}=0,14$ a $0,96\mu\text{g i.a.mL}^{-1}$) agruparam-se com a referência sensível da reação. Os isolados com uma mutação, I365S ou I365N, formaram um grupo caracterizado como de baixa resistência ($CE_{50}=1,04$ a $1,48\mu\text{g i.a.mL}^{-1}$). As amostras com dois sítios modificados agruparam-se com os fenótipos moderadamente resistentes ($CE_{50}=1,55$ - $4\mu\text{g. i.a.mL}^{-1}$). Duas amostras com uma mutação foram moderadamente resistentes ($CE_{50}=2,05$ e $2,60\mu\text{g. i.a.mL}^{-1}$) (Tabela 2).

Na análise da reação do gene *SdhB*, diferenciaram-se três grupos coincidentes com a mutação H272Y, H272R ou sem mutação (isolados sensíveis) (Figura 2C). Das 90 amostras, duas tiveram curvas de resposta semelhantes às sensíveis, porém com baixa resistência a boscalida ($CE_{50}=1,30$, $1,49\mu\text{g. mL}^{-1}$).

Em todas as análises de HRM, a proporção de similaridade entre as amostras e as referências de cada grupo foram superiores a 90 %.

Tabela 2. Sequências dos primers para as reações de PCR e RT-PCR-HRM.

Primer	Sequência (5'-3')	Característica
TUB-F1	GCTTTTGATCTCCAAGATCCG	Amplifica sequências do <i>BenA</i> e contem códon 198 e 200 ^(a)
TUB-R1	CTGGTCAAAGGAGCAAATCC	
BCOS1-F1	AAGCATCAACAAGCCAACG	Amplifica sequências do gene <i>BcOS1</i> e contem códon 365, 368, 369,373, 447 ^(a)
BCOS1-R2	ATCTCTCCAGATGCCTCGAC	
SDHB-F	AAGGTATCTGCGGCAGTTGTG	Amplifica sequências do gene <i>SdhB</i> e contem códon 225 e 272 ^(a)
SDHB-R	AGCAATAACCGCCCAAAC	
TUB-HPF1	TGTCGAGCCATATAACGCAA	Amplifica sequências <i>BenA</i> ^(b)
TUB-HPR1	CCAACCTTCGGAGATCTGAG	
BCOS1-HPF1	AGCTCATGGAGATCTCACAC	Amplifica sequências do gene <i>BcOS1</i> ^(b)
BCOS1-HPR1	ATTGGCCATAGCGTTGACGTT	
SDHB-HRM-F5	GACATCTTGCCCTCCTACT	Amplifica sequências do gene <i>SdhB</i> ^(b)
SDHB-HRM-R6	ATGTCCTCGAGCAGTTGAGA	

^(a) Primers para as reações de PCR, ^(b) Primers para as reações de RT-PCR-HRM

Tabela 3. Características fenotípica e genotípica de isolados de *Botrytis cinerea* frente a tiofanato metílico.

Isolado	Fenótipo ^(a)	Mutação	Códon	Curva HRM ^(b)
1	S	Não		Cza
2	R	GAG/GCG	198	P
16	R	GAG/GCG	198	P
21	R	GAG/GCG	198	P
27	R	GAG/GCG	198	P
33	R	GAG/GCG	198	P
56	R	GAG/GCG	198	P
57	R	GAG/GCG	198	P
66	R	GAG/GCG	198	P
78	R	GAG/GCG	198	P
89	R	GAG/GCG	198	P
92	R	GAG/GCG	198	P

^(a) S= sensível, R = resistente; ^(b) Cor da linha no gráfico: Cza = cinza, P = preta.

Tabela 4. Características fenotípica e genotípica de isolados de *Botrytis cinerea* frente a iprodiona.

Isolado	CE ₅₀ ^(a) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fr ^(b)	Fenótipo ^(c)	Mutação	Códon	Curva HRM ^(d)
1	0,25	0,32	S	Não		Cza cla
5	0,22	0,28	S	Não		Cza cla Cza cla
29	0,57	0,75	S	Não		
92	1,12	1,45	BR	ATC/AGC	365	Cza
110	1,16	1,51	BR	ATC/AAC	365	Cza 2
48	1,37	1,77	BR	ATC/AGC	365	Cza 2
58	1,46	1,89	BR	ATC/AGC	365	Cza 2 P
7	1,56	2,03	MR	CAG/CCG e AAC/AGC	369 e 373	
21	2,05	2,66	MR	ATC/AGC	365	Cza 2
84	2,60	3,37	MR	ATC/AGC	365	Cza 2
39	3,03	3,94	MR	ATC/AGC e CAG/CCG	365 e 369	P
83	4,00	5,20	MR	CAG/CCG e AAC/AGC	369 e 373	P

^(a) CE₅₀= concentração do i.a. capaz de inibir 50% do crescimento micelial; ^(b) Fr= Fator de resistência; ^(c) S= sensível, BR= baixa resistência, MR= moderada resistência; ^(d) Cor da linha no gráfico: Cza cla= cinza claro, Cza= cinza, P= preta.

Tabela 5. Características fenotípica e genotípica de isolados de *Botrytis cinerea* frente a boscalida.

Isolado	CE ₅₀ ^(a) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fr ^(b)	Fenótipo ^(c)	Mutação	Códon	Curvas HRM ^(d)
1A011	0,28	0,78	S	Não		Cza cla
27BO12	1,17	3,24	BR	TAC	272	P
8BO12	1,59	4,41	BR	TAC	272	P
22BO12	1,88	5,21	BR	CGC	272	Cza
64BO12	1,94	5,38	BR	TAC	272	P
71BO12	3,02	8,40	BR	CGC	272	Cza
30BO12	3,24	9,00	BR	CGC	272	Cza
56BO12	3,73	10,37	MR	CGC	272	Cza
66BO12	4,07	11,31	MR	TAC	272	P
92BO12	4,11	11,42	MR	TAC	272	P
48BO12	6,92	19,22	MR	CGC	272	Cza
13BO12	8,13	22,58	MR	CGC	272	Cza
99BO12	9,23	25,64	MR	TAC	272	P
51BO12	15,02	41,72	MR	CGC	272	Cza
76BO12	17,70	49,17	MR	CGC	272	Cza
93BO12	18,80	52,22	MR	TAC	272	P
116BO12	23,40	65,00	MR	TAC	272	P

^(a) CE₅₀= concentração do i.a. capaz de inibir 50% do crescimento micelial; ^(b) Fr= Fator de resistência; ^(c) S= sensível, BR= baixa resistência, MR= moderada resistência; ^(d) Cor da linha no gráfico: Cza cla= cinza claro, Cza= cinza, P= preta.

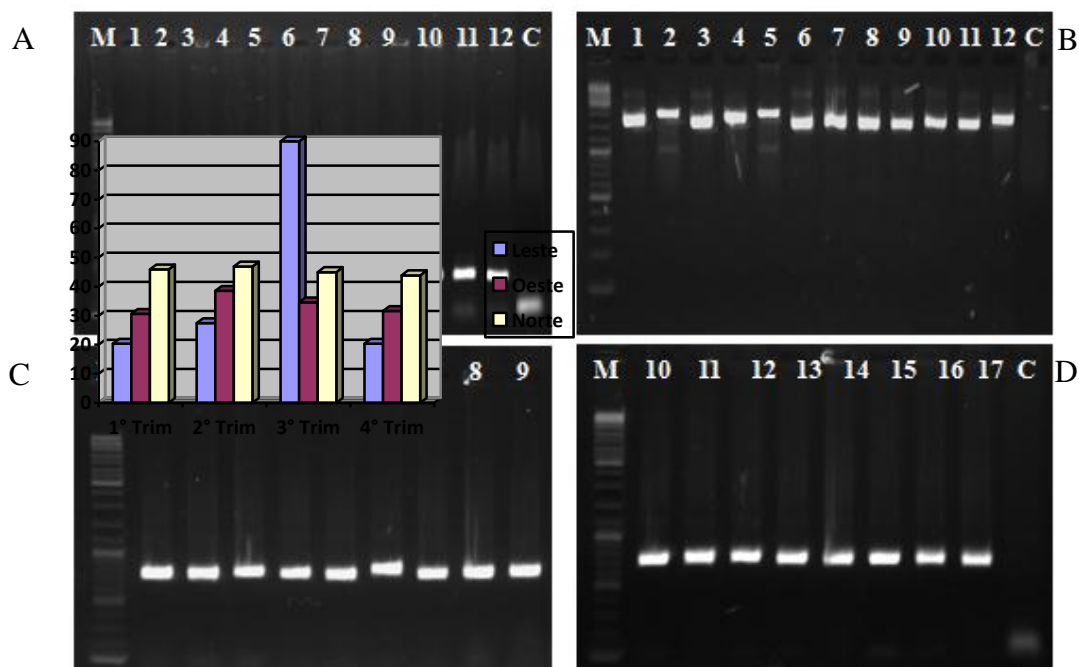
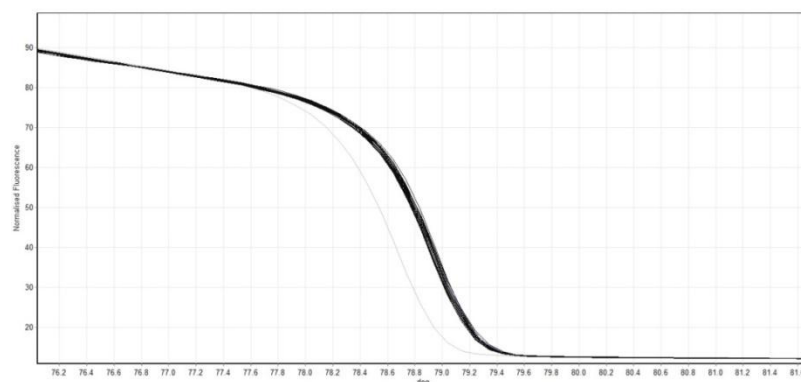
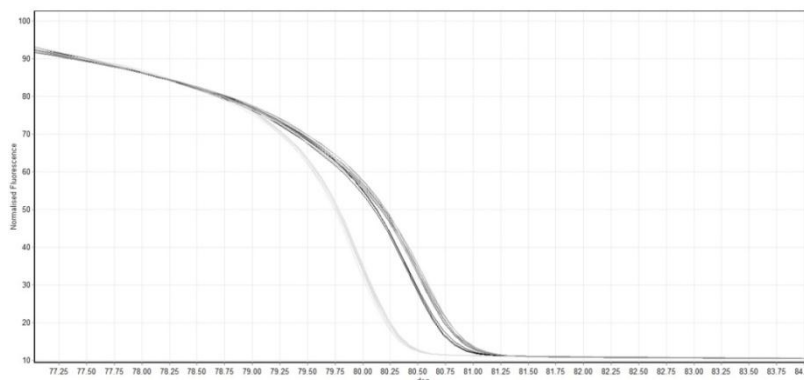


Figura 1. Produto das reações de PCR de amostras de *Botrytis cinerea* com primers (A) TUBF1/R1, Linha 1-12: 1, 2, 16, 21, 27, 33, 56, 57, 66, 78, 89, 92; (B) BCOS1F1/R2, Linha 1-12: 1, 5, 7, 21, 29, 39, 48, 58, 83, 84, 110; (C, D) SDHBF/R, Linha 1-9: 1, 8, 13, 27, 30, 48, 51, 56; Linha 10-17: 64, 66, 71, 76, 92, 93, 99, 116. M: marcador 1000 pb, GeneRulerTM; C: água.

A



B



C

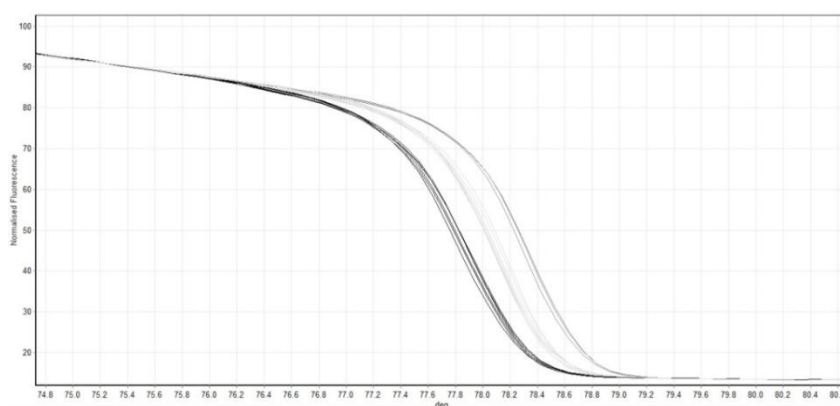


Figura 2. Curvas normalizadas de dissociação de alta resolução obtidas por PCR em tempo real. Amostras agrupadas com o isolado sensível, curvas de cor cinza claro. (A) isolado sensível e isolados agrupados com a referência da mutação E198A no gene *BenA* (preto), (B) isolados sensíveis, isolados agrupados à referência que contém a mutação I365S/N (cinza) e isolados agrupados com a mutação Q369P + I365S e Q369P+N373S no gene *BcOSI* (preto) (C) as amostras sensíveis, e amostras com a mutação H272Y (preto) e a H272R (cinza) no gene *SdhB*, O intervalo de confiança dentro de cada grupo >90%.

2.5 Discussão

Em geral, *B. cinerea* caracteriza-se por ser patógeno agressivo, ter alta variabilidade, esporular abundantemente e causar doenças policíclicas em mais de 200 espécies de plantas. Estas características, associadas à alta frequência de aplicações de fungicidas sítio-específicos, podem levar ao aumento do número de isolados resistentes a fungicidas na população do patógeno (Brent e Hollomon 2007). Assim, o fungo é um dos mais pesquisados quanto ao risco de resistência e um dos mais estudados no que tange ao uso de ferramentas moleculares para avaliar este risco. O presente estudo é pioneiro em acrescentar mais uma ferramenta.

Na análise da sequência parcial do gene *BenA*, observou-se a alteração no códon do aminoácido E198A, mutação amplamente distribuída geograficamente, e que confere alta resistência a benzimidazóis e sensibilidade a fenilcarbamatos. Em outras regiões, detectaram-se isolados com mutação em E198K/L e F200Y, associados à resistência aos dois grupos de fungicidas (Yarden e Katan 1993, Banno et al 2008). Na China, em hortaliças sob cultivo protegido, detectou-se a mutação E198V, em genótipos com resistência baixa para benzimidazóis e alta para fenilcarbamatos (Zhang et al 2010). Provavelmente, a única ocorrência da mutação E198A nas amostras analisadas deve-se à ausência de histórico de uso do fenilcarbamatos nos sistemas de produção amostrados. Provavelmente, este genótipo seja o primeiro a aparecer na população sensível do patógeno; as outras mutações aparecem em uma população com indivíduos resistentes com o uso dos fenilcarbamatos (Yarden e Katan 1993).

Na sequência parcial do gene *BcOSI*, observou-se alteração de aminoácidos nos códons I365S/N, Q369P e N373S. A ocorrência e o sítio de mutação determinaram o tipo de resistência: I365S ou I365N conferiram baixa resistência, enquanto Q369P e I365S ou N373S, conferiram resistência moderada a iprodiona. Estas mutações também já foram observadas, com resposta semelhante de resistência, porém a mutação I365S/N normalmente é relatada como associada à baixa e moderada resistência (Cui et al 2004, Oshima et al 2006, Ma et al 2007). Adicionalmente, as mutações nos sítios Q369H, V368F e T447S conferiram resistência moderada (Oshima et al 2006).

Na análise das sequências parciais do gene *SdhB*, constataram-se as alterações H272R e H272Y. Em populações de *B. cinerea* resistentes as carboxamidas nos EUA, França e Grécia, estas duas mutações foram detectadas, com predominância de H272Y nos EUA e França (Yin et al 2011, Leroux et al 2010) e de H272R na Grécia (Veloukas et al 2011). Detectou-se outra mutação no sítio 272 (H272L) em isolados de uva e

morango na França e Grécia (Leroux et al 2010, Veloukas et al 2011). Ocorreram substituições no códon 225 (P225F, P225T e P225L) (Veloukas et al 2011, Yin et al 2011) e no códon 230 (N230I) em isolados provenientes de culturas de uvas e morangos na França e Grécia (Leroux et al 2010, Veloukas et al 2011). Estes genótipos não são os dominantes nos isolados resistentes no campo e não foram detectados nas amostras analisadas no presente trabalho.

Na associação de mutação no gene *SdhB* aos diferentes fenótipos de resistência, as 16 sequências analisadas com mutação H272Y/R relacionaram-se, indistintamente, à baixa ou moderada resistência a boscalida. Em outros trabalhos, os dois genótipos foram moderadamente resistentes a boscalida (Leroux et al 2010, Veloukas et al 2011). As mutações em H272L, P225F e P225L associaram-se ao alto nível de resistência e, em P225T e N230I, a resistência moderada (Leroux et al 2010, Veloukas et al 2011). Deve-se, também, considerar a ocorrência de variação na sensibilidade, segundo os princípios ativos dos inibidores da enzima succinato desidrogenase. Recentemente, evidenciou-se alta variação na sensibilidade do patógeno ao grupo dos inibidores da enzima succinato desidrogenase, em função do ponto de mutação no gene *SdhB*. Para os autores, mutantes de H272R/Y tiveram resistência moderada a boscalida, mas variaram quanto à resistência ou sensibilidade a outros princípios ativos do mesmo grupo (Veloukas et al 2013). A ocorrência da mutação H272R/Y na população de *B. cinerea* analisada, sem aplicações de boscalida, evidencia o risco de aumentar os genótipos resistentes do patógeno com o uso do fungicida.

O mecanismo mais comum de resistência a fungicidas nos fungos fitopatogênicos é a alteração bioquímica do sítio-alvo dos fungicidas; outros mecanismos, como a redução da penetração do fungicida ou incremento na detoxificação da molécula tóxica, podem causar perda na sensibilidade (Leroux et al 2002). Na análise de HRM do gene *BcOSI*, duas amostras agrupadas com a referência de uma mutação associada à baixa resistência de iprodiona, foram moderadamente resistentes ($Fr < 2$), enquanto duas amostras agrupadas com as referências sensíveis, sem mutação no gene *SdhB*, tiveram baixa resistência a boscalida ($Fr = 3,61, 4,13$). Essa alteração da sensibilidade aos dois fungicidas testados, sem a mutação específica, poderia ser explicada pelo aumento do efluxo do fungicida por meio da super-expressão dos transportadores de cassetes de ligação de ATP (ABC) e superfamília dos facilitadores majoritários (MFS) (Mernke et al 2011, Kretschmer et al 2009, Leroux et al 2010). Assim, possivelmente, a super-expressão dos MFS causou um aumento do efluxo de boscalida, sendo responsável pelo fenótipo de resistência a múltiplas drogas

(Leroux et al 2010). Sabe-se que este mecanismo está associado à resistência a múltiplas drogas, e foi relatado em isolados de *B. cinerea* de videiras na França e Alemanha (Kretschmer et al 2009, Leroch et al 2011, Mernke et al 2011).

A presença de sítios específicos de mutação nos genes *BenA*, *BcOSI* e *SdhB* associados à resistência a benzimidazóis, dicarboximidas, carboxamidas, respectivamente, possibilita usar técnicas moleculares no monitoramento da resistência no campo. Assim, aplicam-se NESTED-PCR-RFLP (Saito et al 2009), PCR-RFLP (Malandrakis et al 2011), PIRA-PCR (Luo et al 2009), PCR alelo-específico (Bardas et al 2010) e PCR alelo-específico em tempo real (Fraaije et al 2002) para detectar genótipos resistentes de vários fitopatógenos. A técnica RT-PCR-HRM aplica-se na detecção de mutação relacionada à resistência de patógenos humanos a fármacos, mas ainda não foi usada na detecção de resistência de fitopatógenos a fungicidas. Este é o primeiro relato sobre o uso da HRM para detectar a mutação em *B. cinerea* relacionada à resistência a tiofanato metílico, iprodiona e boscalida.

Houve concordância do resultado obtido com a HRM e as análises das sequências dos genes *BenA*, *BcOSI* e *SdhB*. As amostras da reação do *BenA* com a mutação E198A formaram um único grupo diferente do sensível, coincidente com os resultados obtidos em 15 isolados de *Colletotrichum magna* (R.J do Nascimento, comunicação pessoal). Estes resultados são semelhantes aos obtidos na área médica, em que a HRM foi eficiente na detecção da mutação relacionada à resistência de *Plasmodium falciparum* a uma droga anti-malária. Porém, a técnica não foi eficiente na detecção de mutações em códons próximos (*Pfdhps* 436/437 e *Pfdhfr* 51/59). Outra limitação da técnica é que não foi concebida para detectar isolados contendo mistura de alelos. No entanto, a prevalência de mutações pode ser determinada (Andriantsoanirina et al 2009). A HRM é uma técnica que não suplanta os protocolos convencionais (Daniels et al 2012). Por essa razão, é necessário o sequenciamento para caracterizar mutações novas. Por outro lado, quando a resistência a fungicidas não se deve unicamente à mutação no sítio do fungicida, os métodos fenotípicos em placa devem ser usados para caracterizar isolados quanto à sensibilidade a fungicidas. A principal aplicação será na análise de mutações específicas que conferem resistência a fungicidas. Este é o primeiro relato da ocorrência de mutações nos genes *BenA*, *BcOSI* e *SdhB* associadas à resistência dos benzimidazóis, dicarboximidas e carboxamidas no Brasil. É também a primeira aplicação da HRM para a detecção de mutações em *B. cinerea* associadas à resistência. Em vista das condições controladas do experimento e do reduzido número de sequências caracterizadas por sequenciamento 12 (*BenA*), 12

(*BcOS1*) e 17 (*SdhB*), não é possível confirmar a repetibilidade dos resultados no laboratório nas condições de campo. Assim, maior número de sequências dos genes de isolados provenientes de outras espécies de plantas e genes associados a outros fungicidas deverão ser analisados para avaliar a sensibilidade, especificidade e o potencial do uso da técnica. Ensaios com misturas artificiais de amostras em diferentes proporções deverão ser implementados, assim também determinar o limite de cópias de DNA a ser detectada. Contudo, a HRM tem grande potencial de uso no monitoramento da resistência nas lavouras, o que possibilitará implementar medidas de controle para reduzir a pressão de seleção dos indivíduos resistentes.

2.6 Agradecimentos

Aos técnicos do Escritório Local da Emater-MG de Alfredo Vasconcelos, Tadeu C.G. Azevedo e Dione M.A.V. Moraes, produtores de rosas de Alfredo Vasconcelos-MG, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2.7 Referências

Andriantsoanirina, V., Lascombes, V., Ratsimbaoa, A., Bouchier, C., Hoffman, J., Tichit, M., Rabarijaona, L.-P., Durand, R., and Ménard, D. 2009. Rapid detection of point mutations in *Plasmodium falciparum* genes associated with antimalarial drugs resistance by using high-resolution melting analysis. *J. Microbiol. Meth.* 78:165-170.

Banno, S., Fukumori, F., Ichiishi, A., Okada, K., Kimura, M., and Fujimura, M. 2008. Genotyping of benzimidazoles-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* 98:397-404.

Bardas, G. A., Veloukas, T., Koutitab, O., and Karaoglanidisa, G. S. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest. Manag. Sci.* 66:967-973.

Bass, C., Nikou, D., Donnelly, M.J., Williamson, M.S., Ranson, H., Ball, A., Vontas, J.,

and Field, L.M., 2007. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malar. J.* 6:1-14.

Beever, R. E., Laracy, E. P., and Pak, H. A. 1989. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. *Plant Pathol.* 38:427-437.

Brent, K., and Hollomon D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph N° 1. Online: <http://www.frac.info/frac/index.htm>.

Cui, W., Beever, R. E., Parkes, S. L., and Templeton, M. 2004. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. *Phytopathology* 94:1129-1135.

Daniels, R., Ndiaye, D., Wall, M., McKinney, J., Séne, P. D., Sabeti, P. C., Volkman, S. K., Mboup, S., and Wirtha, D. F. 2012. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of single-nucleotide polymorphisms associated with drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 2976-2986.

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* 32:1792-1797

Elad, I., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N. 2004. *Botrytis*: Biology, pathology and control. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. The Netherlands. 428p.

Fraaijea, B. A., Buttersb, J. A., Coelhoa, J. M., Jonesc, D. R., and Hollomonb, D. W. 2002. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol.* 51:45-54.

Ganopoulos, I., Madesis, P., Zambounis, A., and Tsaftaris, A. 2012. High-resolution melting analysis allowed fast and accurate closed-tube genotyping of *Fusarium oxysporum* formae speciales complex. *FEMS Microbiol. Lett.* 334:6-21.

Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M. E., Romero, G., Silvera, E., González, P., Rebellato, J., Ferreira, Y., and Bentancur, O. 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia* 16:97-107.

Goldschmidt, P., Degorge, S., Che Sarria, P., Benallaoua, D., Semoun, O., Borderie, V., Laroche, L., and Chaumeil, C. 2012. New strategy for rapid diagnosis and characterization of fungal infections: the example of corneal scrapings. *Plos One*. 7: e37660.

Online:

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0037660>.

doi:10.1371/journal.pone.0037660.

Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Wittwer, C. T., and Voelkerding, K.V. 2007. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin. Chem*. 53:1544-1548.

Jiang, J., Ding, L., Michailides, T. J., Li, H., and Ma, Z. 2009. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pest Phys*. 93:72-76.

Korolev, N., Mamiev, M., Zahavi, T., and Elad, Y. 2011. Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. *Eur. J. Plant. Pathol*. 129:591-608.

Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.-J., Pradier, J.-M., Leroux, P., De Waard, M. A., and Hahn, M. 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Plos Pathog*. 5: e100069. Online: <http://www.plospathogens.org/article/info3Adoi2F10.13712Fjournal.ppat.1000696>. doi:10.1371/journal.ppat.

Leroch, M., Kretschmer, M., and Hahn, M. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. *J. Phytopathol*. 159:63-65.

Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* 58:876-888.

Leroux, P. 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In Elad Y, Williamson P, Tudzinski, P., and Delen, N. (Eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control* pp. 195-222. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., and Walker, A.-S. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *App. Environ. Microbiol.* 76:6615-6630.

Li, B.-S., Wang, X.-Y., Ma, F.-L., Jiang, B., Song, X.-X., Jiang, B., Song, X.-X., and Xu, A.-G. 2011. Is high resolution melting analysis (HRMA) accurate for detection of human disease-associated mutations? A meta analysis. *Plos One* 6: e28078. online: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0028078>. doi:10.1371/journal.pone.0028078.

Li, W., Matsuoka, M., Kai, M., Thapa, P., Khadge, S., Hagge, D. A., Brennan, P. J., and Vissa, V. 2012. Real-time PCR and high-resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. *J. Clin Microbiol.* 50:742-753.

Lin, J.-H., Tseng, C.-P., Chen, Y.-J., Lin, C.-Y., Chang, S.-S., Wu, H.-S., and Cheng, J.-C. 2008. Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic screening for virus variants by high resolution melting analysis. *J. Clin. Microbiol.* 46:1090-1097.

Luo, Q. Q., Xu, J. Q., Hou, Y. P., Chen, C. J., Wang, J. X., Zhou, and M. G. 2009. PIRA-PCR for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with moderate resistance to carbendazim. *Plant Pathol.* 58:882-887.

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

Ma, Z., Yan, L., Luo, Y., and Michailides, T. J. 2007. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pest. Biochem. Physiol.* 88: 300-306.

Malandrakis, A. A., Markoglou, A. N., and Ziogas, B. N. 2011. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *Botrytis cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. *Pest Biochem. Physiol.* 99:118-124.

Mernke, D., Dahm, S., Walker, A.-S, Lalève, A., Fillinger, S., Leroch, M., and Hahn, M. 2011. Two promoter rearrangements in a drug efflux transporter gene are responsible for the appearance and spread of multidrug resistance phenotype MDR2 in *Botrytis cinerea* isolates in French and German vineyards. *Phytopathology* 101:1176-1183.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT. Online: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.

Oshima, M., Fujimura, M., Banno, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A., and Yamaguchi, I. 2002. A point mutation in the two component histidine kinase *BcOS1* gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 92:75-80.

Oshima, M., Banno, S., Okada, K., Takeuchi, T., Kimura, M., Ichiishi, A., Yamaguchi, I., and Fujimura, M. 2006. Survey of mutations of a histidine kinase gene *BcOS1* in dicarboximide resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:65-73.

Ramirez, M. V., Cowart, K. C., Campbell, P. J., Morlock, G. P., Sikes, D., Winchell, J. M., and Posey, J. E. 2010. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 48:4003-4009.

Saito, S., Suzuki S., and Takayanagi, T. 2009. Nested PCR-RFLP is a high-speed method to detect fungicide-resistant *Botrytis cinerea* at an early growth stage of grapes.

Pest Manag. Sci. 65:197-204.

Simenc, J., and Potocnik, U. 2011. Rapid differentiation of bacterial species by high resolution melting curve analysis. *Appl. Biochem. Microbiol.* 47:256-263.

Sun, H.-Y., Wang, H.-C., Chen Y., Li, H.-X., Chen, C.-J., and Zhou, M.-G. 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. *Plant Dis.* 94:551-556.

Topolovec-Pintaric, S. 2009. Resistance risk to new botryticides in *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in wine growing areas in Croatia. *J. Plant. Dis. Prot.* 116:73-77.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

Weber, R. W. S. 2011. Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in Northern German small-fruit production. *Plant Dis.* 95:1263-1269.

Varillas, D., Bermejo-Martin, J. F., Almansa, R., Rojo, S., Nogueira, B., Eiros, J. M., Rico, L., Iglesias, V., and Lejarazu, R. O. 2010. A new method for detection of pandemic influenza virus using high resolution melting analysis of the neuraminidase gene. *J. Virol. Methods.* 171:284-286.

Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M., and Karaoglanidis, G. S. 2011. Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Dis.* 95:1302-1307.

Veloukas, T., Markoglou, A. N., and Karaoglanidis, G. S. 2013. Differential effect of *SdhB* gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 97:118-122.

Volpin, H., and Elad, Y. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 81:1390-1394.

Yarden, O., and Katan, T. 1993. Mutation leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83:1478-1483.

Yin, Y. N., Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101:986-995.

Yourman, L. F., Jeffers, S. N., and Dean, R. A. 2001. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* 91: 307-315.

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

Zhang, C. Q., Hu, J. L., Wei, F. L., and Zhu, G. N. 2009. Evolution of resistance to different classes of fungicides in *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables in eastern China. *Phytoparasitica* 37:351-359.

Zhang, C. Q., Liu, Y. U., and Zhu, G. N. 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. *Eur. J. Plant Pathol.* 126:509-515.

CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que:

- i. os isolados de *Botrytis cinerea* são variáveis quanto à agressividade a pétalas de rosas e não se diferenciam segundo as regiões amostradas;
- ii. a população de *B. cinerea* analisada é resistente a tiofanato metílico;
- iii. de maneira geral, a população analisada é sensível a iprodiona e a boscalida apesar de incluir indivíduos resistentes aos dois fungicidas;
- iv. há mutação nos sítios das sequências parciais dos genes *BenA* (E198A), *BcOSI* (I365N/S, Q369P e N373S) e *SdhB* (H272R/Y), associada à resistência a tiofanato metílico (benzimidazol), iprodiona (dicarboximida) e boscalida (carboxamida), respectivamente; e
- v. a dissociação de alta resolução (HRM) é técnica com alto potencial de uso para detectar a resistência a fungicidas no campo.