

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *BOTRYTIS
CINEREA*, OBTIDOS DE MAÇÃS, A TIOFANATO
METÁLICO, PIRACLOSTROBINA E PIRIMETANIL**

Pablo Schulman
Magister Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S386s
2015

Schulman, Pablo, 1989-
Sensibilidade de isolados de *Botrytis cinerea*, obtidos de
maçãs, a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil / Pablo
Schulman. – Viçosa, MG, 2015.
v, 30f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.23-30.

1. Maça - Doenças e pragas. 2. *Botrytis cinerea*. 3. Mofo
cinzento - Efeito de fungicida. 4. Fungicida. 5. Maça -
Resistência a doenças e pragas. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 635.924

PABLO SCHULMAN

**SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *BOTRYTIS CINEREA*,
OBTIDOS DE MAÇÃS, A TIOFANATO METÁLICO,
PIRACLOSTROBINA E PIRIMETANIL**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

PABLO SCHULMAN

**SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *BOTRYTIS CINEREA*,
OBTIDOS DE MAÇÃS, A TIOFANATO METÁLICO,
PIRACLOSTROBINA E PIRIMETANIL**

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

APROVADA: 30 de março de 2015

Rosa Maria V. Sanhueza

Gilcianny Pignata Cavalcante

Eduardo Seiti G. Mizubuti
(coorientador)

Luiz Antonio Maffia
(orientador)

À minha filha, Helena, a minha fonte de
inspiração e o principal motivo de eu
acordar todos os dias e dar o meu
melhor.

Dedico

Sumário

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Isolados de <i>Botrytis cinerea</i>	9
3.2. Resistência <i>in vitro</i> a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil.....	9
3.3. Análise de sequência de DNA dos genes da β -tubulina e do citocromo B de isolados resistentes e sensíveis.....	10
3.4. Identificação de mutação por HRMA	11
4. RESULTADOS	13
4.1. Resistência <i>in vitro</i> a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil.....	13
4.2. Análise de sequência de DNA dos genes da β -tubulina e do citocromo B de isolados resistentes e sensíveis.....	13
4.3. Identificação de mutação por HRMA	16
5. DISCUSSÃO	17
CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

SCHULMAN, Pablo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Sensibilidade de isolados de *Botrytis cinerea*, obtidos de maçãs, a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil.** Orientador: Luiz Antonio Maffia. Coorientador: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Botrytis cinerea Pers. Fr. infecta mais de 200 espécies de plantas e causa o mofo cinzento, induzindo perdas em várias culturas. O controle do mofo cinzento baseia-se em fungicidas, mas o número excessivo de pulverizações e a alta variabilidade do patógeno podem levar à seleção de isolados resistentes. No Brasil, pouco se conhece sobre a resistência de *B. cinerea* a fungicidas comumente usados nas lavouras de maçã. Assim, avaliou-se a sensibilidade de 44 isolados a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil, em teste de inibição do crescimento micelial, e sequenciou-se o fragmento de DNA para caracterizar o genótipo de resistência. Adicionalmente, usou-se a High Resolution Melting Analysis (HRMA) para detectar variações nas sequências dos genes associados à resistência. Na população estudada, detectou-se resistência aos três fungicidas. Recomendam-se as concentrações de 10 µg.ml⁻¹ (para tiofanato metílico e piraclostrobina) e 1 µg.ml⁻¹ (para pirimetanil) como doses discriminatórias. Detectaram-se as mutações E198A e G143A associadas à resistência a tiofanato metílico e piraclostrobina, respectivamente. Com a técnica de HRMA discriminaram-se os genótipos sensíveis e resistentes aos dois fungicidas, e os resultados obtidos foram concordantes com os obtidos no sequenciamento. Concluiu-se haver perda de sensibilidade a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil em *B. cinerea* que infecta maçãs no Brasil, e que se pode usar a HRMA para identificar mutações no patógeno, associadas à resistência a tiofanato metílico e piraclostrobina.

ABSTRACT

SCHULMAN, Pablo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2015. **Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from apple to methyl thiophanate, pyraclostrobin and pyrimethanil.** Advisor: Luiz Antonio Maffia. Co-advisor: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Botrytis cinerea Pers. Fr. infects over 200 plant species and causes gray mold, a destructive disease in many crops. Gray mold control is based on fungicide applications, and the excessive number of applications and the high pathogen variability may lead to selection of resistant isolates. Little is known about *B. cinerea* resistance to the commonly used fungicides in apple orchards of Brazil. Thus, we evaluated the resistance of 44 isolates to methyl thiophanate, pyraclostrobin and pyrimethanil through a mycelial growth inhibition essay, and we sequenced a DNA fragment to characterize the resistant genotype. We also used the High Resolution Melting Analysis (HRMA) to detect variations in the sequence of the genes associated to fungicide resistance. In the mycelial growth essay, resistance to the three fungicides was detected in the population. We recommend $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (to methyl thiophanate and pyraclostrobin) and $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (to pyrimethanil) as discriminatory doses. We found the mutations E198A e G143A associated with resistance to methyl thiophanate and pyraclostrobin, respectively. The HRMA discriminated both sensible and resistant genotypes to both fungicides, and matched the results found on sequencing. In conclusion, there is sensitivity loss to methyl thiophanate, pyraclostrobin and pyrimethanil in the *B. cinerea* population infecting apple fruits in Brazil, and HRMA can be used to identify mutations associated to resistance to methyl thiophanate and pyraclostrobin in the pathogen population.

1. INTRODUÇÃO

Botrytis cinerea Pers. Fr., agente etiológico do mofo cinzento, infecta mais de 200 espécies de plantas (Williamson et al. 2007, Amiri et al. 2014) e causa perdas em várias culturas como roseiras, tomateiros, videiras, macieiras e pereiras. O controle da doença baseia-se no uso de fungicidas, principalmente os sistêmicos (Topolovec-Pintarić 2011). Entretanto, o número excessivo de aplicações requeridas para controle da doença e a alta variabilidade do patógeno podem levar à seleção de isolados resistentes (Samuel et al. 2011). *Botrytis cinerea* é considerado patógeno com alto risco de desenvolvimento de resistência (Russell 2002), principalmente a fungicidas sistêmicos. Em 1971, detectaram-se isolados resistentes aos benzimidazóis (Bollen & Scholten 1971). Desde então, observaram-se isolados resistentes a dicarboximidas (Katan 1982), benzimidazóis (Luck & Gillings 1995), estrobilurinas (Myresiotis et al. 2008) e anilinopirimidinas (Leroux & Gredt 1995). No Brasil, relataram-se isolados obtidos de eucalipto resistentes a benomil (Silva & Coelho 2003) e de roseira à iprodiona, boscalida e tiofanato metílico (Silvera-Perez 2013).

Dentre os fatores que podem levar à resistência a fungicidas, o mais comum e importante é a mudança na conformação das proteínas afetadas pelo princípio ativo, sem perder a funcionalidade, mas com redução da sensibilidade ao produto. Este mecanismo, denominado de resistência específica, normalmente leva à resistência a uma molécula ou classe de fungicidas (Leroux et al. 2010), e pode ser causado por mutações pontuais ou de inserção/deleção no gene correspondente da proteína afetada (Brent et al. 2007).

A constatação da resistência a fungicidas é de extrema importância para a agricultura, pois a partir da detecção de isolados resistentes pode-se direcionar o manejo da doença de forma a reduzir a ocorrência de tais isolados. Nos métodos *in vitro* convencionais para detectar a resistência a fungicidas, isola-se o patógeno em cultura pura e efetuam-se testes em meio de cultura com o produto. Atualmente, podem-se usar técnicas moleculares para detectar genótipos de *B. cinerea* resistentes a fungicidas. Uma técnica recente, que vem sendo usada para a genotipação e varredura de mutações, é a análise de dissociação em alta resolução (*High Resolution Melting Analysis*, HRMA) (Gundry et al. 2003). Apesar de bastante usada na medicina, a HRMA é pouco adotada na fitopatologia. Por exemplo, foi usada para genotipar *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* por meio da curva de dissociação da região ITS do fungo (Ganopoulos et al. 2012) e para detectar, em *B. cinerea*, a resistência à fenehexamida e boscalida na Grécia

(Chatzidimopoulos et al. 2014) e à iprodiona, boscalida e tiofanato metílico no Brasil (Silvera-Perez 2013).

Apesar de o mofo cinzento ser importante para as rosáceas frutíferas no Brasil, há carência de estudos de avaliação de sensibilidade de *B. cinerea* aos fungicidas usados no programa de controle. Portanto, objetivou-se avaliar a sensibilidade de isolados obtidos de maçãs refrigeradas da região Sul a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil, por meio de ensaios *in vitro*, e de piraclostrobina e tiofanato metílico, com a HRMA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Botrytis cinerea Pers. Fr. (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), agente causal do mofo cinzento, é patógeno necrotrófico, com ampla gama de hospedeiros, e pode causar perdas em mais de 200 culturas, como ornamentais (rosa, tulipa, lírio), olerícolas (tomate, pepino, alface, morango) ou fruteiras (uva, maçã, pêra) (Williamson et al. 2007). O patógeno pode ocorrer em sementes (Barnes & Shaw 2003) e em partes aéreas de plantas (folhas, flores, frutos, gemas ou haste) e, da infecção resultam sintomas que variam de lesões bem delimitadas a podridões-moles ou podridões-secas (Elad et al. 2004).

O fungo tem micélio branco, aéreo; conidióforos retos a levemente sinuosos, ramificados alternada ou dicotomicamente, parede espessa, e escuros tornando-se mais claros no ápice; conídios ovóides a elipsóides, lisos, com hilo levemente protuberante, 8-16 x 6-12 µm, hialinos a levemente escuros; e produz escleródios negros (Coley-Smith et al. 1980, Soares et al. 2009). Em *B. cinerea*, há altas taxas de germinação de conídios, infecção, crescimento de micélio e conidiação sob várias faixas de condições microclimáticas (Elad et al. 2004). O ótimo estimado para *B. cinerea* infectar é 20 °C (Bulger et al. 1987) e, para esporular, 15-22 °C (Sosa-Alvarez et al. 1995), mas o fungo pode ocorrer em diferentes ambientes na presença de hospedeiros, tanto no Alasca (Anderson 1924), bem como em Israel (Rotem 1981, Yunis & Elad 1989). Uma das implicações dessa versatilidade é a atividade do fungo em temperaturas próximas a 0 °C (Brooks & Cooley 1917), o que o torna um dos patógenos mais importantes em pós-colheita (Droby & Lichter 2004).

Controla-se *B. cinerea* quimicamente com fungicidas sistêmicos, e os protetores são considerados fracos botriticidas (Topolovec-Pintarić 2011). No Brasil, os fungicidas usados no controle do patógeno em várias culturas incluem dicarboximidas (iprodiona, procimidona), benzimidazóis (tiofanato metílico) e anilino-pirimidinas (pirimetanil) (AGROFIT 2003). Em outros países, usam-se outros botriticidas, como hidroxianilida (fenhexamida), estrobilurinas (piraclostrobina, azoxistrobina) e fenilpirroles (fludioxonil).

Em vista da alta virulência e da abundante esporulação do patógeno, comumente efetua-se grande número de aplicações de fungicidas para o controle do mofo cinzento. Dessa forma, aumenta-se o risco de seleção de isolados resistentes (Samuel et al. 2011) e, em vista da alta variabilidade, *B. cinerea* é considerado patógeno com alto risco de desenvolvimento de resistência (Russell 2002). O primeiro relato de resistência de *B.*

cinerea a fungicidas sistêmicos, no caso benzimidazóis (tiofanato metílico, benomil), foi em 1971 (Bollen & Scholten 1971), seguindo-se relatos de resistência a dicarboximidas (iprodiona, procimidona, vinclozolin) (Katan 1982), ciprodinil (Forster & Staub 1996), pirimetanil (Leroux et al. 1999), fenehexamida (Baroffio et al. 2003) e piraclostrobina (Myresiotis et al. 2008). No Brasil, detectou-se a resistência de isolados de eucalipto a benomil (Silva & Coelho 2003) e de roseiras a iprodiona, boscalida e tiofanato metílico (Silvera-Perez 2013).

A resistência a fungicidas é associada a vários mecanismos, destacando-se a: (i) superexpressão do gene que codifica o sítio alvo; (ii) ativação de uma rota alternativa, que compense a inibição da rota principal; (iii) detoxificação do fungicida ou menores níveis de ativação da molécula do fungicida; (iv) redução do influxo ou aumento do efluxo do fungicida, o que reduz o conteúdo de fungicida na célula, e (v) mudança na conformação das proteínas afetadas, o que inaltera a funcionalidade mas reduz a sensibilidade a fungicidas (Brent et al. 2007). Para os autores, o último mecanismo é o mais comum, e pode ser causado por mutações pontuais ou de inserção/deleção no gene correspondente. Considerando estes mecanismos, os de números (i), (ii) e (v) normalmente levam à resistência a uma molécula ou classe de fungicidas (resistência específica), enquanto (iii) e (iv) relacionam-se ao menor nível de resistência a vários fungicidas (Leroux et al. 2010).

Os benzimidazóis vêm sendo usados no controle de doenças de plantas desde o final dos anos 1960, e com ação sítio específica que interfere na divisão celular (Damicone & Smith 2009). Mais especificamente, o princípio ativo tiofanato metílico liga-se à β -tubulina, um dos dois tipos de subunidades para a formação de microtúbulos, e, conseqüentemente, afeta vários processos, como a manutenção da forma celular, o transporte intracelular de moléculas, partículas e organelas, e a mitose e meiose (Davidse 1986). Dessa forma, inibe o desenvolvimento do tubo germinativo, a formação do apressório e o crescimento micelial (Reis et al. 2010). A resistência a benzimidazóis relaciona-se a mudanças na conformação do sítio de ação da β -tubulina, causada por mutações no gene *benA*, nos códons 6, 50, 198, 200 e 240 (principalmente 198 e 200) o que leva à resistência (Ma & Michailides 2005). Em *B. cinerea*, observaram-se as mutações E198A (ácido glutâmico para alanina no códon 198), E198K (ácido glutâmico para lisina no códon 198), F200Y (fenilalanina para tirosina no códon 200) (Yarden & Katan 1993), E198G (ácido glutâmico para valina no códon 198) (Banno et al. 2008) e E198V (ácido glutâmico para glicina no códon 198) (Ziogas et al. 2009). A resistência a

benzimidazóis ocorre, tende a ser estável, e é possível encontrar isolados resistentes mesmo anos após a interrupção do uso do fungicida (Topolovec-Pintarić 2011).

A classe das estrobilurinas (QoIs), descoberta em 1977 (Sauter et al. 1999) e comercializada pela primeira vez em 1996 (Morton & Staub 2008), atua na inibição da respiração, pois o princípio ativo, piraclostrobina, liga-se ao sítio da quinona externa do complexo citocromo bc1 (complexo III) e bloqueia a transferência de elétrons na rota da respiração, causando déficit de ATPs (Leroux et al. 2010). A quinona é codificada pelo gene *cytb* localizado na mitocôndria. Geralmente, a resistência aos QoIs ocorre por uma mutação pontual no gene *cytb*. As mutações pontuais F129L (fenilalanina para leucina no códon 129), G137R (glicina para arginina no códon 137) e G143A (glicina para alanina no códon 143) conferem resistência aos QoI sem haver perda da funcionalidade da proteína (Fungicide Resistance Action Committee 2006). Associa-se a mutação G143A à resistência completa e as mutações F129L e G137R, à resistência parcial (Fernández-Ortuño et al. 2012). Identificaram-se 39 espécies de fungos com resistência a QoIs: destas, a G143A é a mais frequente, ocorrendo em 29 delas; a mutação F129L ocorreu em cinco; e a mutação G137R ocorreu apenas em *Pyrenophora tritici-repentis* (Fungicide Resistance Action Committee 2012). Ainda segundo o Fungicide Resistance Action Committee (2012), não se conhece a mutação responsável pelo fenótipo de resistência em duas das 39 espécies. Em *B. cinerea*, G143A associa-se à resistência total, e Kim & Xiao (2010) e Fernández-Ortuño et al. (2012) detectaram esta mutação em todos os isolados com o fenótipo de resistência. Analisando-se a sequência do gene *cytb* de *B. cinerea*, encontraram-se isolados que possuíam um íntron entre os códons 143 e 144, os quais foram sensíveis a QoIs (Samuel et al. 2011). Acredita-se que a presença do íntron evite o desenvolvimento da mutação (Grasso et al. 2006).

As anilino pirimidinas, usadas pela primeira vez em 1992 (Morton & Staub 2008), atuam como inibidoras da biossíntese de metionina. Duas enzimas relacionam-se à biossíntese de metionina (cistationina γ -sintase e cistationina β -liase) e presume-se que a cistationina β -liase seja a molécula-alvo do princípio ativo, pirimetanil (Leroux et al. 2002). Os níveis de metionina e homocisteína (precursor de metionina) foram menores após tratamento com anilino pirimidinas e níveis ligeiramente maiores do precursor cistationina que no tratamento controle (Fritz et al. 1997). Relatou-se, também, que o tratamento com anilino pirimidinas preveniu a secreção de enzimas hidrolíticas (lipases, celulasas, proteases, cutinases) importantes no processo de infecção (Miura et al. 1994). As anilino pirimidinas não inibem a germinação de esporos, mas

prejudicam o alongamento do tubo germinativo e o crescimento inicial do micélio de *B. cinerea* (Rosslenbroich & Stuebler 2000). Detectou-se resistência a anilino pirimidinas em *B. cinerea* pouco tempo após a introdução desses fungicidas. Atualmente, supõe-se que a resistência seja monogênica, pois se observou segregação 1:1 em cruzamentos entre uma linhagem resistente e uma sensível (Hilber & Hilber-Bodmer 1998, Chapeland et al. 1999). Leroux et al. (1999) descrevem três fenótipos resistentes a anilino pirimidinas: AniR1, resistência moderada a alta, sem resistência cruzada a outros fungicidas; e AniR2 e AniR3, com baixa resistência e resistência cruzada com outros fungicidas; com respectivos genes de resistência *Ani1*, *Ani2* e *Ani3*. Inicialmente, propôs-se que a resistência originava-se de uma alteração no gene *BcmetC*, codificador da proteína cistationina β -lyase; mas não se obtiveram alterações nos níveis dessa proteína em isolados AniR1 e AniS, com sensibilidade a anilino pirimidinas (Fritz et al. 2003). Encontraram-se três mutações no gene *BcmetB* (codificador da proteína cistationina γ -sintase) de isolados AniR1, nos pontos 70, 144 e 190; as mutações nas posições 70 e 144 sempre ocorriam juntas; a mutação na posição 70 resultava na substituição de serina para fenilalanina no códon 24, a mutação 144 era silenciosa, e a mutação no ponto 190 gerava uma mudança de isoleucina para valina (no códon 64) (Sierotzki et al. 2002). As duas mutações expressas ocorrem na porção regulatória do gene, e podem tornar a cistationina γ -sintase insensível à repressão da metionina, o que resulta na superprodução de metionina, mas em vista da ocorrência de isolados sensíveis com essas mutações invalidou-se a proposta inicial (Leroux et al. 2002). Mais recentemente, compararam-se as sequências de quatro genes codificadores envolvidos na biossíntese e metabolismo de metionina e assimilação de sulfato – cistationina β -liase (*CBL*), cistationina γ -sintase (*CGS*), metionina sulfóxido redutase (*MsrB*) e sulfato permease (*SP2*) – e não se obtiveram diferenças de nucleotídeos entre isolados de *Aspergillus flavus* resistentes e sensíveis a pirimetanil (Liu et al. 2014). Para os autores, as quatro enzimas não se relacionam à resistência de *A. flavus* a anilino pirimidinas.

Fernández-Ortuño et al. (2015) encontraram isolados de *B. cinerea* resistentes a todos os fungicidas sítio-específicos registrados para o controle do mofo cinzento em morangueiro. A detecção de resistência é importante no manejo da doença; quando se detectam isolados resistentes, pode-se iniciar o manejo para conter a seleção dos mesmos, com a implantação de medidas alternativas de controle e redução do uso de princípios ativos de eficiência reduzida (Fernández-Ortuño et al. 2015). Para tal, adotam-se ensaios para avaliar a sensibilidade do patógeno. Um bom ensaio deve ser

robusto, confiável, reproduzível, simples (quanto à tecnologia empregada e às habilidades necessárias para realizá-lo), barato, de resultado rápido e deve poder relacionar os resultados às respostas de sensibilidade no campo (Russell 2002). Podem-se efetuar testes *in vivo* ou *in vitro*. Testes *in vivo* normalmente detectam a resistência em patógenos parasitas obrigatórios, ou patógenos em que os testes *in vitro* são inadequados (Russell 2002). Nos testes *in vivo*, normalmente avalia-se a sensibilidade determinando-se o efeito do fungicida no desenvolvimento da doença no hospedeiro. Os testes *in vitro* convencionais requerem culturas puras do patógeno e consequente repicagem para meios com o fungicida a ser testado.

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem auxiliado na detecção e monitoramento de resistência de fungos fitopatogênicos a fungicidas. Conhecido o mecanismo molecular de resistência, com os métodos baseados no uso de PCR pode-se aumentar o número de amostras a se testar, principalmente em patógenos biotróficos, o que aumenta a habilidade de avaliar a evolução da resistência a nível de população, por meio do monitoramento dos genótipos do patógeno (Brent et al. 2007). Há várias técnicas para detectar a resistência de *B. cinerea* a fungicidas: PCR (Luck & Gillings 1995, Oshima et al. 2002), PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) (Malandrakis et al. 2011), PCR alelo-específico (Yin et al. 2012) e nested PCR-RFLP (Saito et al. 2009). Atualmente, vem-se adotando a HRMA para a genotipação e varredura de mutações (Gundry et al. 2003). Com a HRMA, pode-se identificar variações na estrutura de sequências de ácidos nucleicos. Na presença de concentrações de corantes ligantes a DNA, aumenta-se a temperatura da solução e observa-se o comportamento da curva de dissociação. A intensidade da fluorescência diminui à medida que a fita dupla de DNA se separa em fitas simples e se libera o corante. A temperatura de dissociação (T_m) é aquela em que 50% do DNA se encontra em fita dupla e 50% em fita simples (dissociado), o que coincide com o ponto em que a intensidade da fluorescência é 50% do valor da intensidade máxima (antes do começo da dissociação) (Reed et al. 2007). A temperatura de dissociação é afetada pelo tamanho do amplicon (maior fragmento, maior T_m), conteúdo de GC (fragmentos mais ricos em GC tem T_m mais elevada) e heterozigose do alvo amplificado (Reed et al. 2007). A HRMA tem várias vantagens: é simples, não requer qualquer processamento pós-PCR, alta sensibilidade, especificidade e rapidez (Li et al. 2011). O custo inicial para uso da técnica é alto, com a aquisição de equipamentos de PCR em tempo real de maior precisão ótica e térmica, mas é compensado pelos baixos custos de

funcionamento do ensaio (Bass et al. 2007). Ademais, o processo é não destrutivo, e pode-se usar o amplicon após realizar a HRMA para outras técnicas. Já foi adotada na medicina para detectar mutações (Lin et al. 2011); genotipar organismos patogênicos (Payne et al. 2014); detectar espécies de vírus (Spandole et al. 2013) e diferenciá-las (Lin et al. 2008); detectar e diferenciar espécies de fungos leveduriformes (Arancia et al. 2011); e diferenciar espécies de bactérias (Šimenc & Potočnik 2011). Em fitopatologia, usou-se a HRMA para genotipar *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* por meio da curva de dissociação da região *ITS* do fungo (Ganopoulos et al. 2012), genotipar genes de avirulência (Carpezat et al. 2014) e genes de resistência em *Sclerotinia sclerotiorum* (Lehner et al. 2015), e diagnosticar infecção por fitopatógenos (Luchi et al. 2011, Holterman et al. 2012). Em *B. cinerea*, detectaram-se genótipos resistentes a fenexamida e boscalida (Chatzidimopoulos et al. 2014) e a benzimidazóis, inibidores da quinona externa e dicarboximidas (Chatzidimopoulos et al. 2014), enquanto que, no Brasil, Silvera-Perez (2013) detectou genótipos de resistência a benzimidazóis, iprodiona e boscalida.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados de *Botrytis cinerea*

Estudaram-se 44 isolados de *B. cinerea*, cedidos pela Dra. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, coletados de janeiro a setembro de 2013, em maçãs frigorificadas das variedades Fuji, Fuji Suprema e Pink Lady provenientes de cinco pomares de macieira (Tabela 1). Preservaram-se os isolados em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) em tubos de ensaio a 4 °C e em tiras de papel filtro esterilizado a -20 °C (Figueiredo & Pimentel 1975, Alfenas & Mafia 2007). Para extrair o DNA micelial, cultivaram-se os isolados em 50 mL de meio líquido de extrato de malte por 120 h, 23 °C, no escuro contínuo, sob agitação constante de 160 rpm. O micélio foi lavado por três vezes em água destilada, filtrado em papel filtro esterilizado e macerado, com o auxílio de nitrogênio líquido, em cadinho e pistilo de porcelana esterilizados. Extraíu-se o DNA com o Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega, Madison, WI), conforme recomendação do fabricante. Quantificou-se o DNA por espectrofotometria (NanoDrop 2000 Thermo Scientific) e ajustou-se a concentração de trabalho para 25 ng.µL⁻¹. Identificaram-se molecularmente os isolados por meio de PCR com os primers BC₁₀₈₊ (5'-ACCCGCACCTAATTCGTCAAC-3') e BC₅₆₃₋ (5'-GGGTCTTCGATACGGGAGAA-3') (Rigotti et al. 2006). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 95 °C (2 min) seguido de 34 ciclos de 94 °C (30 s), 60 °C (30 s) e 72 °C (40 s) e extensão final de 72 °C (5 min).

3.2. Resistência *in vitro* a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil

Avaliou-se a sensibilidade dos isolados aos fungicidas por meio de testes de inibição de crescimento micelial em meios BDA (tiofanato metílico e piraclostrobina) e Czapek-Dox (pirimetanil) (Amiri et al. 2013). Adicionaram-se soluções-estoque de Cercobin 700 WP (Ihara), Comet (BASF) e Mythos (Bayer CropScience) preparadas em DMSO em meio semi-fundente (temperatura em torno de 50 °C) para atingir concentrações finais de 0; 0,1; 1; 10; 100 e 500 µg.ml⁻¹ para tiofanato metílico; 0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg.ml⁻¹ para piraclostrobina; e 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 µg.ml⁻¹ para pirimetanil. Adicionalmente, para piraclostrobina, adicionou-se solução de ácido salicilhidroxâmico preparada em metanol para atingir concentração de 100 µg.ml⁻¹, para

inibir a rota da oxidase alternativa (Olaya & Köller 1999). Inverteram-se discos de micélio em crescimento ativo em placas de Petri que foram mantidas no escuro a 19 °C. Após 5 dias, mediu-se o raio do micélio em dois sentidos perpendiculares. Executou-se o experimento por duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições (uma placa de Petri com um disco de micélio = uma unidade experimental). Adicionou-se uma concentração adicional para isolados que tiveram crescimento superior a 50% da testemunha na maior concentração testada no primeiro ensaio de piraclostrobina e pirimetanil, que foi de 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente. Assim, analisaram-se os ensaios separadamente.

Para piraclostrobina, estimou-se a CE50 da porcentagem de inibição $\{1 - [(m\acute{e}dia \text{ de crescimento no fungicida}) / (m\acute{e}dia \text{ de crescimento no controle})] \times \log_{10} \text{ da concentra\c{c}\~ao do fungicida}\}$ usando-se o PROC REG do programa SAS v. 9.1. Todos os isolados com $CE_{50} \geq 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, foram considerados resistentes (Fernández-Ortuño et al. 2014). Para os demais fungicidas, usou-se o critério de dose discriminatória, onde dose discriminatória é a concentração em que isolados sensíveis e resistentes crescem $< 50\%$ e $\geq 50\%$ da média do crescimento da testemunha, respectivamente. Para tiofanato metílico, adotou-se 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ como dose discriminatória (Amiri et al. 2014, Fernández-Ortuño et al. 2014). Para pirimetanil, estabeleceram-se, com base em Latorre & Torres (2012) e Amiri et al. (2013), as concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; isolados com $CE_{50} < 1$ sendo considerados sensíveis, $CE_{50} \geq 1$ e $< 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, resistentes e com $CE_{50} \geq 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, muito resistentes.

Realizou-se um experimento adicional de inibição de crescimento micelial por piraclostrobina com todos os isolados mais um isolado tipo selvagem coletado na região de Viçosa-MG, adotando-se a concentração de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ como dose discriminatória. Executou-se o experimento por uma vez, em DIC, com três repetições (uma placa com disco de micélio = uma unidade experimental).

3.3. Análise de sequência de DNA dos genes da β -tubulina e do citocromo B de isolados resistentes e sensíveis

Usaram-se amostras de DNA de isolados sensíveis e resistentes a tiofanato metílico e piraclostrobina para as reações com o par de primers TUB-F1 (5'-GCTTTTGATCTCCAAGATCCG-3') e TUB-R1 (5'-CTGGTCAAAGGAGCAAA TCC-3') e com o par de primers 137S-F (5'-CTTGTGCTTTGCTTTGCTTTG-3') e

137S-R (5'-AACCATCTCCATCCACCATAC-3') (Yin et al. 2012), para amplificar a sequência parcial dos genes *benA* e *cytb*, respectivamente. A reação ocorreu na mistura de 25 µL (0,25 µL de cada primer; 12,5 µL de Toptaq Master Mix Kit (Qiagen, Germany); 0,5 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido); 2,5 µL de BSA (Albumina Sérica Bovina, 50 mg/mL, Sigma); 3 µL de DNA e 6 µL de H₂O ultra pura) em termociclador Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, Germany). As condições de amplificação dos primers TUB-F1/TUB-R1 consistiram em desnaturação inicial de 95 °C (2 min) seguido de 38 ciclos de 94 °C (30 s), 60 °C (30 s) e 72 °C (30 s) e extensão final de 72 °C (5 min) (Silvera-Perez 2013); dos primers 137S-F/137S-R em desnaturação inicial de 95 °C (2 min) seguido de 34 ciclos de 94 °C (30 s), 60 °C (1 min) e 72 °C (2 min) e extensão final de 72 °C (5 min). Separaram-se 4 µl da reação por eletroforese em gel TBE agarose 1%, corado com GelRed (Biotium) e foto-documentado sob luz ultravioleta. Purificaram-se os produtos das reações dos genes *benA* e *cytb* com ExoSap-IT (USB, Cleveland, Ohio), segundo recomendação do fabricante, e se enviaram os amplicons para sequenciamento. Para identificar a mutação associada à resistência, compararam-se as sequências parciais do gene *benA* de isolados considerados resistentes e sensíveis na fenotipagem e do gene *cytb* àquelas de um isolado considerado resistente (acesso JF689846.1) e de um isolado sensível (acesso JF689847.1). Realizaram-se os alinhamentos por meio do algoritmo MUSCLE (Edgar 2004) no programa MEGA 5.20.

3.4. Identificação de mutação por HRMA

Amplificou-se o DNA dos isolados em reações com o par de primers TUB-HPF1 (5'-TGTCGAGCCATATAACGCAA-3') e TUB-HPR1 (5'-CCAACTTTCGGA GATCTGAG-3') (Banno et al. 2008), e com o par de primers CG143-F (5'-CCCTACG GGCAAATGTCACT-3') e CG143-R (5'-GTCCAATTCATGGTACAGCACTCA-3') (Chatzidimopoulos et al. 2014). Realizou-se a HRMA no volume de 10 µL no Rotor-Gene Q (QIAGEN) com kit específico para HRM (Type-it HRM PCR Kit, QIAGEN, Valencia, CA). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C (5 min) seguido de 40 ciclos a 94 °C (30 s), 57 °C (30 s) e 72 °C (30 s) e extensão final a 72 °C (5 min). Processou-se a HRMA entre 60 e 99 °C, coletando-se os dados em intervalos de 0,1 °C.s⁻¹. Analisou-se o perfil de dissociação com o programa disponibilizado com o aparelho (versão 2.0.2), e normalizaram-se as curvas de HRMA

entre as regiões pré e pós-dissociação com os valores 79,12 – 81,32 e 82,89 – 84,79; e 72,51 – 74,41 e 77,72 – 79,62 para reações com pares de primers TUB-HPF1/TUB-HPR1 e CG143-F/CG143-F, respectivamente. Executou-se a HRMA uma vez, com três repetições por isolado.

4. RESULTADOS

4.1. Resistência *in vitro* a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil

Dos 44 isolados, 36 foram resistentes a tiofanato metílico (Tabela 1), representando 82% da população (Tabela 2). Os isolados sensíveis não tiveram crescimento superior a 50% em relação à testemunha quando a concentração foi $\geq 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, mas, quatro deles cresceram na maior concentração testada ($500 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Cinco dos isolados sensíveis originaram-se da mesma propriedade de onde coletaram-se 15 isolados. Os isolados resistentes cresceram na concentração de $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$, crescimento similar ao ocorrido na testemunha.

Para piraclostrobina, os valores de CE50 variaram de $12,56 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a $1841,32 \mu\text{g.ml}^{-1}$ no primeiro experimento e de $14,72 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a $655,10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ no segundo. Assim, considerou-se que todos os isolados foram resistentes (Tabela 1 e 2). Em ambos os experimentos, os valores de CE50 variaram de 10 a $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$; para alguns isolados, os valores ultrapassaram $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Figura 1). Realizou-se um terceiro experimento de inibição micelial, com os 44 isolados e um tipo selvagem (sensível), para testar a concentração de $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ como dose discriminatória, com a qual se separou o isolado sensível dos resistentes.

Para pirimetanil, em nove isolados obteve-se $\text{CE50} < 1 \mu\text{g.ml}^{-1}$, em 22 $\text{CE50} > 1$ e $< 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, e em 13 $\text{CE50} \geq 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, ou seja, nove isolados foram sensíveis, 22 resistentes e 13 muito resistentes (Tabela 1), que representam 20,45%; 50% e 29,55% da população, respectivamente (Tabela 2).

4.2. Análise de sequência de DNA dos genes da β -tubulina e do citocromo B de isolados resistentes e sensíveis

Amplificou-se o gene parcial da beta-butulina (*benA*) e, para todos os isolados, obteve-se um amplicon de aproximadamente 347 pb. Após sequenciamento, em todos os isolados considerados resistentes detectou-se a mutação E198A (ácido glutâmico para alanina no códon 198). Na amplificação com o par de primers 137S-F/137S-R, gerou-se um padrão de banda de aproximadamente 685 pb. Todos os amplicons tiveram a mutação G143A, que confere resistência total a QoIs.

Tabela 1. Reação a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea*, coletados em 2013 em pomares de macieira em São Joaquim - SC (isolados G1) e Vacaria - RS (demais isolados) (Resultados obtidos no experimento 2)

Isolado	Variedade	Tiofanato metílico		Piraclostrobina		Pirimetanil	
		CE50	RF	CE50	RF	CE50	RF
G1 19* ²	Fuji Suprema	< 10	S	14,73	R	< 1	S
G1.20* ²	Fuji Suprema	> 500	R	53,75	R	≥ 1 e < 10	R
G1.3* ²	Fuji Suprema	< 10	S	67,48	R	< 1	S
G2.11* ²	Fuji Suprema	> 500	R	645,07	R	≥ 10	MR
GUABIJU 33* ³	Fuji	> 500	R	655,11	R	≥ 1 e < 10	R
RAG 1* ³	Fuji	> 500	R	227,29	R	≥ 1 e < 10	R
RAG 13* ³	Fuji	> 500	R	40,82	R	≥ 1 e < 10	R
RAG 18* ³	Fuji	> 500	R	44,65	R	≥ 1 e < 10	R
RAG 22* ³	Fuji	< 10	S	80,46	R	≥ 10	MR
RAG 23* ³	Fuji	< 10	S	232,70	R	< 1	S
RAG 26* ³	Fuji	> 500	R	86,26	R	≥ 1 e < 10	R
RAG 28* ³	Fuji	> 500	R	364,86	R	≥ 1 e < 10	R
RAG 3* ³	Fuji	> 500	R	34,44	R	≥ 1 e < 10	R
RAG 33* ³	Fuji	> 500	R	34,77	R	≥ 1 e < 10	R
RAG 39* ³	Fuji	> 500	R	94,87	R	≥ 1 e < 10	R
RAG 4* ³	Fuji	< 10	S	105,51	R	≥ 10	MR
RAG 6* ³	Fuji	< 10	S	40,34	R	≥ 10	MR
RAG 7* ³	Fuji	< 10	S	54,80	R	≥ 10	MR
RAG 9.1* ³	Fuji	> 500	R	60,65	R	< 1	S
RAG 9.3* ³	Fuji	> 500	R	276,10	R	< 1	S
RASIP SL 15.1.2* ⁴	Fuji	> 500	R	50,13	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SL 15.1.3* ⁴	Fuji	> 500	R	40,73	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SL 15.2.4* ⁴	Fuji	> 500	R	39,97	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SL 21.11* ⁴	Fuji	> 500	R	81,27	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SL 21.14* ⁴	Fuji	> 500	R	45,33	R	< 1	S
RASIP SL 9.4* ⁴	Fuji	> 500	R	150,92	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SP 1* ⁵	Fuji	> 500	R	215,00	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SP 10* ⁵	Fuji	> 500	R	31,04	R	< 1	S
RASIP SP 12* ⁵	Fuji	> 500	R	163,89	R	< 1	S
RASIP SP 15* ⁵	Fuji	> 500	R	125,63	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SP 20* ⁵	Fuji	> 500	R	163,55	R	≥ 10	MR
RASIP SP 21* ⁵	Fuji	> 500	R	35,29	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SP 3* ⁵	Fuji	> 500	R	248,77	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SP 5* ⁵	Fuji	> 500	R	94,36	R	≥ 1 e < 10	R
RASIP SP 7* ⁵	Fuji	< 10	S	31,98	R	< 1	S
SCHIO 3.2* ⁶	Pink Lady	> 500	R	26,56	R	≥ 1 e < 10	R
SCHIO 3.3* ⁶	Pink Lady	> 500	R	234,68	R	≥ 1 e < 10	R
SCHIO 4.3* ⁶	Pink Lady	> 500	R	50,53	R	≥ 1 e < 10	R
SCHIO 4.4* ⁶	Pink Lady	> 500	R	53,29	R	≥ 10	MR
SCHIO 4.56* ⁶	Pink Lady	> 500	R	45,58	R	≥ 10	MR
SCHIO 69* ⁶	Pink Lady	> 500	R	195,15	R	≥ 10	MR
SCHIO 7.2* ⁶	Pink Lady	> 500	R	37,59	R	≥ 10	MR
SCHIO 7.3* ⁶	Pink Lady	> 500	R	51,12	R	≥ 10	MR
SCHIO 7.3.2* ⁶	Pink Lady	> 500	R	38,55	R	≥ 10	MR

*S: sensível, R: resistente e MR: muito resistente

*^{2 a 6} Pomares e datas de coleta: *² Valdomiro, janeiro; *³ Guabiju, julho; *⁴ São Luiz, julho; *⁵ São Paulino, julho e *⁶ Capão dos Pinheiros, setembro.

Tabela 2: Isolados de *Botrytis cinerea* obtidos de maçãs, com redução de sensibilidade a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil

Resistência a	% dos isolados testados
Tiofanato metílico (TM)	82
Piraclostrobina (PB)	100
Pirimetanil (PM)	80
TM + PB	82
TM + PM	70
PB + PM	80
TM + PB + PM	64

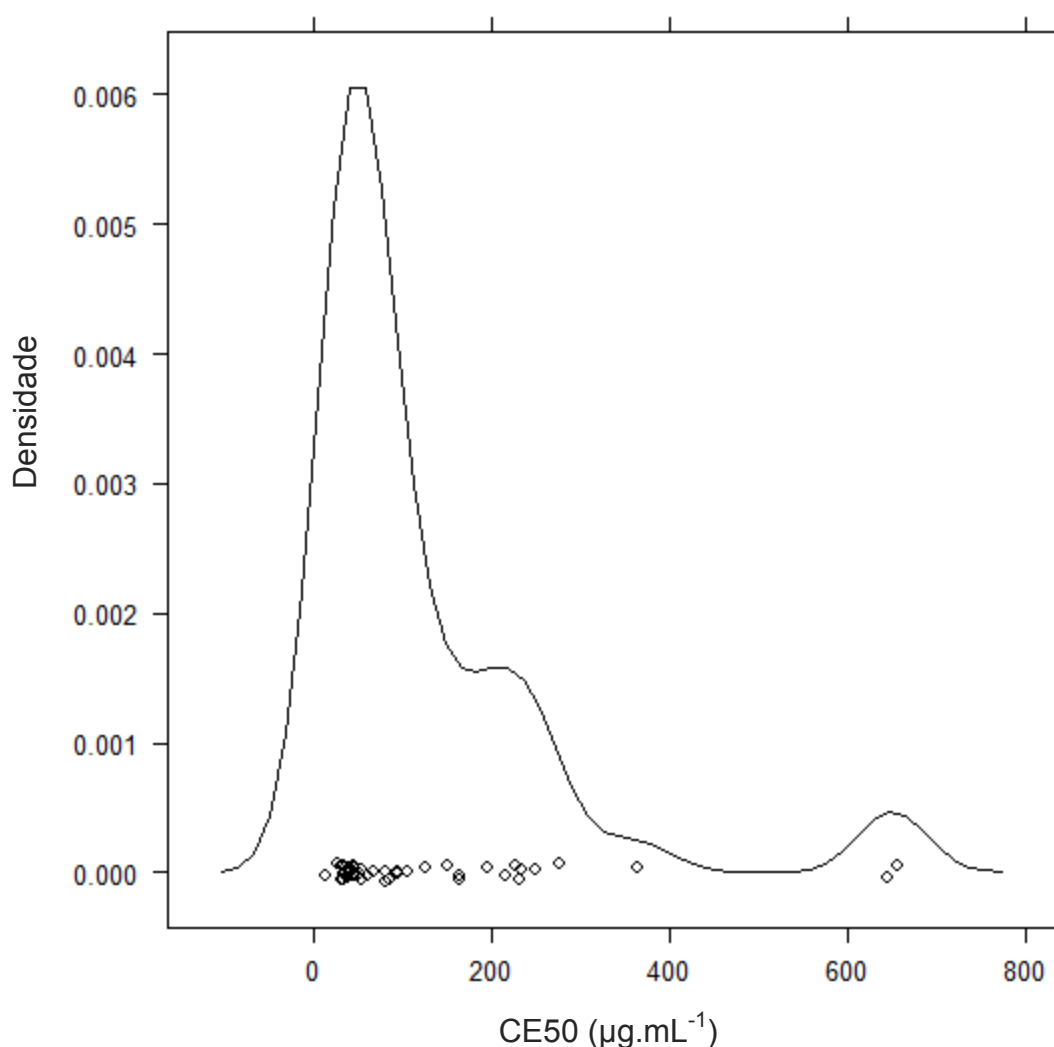


Figura 1: Frequência de densidade de valores de CE50 de 44 isolados de *Botrytis cinerea* estimada para piraclostrobina. Os valores de CE50 (µg.mL⁻¹) estão representados no eixo X. No eixo Y está a frequência relativa de valores de CE50. Cada círculo representa o valor médio de CE50 para cada isolado.

4.3. Identificação de mutação por HRMA

A partir da reação com os primers do gene *benA*, observaram-se duas curvas, e se diferenciaram os isolados sensíveis dos resistentes (Figura 2A). A análise de HRM com os primers do gene *cytb* também gerou duas curvas: todos os 44 isolados agruparam-se em um grupo resistente, enquanto com o isolado tipo selvagem obteve-se outra curva (Figura 2B). Em todas as análises, a similaridade entre as amostras e as referências de cada grupo foram superiores a 90%.

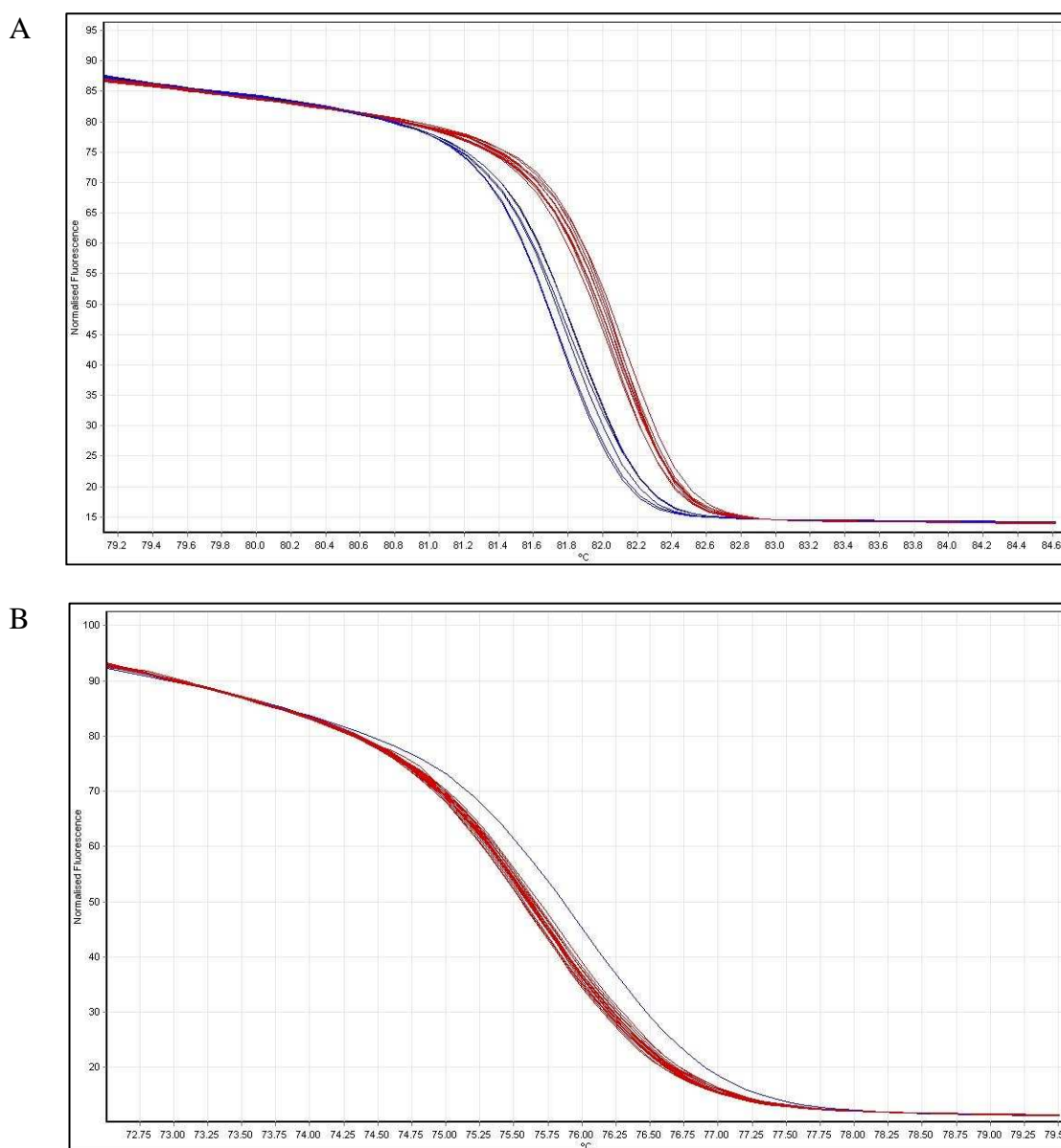


Figura 2: Curvas normalizadas de dissociação obtidas por PCR em tempo real com isolados de *Botrytis cinerea* obtidos de maçãs. (A) isolados sensíveis (cor azul) e isolados com a mutação E198A (vermelha), que confere resistência a tiofanato metílico, no gene *benA*; e (B) isolado tipo selvagem (azul) e isolados com a mutação G143A (vermelha), que confere resistência a piraclostrobina, no gene *cytb*. O intervalo de confiança dentro de cada grupo foi $\geq 90\%$.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, testou-se a sensibilidade de isolados de *B. cinerea* a três fungicidas usados no controle do fungo, e encontraram-se fenótipos de resistência em alta frequência. Ressalte-se que estes resultados são inéditos e relevantes para a cultura da maçã no Brasil e, provavelmente, devam-se ao uso indiscriminado de fungicidas ao longo dos anos.

A resistência a tiofanato metílico é prevalente (82% dos isolados testados), o que já foi registrado em outros locais e culturas (Sun et al. 2010, Moyano et al. 2004, Silvera-Perez 2013). Já se demonstrou que a adaptabilidade de isolados resistentes a benzimidazóis é similar à de isolados sensíveis e que a resistência é estável (Moorman & Lease 1992, Yourman et al. 2001). Faretra et al. (1989) encontraram isolados resistentes 10 anos após interromper o uso de benzimidazóis. Dessa forma, o uso contínuo desse fungicida é problemático e poderia resultar no aumento da população resistente. Seria desejável interromper o uso ou adotar um sistema mais restritivo de aplicação de tiofanato metílico. Entretanto, tais medidas são dificultadas, pois este é o único fungicida registrado para controle do mofo cinzento na cultura da maçã no Brasil.

O risco de desenvolvimento de resistência a fungicidas inibidores da quinona externa (como a piraclostrobina) é alto (Banno et al. 2009). De fato, todos os isolados testados foram resistentes e, provavelmente, a resistência na população de *B. cinerea* em macieira no Brasil seja comum. Os valores elevados de CE50 ($> 100 \mu\text{g/ml}$) foram condizentes com os encontrados para testes de inibição micelial em outros estudos (Kim & Xiao 2010, Amiri et al. 2013). Espera-se que a resistência a piraclostrobina surja gradualmente, pois ocorre à medida que a proporção de mitocôndrias mutantes aumenta no interior celular (Brent et al. 2007). O grau de resistência pode inutilizar o uso de QoIs no decorrer do tempo, pois há evidências de que seja estável (Ishii et al. 2009, Kim & Xiao 2010), apesar de mutantes resistentes de *B. cinerea* obtidos em laboratório rapidamente reverterem para o estado sensível, mesmo após apenas uma repicagem para meio sem o fungicida (De Miccolis Angelini et al. 2012). Para os autores, a mudança repentina se deve ao fato de que as mitocôndrias mutantes estejam em estado heteroplásmico, e podem reduzir seu número na ausência de pressão de seleção. Não se observou heteroplasmia em nenhum isolado deste trabalho, e, possivelmente, a reversão de fenótipo seja dificultada.

As anilino pirimidinas são fungicidas recentes, e identificou-se resistência pouco tempo após sua introdução (Forster & Staub 1996, Hilber & Schüepp 1996, Latorre et

al. 2002, Myresiotis et al. 2007, Bardas et al. 2008). Leroux et al. (1999) descrevem três fenótipos resistentes a anilinopirimidinas: AniR1, resistência moderada a alta, sem resistência cruzada com outros fungicidas; e AniR2 e AniR3, com baixa resistência e resistência cruzada com outros fungicidas. Neste estudo, a porcentagem de isolados resistentes na população foi alta (79,55%), e todos os isolados resistentes a pirimetanil foram resistentes a piraclostrobina ou à piraclostrobina e tiofanato metílico. Sabendo-se que a menor sensibilidade a QoIs e benzimidazóis neste trabalho é monogênica e pontual, supõe-se que os isolados com que se trabalharam pertençam ao fenótipo AniR1, já que o mecanismo de resistência de AniR2 e AniR3 confere apenas resistência parcial à ampla gama de drogas (Chapeland et al. 1999).

Existe o risco de o número de isolados resistentes aumentar, considerando-se que a adaptabilidade de isolados resistentes a pirimetanil foi similar à de isolados do tipo selvagem (Zhang et al. 2009). Os autores constataram isolados resistentes apenas três anos após a introdução de anilinopirimidinas para controle do mofo cinzento. Para evitar tal fato, recomenda-se que se deva limitar o uso de anilinopirimidinas a uma, duas ou três aplicações (não consecutivas), para quando até três, de quatro a seis, e sete ou mais tratamentos são feitos, respectivamente (Fungicide Resistance Action Committee 2015). Tais cuidados devem ser observados na cultura da maçã no Brasil.

Observou-se resistência dupla a tiofanato metílico e piraclostrobina, bem como a piraclostrobina e pirimetanil. Também se observou resistência tripla. Provavelmente, a natureza da resistência tripla não se relacione à resistência multidroga, a qual está ligada a modificações de genes relacionados ao transporte de efluxos e confere baixo a médio nível de resistência (Hayashi et al. 2001, Kretschmer et al. 2009). Em vista dos genótipos encontrados para piraclostrobina e pirimetanil, descarta-se essa possibilidade, e acredita-se que a resistência aos dois fungicidas se deve a alterações nos respectivos sítios de ação dos princípios ativos. As resistências duplas ou triplas provavelmente são derivadas do uso contínuo de um princípio ativo em uma população que já é resistente a outro fungicida (Hewitt 1998), o que deve ter ocorrido no sul do Brasil.

Ainda que a resistência possa ocorrer naturalmente em campo, por meio de mutações espontâneas, comumente esperam-se valores pequenos, inferiores a 1% (Brent et al. 2007). No entanto, detectou-se grande número de isolados resistentes a piraclostrobina e pirimetanil, que não são registrados para controle do mofo cinzento em macieiras. O único fungicida registrado para controle de *B. cinerea* em maçãs é o tiofanato metílico, mas ocorrem aplicações de outros fungicidas, principalmente porque

outras doenças importantes ocorrem na pós-colheita. Por exemplo, o mofo-azul causado por *Penicillium expansum* e as podridões chamadas “doenças de verão”, cujos agentes etiológicos incluem *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* (podridão amarga), *Botryosphaeria dothidea* (podridão branca) e *Cryptosporiopsis perennans* (podridão “olho-de-boi”) (Sanhueza et al. 2002). Para o controle das doenças de verão, efetuam-se aplicações de fungicidas sistêmicos ou mesosistêmicos (benzimidazóis, estrobilurinas, anilino-pirimidinas) e de contato (ftalimidas, ditiocarbamatos, etc.), do fim da primavera à colheita (Sanhueza et al. 2011). Vale frisar que, todos os produtos testados neste trabalho são usados para controlar a sarna-damieira, causada por *Venturia inaequalis*. Provavelmente, a pressão de seleção originou-se a partir de pulverizações para controle dessas doenças com esses fungicidas. Isolados de *B. cinerea* que estejam no fruto também são expostos a esses fungicidas e, assim, pode haver seleção de isolados resistentes.

Em estudos futuros, recomenda-se o uso de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (para tiofanato metílico e piraclostrobina) e $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (pirimetanil) como doses discriminatórias. Assim, um isolado seria considerado resistente se crescer $\geq 50\%$ em comparação à testemunha. Ainda que, com as concentrações de 10 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, foi possível discriminar isolados resistentes de sensíveis, recomenda-se $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pois implica em uma detecção mais rigorosa. Essa informação é importante para estudos no Brasil, onde são escassos os trabalhos relacionados à resistência de *B. cinerea* a fungicidas.

A única mutação encontrada associada à resistência a benzimidazóis foi a E198A, que é amplamente distribuída e confere alta resistência a estes fungicidas, mas sensibilidade a fenilcarbamatos. Além dessa, já se relataram as mutações E198K, E198G, E198V, F200Y (Yarden & Katan 1993, Banno et al. 2008, Ziogas et al. 2009). Silvera-Perez (2013) encontrou o mesmo resultado em isolados de *B. cinerea* de roseiras, e concluiu que a ausência de outra mutação nos isolados analisados deve-se à inexistência de histórico de uso do fenilcarbamatos nos sistemas de produção de roseira, pois já se observou que o uso combinado de benzimidazóis e diethofencarb pode selecionar isolados com as mutações E198K ou F200Y no gene *benA* (Leroux et al. 2002). De fato, não há histórico de uso de fenilcarbamatos nos sistemas de produção de macieiras, o que valida esta hipótese. Ademais, isolados que possuem a mutação E198A podem ter maior adaptabilidade que isolados com E198K ou E198V na ausência de pressão de seleção (Banno et al. 2008).

A amplificação parcial do *cytb* com o par de primers 137S-R/137S-F gerou padrão de banda único, com tamanho de aproximadamente 685 pb. Sabe-se que tal fragmento corresponde à sequência parcial do gene do citocromo B sem a presença do íntron bcbi-143/144 (Grasso et al. 2006). Isolados de *B. cinerea* podem ter dois tipos de *cytb*, que seriam àqueles com o íntron Bcbi-143/144, logo após o códon 143; ou sem o mesmo (Banno et al. 2009). Possivelmente, a presença desse íntron impede a ocorrência de resistência mediada pela mutação G143A, a qual afetaria o correto *splicing* do gene, que levaria à deficiência de citocromo B; tal mutação seria letal (Grasso et al. 2006). Portanto, sequenciaram-se os amplicons para confirmar a presença de mutações. Em todos os isolados sequenciados, detectou-se a mutação G143A, que confere resistência total a QoI, e o genótipo foi condizente com o fenótipo registrado *in vitro*. Ademais, não se observou heteroplasmia, o que sugere que todas as cópias de mitocôndrias têm DNA mutante, o que dificulta a reversão do fenótipo.

Não se analisou a sequência para pirimetanil, nem se realizou a HRMA, pois como não se tem bem definido o modo de ação do fungicida, não é claro o gene responsável pela resistência a anilino pirimidinas (Rosslénbroich & Stuebler 2000).

Houve concordância dos resultados obtidos com a HRMA e as análises das sequências dos genes *benA* e *cytb*, nos quais mutações causam resistência a tiofanato metílico e piraclostrobina, respectivamente. Os resultados da reação do *benA* e do *cytb* foram similares aos obtidos por Silvera-Perez (2013) e Chatzidimopoulos et al. (2014). Os isolados resistentes agruparam-se em curva diferente daquela de isolados sensíveis e, assim, a HRMA pode substituir o sequenciamento para identificar mutações. No entanto, como falsos positivos podem ocorrer, recomenda-se que amostras de DNA com resultado positivo para a presença de mutação sejam sequenciadas para confirmação (Li et al. 2011). Para os autores, nem a fonte das amostras e nem o continente de origem afetaram a acurácia da HRMA, o que possibilita a análise conjunta de amostras de locais distintos. Apesar de não demonstrado no presente trabalho, a HRMA de *cytb* pode também caracterizar isolados sensíveis contendo o íntron bcbi-143/144, tendo-se uma ideia do risco de se desenvolver resistência na população de *B. cinerea* em maçãs (Chatzidimopoulos et al. 2014). Como toda a população foi resistente, há necessidade de maior número de amostras.

Previamente (Silva & Coelho 2003, Silvera-Perez 2013), já se evidenciou a resistência de populações de *B. cinerea* provenientes de diversas culturas a um dos fungicidas avaliados neste estudo. Entretanto, até onde se sabe, não há relatos com

isolados provenientes de maçãs. Assim, o presente estudo, inédito e pioneiro, aumenta o conhecimento quanto à sensibilidade da população de *B. cinerea* em maçãs do sul do Brasil. Com os resultados aqui obtidos, evidenciam-se os riscos do manejo do mofo cinzento baseado no uso frequente de princípios ativos com sítio específico de ação, o que pode tornar o controle químico ineficaz. Portanto, no manejo do mofo cinzento em maçãs deve-se incluir ingredientes com sítios múltiplos de ação, bem como se limitar o número de aplicações dos fungicidas sítio-específicos, para reduzir a pressão de seleção na população do patógeno. Ademais, devem-se conduzir novos estudos, com mais isolados e de mais regiões, para se expandir o conhecimento sobre a sensibilidade da população de *B. cinerea* das regiões pomicultoras do país a fungicidas.

CONCLUSÕES

A população de *B. cinerea* avaliada é amplamente resistente a tiofanato metílico, piraclostrobina e pirimetanil.

Há mutações nos sítios das sequências parciais dos genes *benA* (E198A) e *cytb* (G143A), associadas à resistência a tiofanato metílico (benzimidazol) e piraclostrobina (estrobilurina), respectivamente.

A análise de dissociação de alta resolução (HRMA) pode ser usada na detecção de resistência de *B. cinerea* a tiofanato metílico e piraclostrobina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2003. Retrieved 20 May 2015 from http://extranet.agricultura.gov.br/-agrofit_cons/ap_praga_detalhe_cons?p_id_cultura_praga=4327 .
- Alfenas, A. C. and Mafia, R. G. 2007. Métodos em fitopatologia. 1st ed. Editora UFV, Viçosa.
- Amiri, A., Heath, S., and Peres, N. 2013. Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. *Plant Disease* 97:393-401.
- Amiri, A., Zuniga, A. I., Mertely, J., and Peres, N. A. 2014. First report on resistance to pyraclostrobin, thiophanate-methyl, fenhexamid and boscalid in *Botrytis cinerea* from eucalyptus seedlings in Florida greenhouses. *Plant Disease* 98:851-851.
- Anderson, J. P. 1924. *Botrytis cinerea* in Alaska. *Phytopathology* 14:152-155.
- Arancia, S., Sandini, S., De Bernardis, F., and Fortini, D. 2011. Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 69:283-285.
- Banno, S., Fukumori, F., Ichiishi, A., Okada, K., Uekusa, H., Kimura, M., and Fujimura, M. 2008. Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* 98:397-404.
- Banno, S., Yamashita, K., Fukumori, F., Okada, K., Uekusa, H., Takagaki, M., Kimura, M., and Fujimura, M. 2009. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome b gene. *Plant Pathology* 58:120-129.
- Bardas, G., Myresiotis, C., and Karaoglanidis, G. 2008. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 98:443-450.
- Barnes, S., and Shaw, M. 2003. Infection of commercial hybrid primula seed by *Botrytis cinerea* and latent disease spread through the plants. *Phytopathology* 93:573-578.
- Baroffio, C. A., Siegfried, W., and Hilber, U. W. 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, and hydroxylanilide fungicides in Switzerland. *Plant Disease* 87:662-666.
- 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. *Malaria Journal* 6:111.

Bollen, G. J., and Scholten, G. 1971. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. Netherlands Journal of Plant Pathology 77:83-90.

Brent, K. J., & Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance: the assessment of risk. 2nd ed. Global Crop Protection Federation, Brussels, Belgium.

Brooks, C., and Cooley, J. 1917. Temperature relations of apple-rot fungi. Journal of Agricultural Research 8:139.

Bulger, M., Ellis, M., and Madden, L. 1987. Influence of temperature and wetness duration on infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and disease incidence of fruit originating from infected flowers. Phytopathology 77: 1225-1230.

Carpezat, J., Bothorel, S., Daverdin, G., Balesdent, M., and Leflon, M. 2014. Use of high resolution melting analysis to genotype the avirulence *AvrLm4-7* gene of *Leptosphaeria maculans*, a fungal pathogen of *Brassica napus*. Annals of Applied Biology 164:430-440.

Chapeland, F., Fritz, R., Lanen, C., Gredt, M., and Leroux, P. 1999. Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). Pesticide Biochemistry and Physiology 64:85-100.

Chatzidimopoulos, M., Ganopoulos, I., Madesis, P., Vellios, E., Tsaftaris, A., and Pappas, A. 2014. High-resolution melting (HRM) analysis for rapid detection and characterization of *Botrytis cinerea* resistant phenotypes to fenhexamid and boscalid. Plant Pathology 63:1336-1343.

Chatzidimopoulos, M., Ganopoulos, I., Vellios, E., Madesis, P., Tsaftaris, A., and Pappas, A. C. 2014. Development of a two-step high-resolution melting (HRM) analysis for screening sequence variants associated with resistance to the QoIs, benzimidazoles and dicarboximides in airborne inoculum of *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Letters 360:126-131.

Coley-Smith, J., Verhoeff, K., and Jarvis, W. 1980. The biology of *Botrytis*. Academic Press Inc.(London) Ltd.

Damicone, J. P., and Smith, D. L. 2009. Fungicide resistance management. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma.

Davidse, L. C. 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. Annual Review of Phytopathology 24:43-65.

De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Masiello, M., Pollastro, S., Ishii, H., and Faretra, F. 2012. Genetic analysis and molecular characterisation of laboratory and field mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to QoI fungicides. Pest Management Science 68:1231-1240.

Droby, S., and Lichter, A. 2004. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. Pages 349-367 in: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, London.

- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N. 2004. *Botrytis*: biology, pathology and control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Faretra, F., Pollastro, S., and Di Tonno, A. 1989. New natural variants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) coupling benzimidazole-resistance to insensitivity toward the N-phenylcarbamate diethofencarb. *Phytopathologia Mediterranea* 28:98-104.
- Fernández-Ortuño, D., Chen, F., and Schnabel, G. 2012. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Disease* 96:1198-1203.
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Peres, N. A., and Schnabel, G. 2014. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern us states. *Plant Disease* 98:825-833.
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Li, X., and Schnabel, G. 2015. Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 105:424-432.
- Figueiredo, M. B., and Pimentel, C. P. V. 1975. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da secão de micologia Fitopatologica do Instituto Biológico. *Summa Phytopathologica* 1:299-302.
- Forster, B., and Staub, T. 1996. Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection* 15:529-537.
- Fungicide Resistance Action Committee. 2006. Mutations associated with QoI resistance. Retrieved 20 May 2015 from <http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/mutations-associated-with-qo-resistance.pdf?sfvrsn=4> .
- Fungicide Resistance Action Committee. 2012. Species with QoI resistance. Retrieved 20 May 2015 from [http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-\(updated-2012\).pdf?sfvrsn=4](http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-quick-references/species-with-qo-resistance-(updated-2012).pdf?sfvrsn=4) .
- Fungicide Resistance Action Committee. 2015. Minutes of the 2014 AP meeting, Recommendations for 2015. Retrieved 20 May 2015 from <http://www.frac.info/docs/default-source/ap-wg/minutes-of-the-2014-ap-meeting-recommendations-for-2015.pdf?sfvrsn=2> .
- Fritz, R., Lanen, C., Chapeland-Leclerc, F., and Leroux, P. 2003. Effect of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil on the cystathionine β -lyase of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77:54-65.
- Fritz, R., Lanen, C., Colas, V., and Leroux, P. 1997. Inhibition of methionine biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pesticide Science* 49:40-46.
- Ganopoulos, I., Madesis, P., Zambounis, A., and Tsiftaris, A. 2012. High-resolution melting analysis allowed fast and accurate closed-tube genotyping of *Fusarium oxysporum formae speciales* complex. *FEMS Microbiology Letters* 334:16-21.

- Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., and Gisi, U. 2006. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science* 62:465-472.
- Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Reed, G. H., Pryor, R. J., Chen, J., and Wittwer, C. T. 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry* 49:396-406.
- Hayashi, K., Schoonbeek, H. J., Sugiura, H., and De Waard, M. A. 2001. Multidrug resistance in *Botrytis cinerea* associated with decreased accumulation of the azole fungicide oxpoconazole and increased transcription of the ABC transporter gene *BcatrD*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70:168-179.
- Hewitt, H. G. 1998. *Fungicides in Crop Protection*. CAB International, Wallingford, UK.
- Hilber, U. W., and Hilber-Bodmer, M. 1998. Genetic basis and monitoring of resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines. *Plant Disease* 82:496-500.
- Hilber, U. W., and Schüepp, H. 1996. A reliable method for testing the sensitivity of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidines in vitro. *Pesticide Science* 47:241-247.
- Holterman, M. H., Oggenfuss, M., Frey, J. E., and Kiewnick, S. 2012. Evaluation of high-resolution melting curve analysis as a new tool for root-knot nematode diagnostics. *Journal of Phytopathology* 160:59-66.
- Ishii, H., Fountaine, J., Chung, W. H., Kansako, M., Nishimura, K., Takahashi, K., and Oshima, M. 2009. Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Management Science* 65:916-922.
- Katan, T. 1982. Resistance to 3, 5-dichlorophenyl-N-cyclic imide ('dicarboximide') fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. *Plant Pathology* 31:133-141.
- Kim, Y. K., and Xiao, C. L. 2010. Stability and fitness of pyraclostrobin- and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101: 1385-1391.
- 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 Disease* 94:604-612.
- 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 Pathogens* 5:1-13.
- Latorre, B. A., Spadaro, I., and Rioja, M. E. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection* 21:957-961.
- Latorre, B. A., and Torres, R. 2012. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection* 40:49-52.

- Lehner, M. S., Paula Júnior, T. J., Silva, R. A., Vieira, R. F., Carneiro, J. E. S., Schnabel, G., and Mizubuti, E. S. G. 2015. Fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum*: A thorough assessment using discriminatory dose, EC50, high resolution melt analysis and description of new point mutation associated with thiophanate-methyl resistance. *Plant Disease. First Look*. doi: 10.1094/PDIS-11-14-1231-RE
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., and Gredt, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18:687-697.
- 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 Management Science* 58:876-888.
- Leroux, P., and Gredt, M. 1995. Étude in vitro de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides anilinoypyrimidines. *Agronomie* 15:367-370.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6615-6630.
- Li, B. S., Wang, X. Y., Ma, F. L., 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.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 46:1090-1097.
- Lin, J., Qian, J., Yao, D. M., Li, Y., Yang, J., Chen, Q., Chai, H. Y., Xiao, G. F., and Xu, W. R. 2011. Rapid and reliable detection of IDH1 R132 mutations in acute myeloid leukemia using high-resolution melting curve analysis. *Clinical Biochemistry* 44:779-783.
- Liu, Y., Liu, Z., Hamada, M. S., Yin, Y. N., and Ma, Z. H. 2014. Characterization of laboratory pyrimethanil-resistant mutants of *Aspergillus flavus* from groundnut in China. *Crop Protection* 60:5-8.
- Luchi, N., Pratesi, N., Simi, L., Pazzagli, M., Capretti, P., Scala, A., Slippers, B., and Pinzani, P. 2011. High-resolution melting analysis: a new molecular approach for the early detection of *Diplodia pinea* in austrian pine. *Fungal Biology* 115:715-723.
- Luck, J. E., and Gillings, M. R. 1995. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycological Research* 99:1483-1488.
- 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 Protection* 24:853-863.

- Malandrakis, A., Markoglou, A., and Ziogas, B. 2011. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99:118-124.
- Miura, I., Kamakura, T., Maeno, S., Hayashi, S., and Yamaguchi, I. 1994. Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 48:222-228.
- Moorman, G., and Lease, R. 1992. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. *Plant Disease* 76:477-480.
- Morton, V. and Staub, T. 2008. A short history of fungicides. Online, APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature-2008-0308.
- Moyano, C., Gómez, V., and Melgarejo, P. 2004. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. *Journal of Phytopathology* 152:484-490.
- Myresiotis, C., Bardas, G., and Karaoglanidis, G. 2008. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease* 92:1427-1431.
- Myresiotis, C., Karaoglanidis, G., and Tzavella-Klonari, K. 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 91:407-413.
- Olaya, G., and Köller, W. 1999. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pesticide Science* 55:1083-1088.
- 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 *BcOS-1* gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 92:75-80.
- Payne, M. S., Tabone, T., Kemp, M. W., Keelan, J. A., Spiller, O. B., and Newnham, J. P. 2014. High-resolution melt PCR analysis for genotyping of *Ureaplasma parvum* isolates directly from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 52:599-606.
- Reed, G. H., Kent, J. O., and Wittwer, C. T. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6): 597-608.
- Reis, E., Reis, A., and Carmona, M. 2010. Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas. 6th ed. Editora Passo Fundo, Passo Fundo.
- Rigotti, S., Viret, O., and Gindro, K. 2006. Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. *Phytopathologia Mediterranea* 45:253-260.
- Rosslénbroich, H. J., and Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea*: history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19:557-561.

- Rotem, J. 1981. Fungal diseases of potato and tomato in the Negev desert. *Plant Disease* 65:315-318.
- Russell, P. E. 2002. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Monograph No. 3, Crop Life International, Brussels, Belgium.
- 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 Management Science* 65:197-204.
- Samuel, S., Papayiannis, L. C., Leroy, M., Veloukas, T., Hahn, M., and Karaoglanidis, G. S. 2011. Evaluation of the incidence of the G143A mutation and *cytb* intron presence in the cytochrome bc-1 gene conferring QoI resistance in *Botrytis cinerea* populations from several hosts. *Pest Management Science* 67:1029-1036.
- Sanhueza, R. M. V., Bartnicki, V. A., Campos, Â. D., and Rizzati, M. R. 2011. Caracterização e controle das doenças de maçãs em pós-colheita. Embrapa Uva e Vinho. Retrieved 20 May 2015 from <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/outros/relatoriofinal/Capitulo02.pdf>
- Sanhueza, R. M. V., Becker, W., Boneti, J., Katsurayama, Y., and Czermainski, A. 2002. Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã. 1st ed. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, Brazil.
- Sauter, H., Steglich, W., and Anke, T. 1999. Strobilurins: evolution of a new class of active substances. *Angewandte Chemie International Edition* 38:1328-1349.
- Sierotzki, H., Wullschleger, J., Alt, M., Bruyère, T., Pillonel, C., Parisi, S., and Gisi, U. 2002. Potential mode of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea*. Pages 141-148 in: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III*. H. W. Dehne, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell, and H. Lyr, eds. AgroConcept, Bonn, Germany.
- Silva, J. C. M. d., and Coelho, L. 2003. Resistência a fungicidas de *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries, fungo causador de tombamento em mudas de *Eucalyptus sp.* em viveiros florestais. *Ciência Florestal* 13:27-36.
- Silvera-Perez, A. E. 2013. 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. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, PhD Thesis.
- Šimenc, J., and Potočnik, U. 2011. Rapid differentiation of bacterial species by high resolution melting curve analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology* 47:256-263.
- Soares, D., Barreto, R., and Braun, U. 2009. Brazilian mycobiota of the aquatic weed *Sagittaria montevidensis*. *Mycologia* 101:401-416.
- Sosa-Alvarez, M., Madden, L., and Ellis, M. 1995. Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. *Plant Disease* 79:609-615.
- Spandole, S., Cimponeriu, D., Toma, M., Radu, I., and Ion, D. 2013. Rapid detection of human torque teno viruses using high-resolution melting analysis. *Balkan Journal of Medical Genetics* 16:55-62.

- 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 Disease* 94:551-556.
- Topolovec-Pintarić, S. A. 2011. Resistance to Botryticides. Pages 19-44 in: *Fungicides - Beneficial and Harmful Aspects*. D. N. Thajuddin, ed. InTech, Rijeka, Croatia.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and van Kan, J. A. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8:561-580.
- Yarden, O., and Katan, T. 1993. Mutations 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., Kim, Y., and Xiao, C. 2012. Molecular characterization of pyraclostrobin resistance and structural diversity of the cytochrome b gene in *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 102:315-322.
- Yourman, L., Jeffers, S., and Dean, R. 2001. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* 91:307-315.
- Yunis, H., and Elad, Y. 1989. Survival of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica* 17:13-21.
- 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.
- Ziogas, B. N., Nikou, D., Markoglou, A. N., Malandrakis, A. A., and Vontas, J. 2009. Identification of a novel point mutation in the β -tubulin gene of *Botrytis cinerea* and detection of benzimidazole resistance by a diagnostic PCR-RFLP assay. *European Journal of Plant Pathology* 125:97-107.