

Resistência de *Venturia inaequalis* a estrobilurinas na Cova da Beira

Francisco Vieira¹ & João Pedro Luz²

¹ AAPIM – Associação de Agricultores para Produção Integrada de Frutos de Montanha, Av. Monsenhor Mendes do Carmo, n.º 23, R/C Esq., 6300-586 Guarda, fvieira.agro@gmail.com

² IPCB-ESA – Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Qt.ª Sr.ª Mércules, 6001-909 Castelo Branco, j.p.luz@esa.ipcb.pt

Resumo

A forma de controlar o pedrado da macieira assenta, essencialmente, na aplicação repetida de fungicidas. A utilização sucessiva das mesmas famílias de fungicidas, levanta a preocupação do risco de desenvolvimento de resistências. Realizaram-se ensaios de campo em dois pomares que representam diferentes pressões de desenvolvimento da doença e ensaios *in vitro* com conídios provenientes destes pomares. No pomar de alto risco, os resultados demonstram a existência de resistência *in vitro* comprovada pela falta de eficácia das estrobilurinas no ensaio de campo. Por seu lado, no “pomar de baixo risco”, cerca de 1/3 dos conídios germinaram, contudo, este facto não se reproduziu no ensaio de campo.

Palavras-chave: *Venturia inaequalis*; cresoxime-metilo; trifloxistrobina; resistência; macieira.

Abstract

Title: Resistance of *Venturia inaequalis* to strobilurins in Cova da Beira

The way to control apple scab is mainly based on repeated fungicide application. The consecutive use of the same families of fungicides raises the concern of the risk of developing resistance. Two kinds of trials were carried out: a field trial in two orchards, representing different pressures of development of the disease, and an *in vitro* trial with conidia from these two orchards. In the high-risk orchard, *in vitro* results show the existence of resistance that was confirmed by the lack of efficacy of strobilurins in the field trial. In the low-risk orchard, about 1/3 of the conidia germinated, however, this is not reproduced in the field trial.

Keywords: *Venturia inaequalis*; kresoxim-methyl; trifloxistrobin; fungicide resistance; apple.

Introdução

O pedrado, causado pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. é a doença chave das macieiras. Em Portugal, a existência de temperaturas favoráveis durante a maior parte do período vegetativo, conjugado com a ocorrência de chuvas, determina o seu desenvolvimento epidémico (Rosa, 1993). A aplicação de fungicidas é a principal forma de luta e são necessárias várias repetições ao longo de cada ano (MacHardy, 1996), que podem representar a maior parte das intervenções fitossanitárias realizadas num pomar. A utilização repetida de fungicidas específicos no controlo de *V. inaequalis*, tem conduzido, ao longo dos anos, ao desenvolvimento de resistências em várias famílias de fungicidas (MacHardy, 1996).

Apesar de *V. inaequalis* causar lesões aparentemente uniformes, a população existente em cada pomar é uma comunidade de diferentes indivíduos com

características distintas. A sobrevivência de indivíduos a tratamentos repetidos de fungicidas da mesma família, confere-lhes vantagem, comparativamente à restante população sensível (Köller et al., 2005). Este facto conduzirá ao aparecimento linhagens resistentes.

As estrobilurinas constituíram uma nova família de fungicidas para o controlo do pedrado, após a manifestação de resistências na dodina (Ross & Newbery, 1977), nos benzimidazóis (Nothover, 1986) e nos IBEs (Köller et al., 1997). Em Portugal, a primeira estrobilurina homologada foi o cresoxime-metilo, em 1999, seguido da trifloxistrobina em 2003. Logo após a sua entrada no mercado, começaram a surgir os primeiros registos de resistências (Olaya & Koller, 1999a; Olaya & Koller, 1999b), que indicavam que as resistências a este grupo de fungicidas iria evoluir, constituindo uma quarta geração de resistência de *V. inaequalis* a fungicidas (Köller & Wilcox, 2001).

No que diz respeito a *V. inaequalis*, o Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) refere ser um fungo de alto risco de desenvolvimento de resistências. Por outro lado, refere que as estrobilurinas têm alto risco para induzir resistência devido ao seu modo de acção. Estes dois factores conjugados colocam elevada pressão sobre o cuidado a ter na aplicação desta família química na luta contra o pedrado.

Neste trabalho, pretendeu-se verificar a existência de resistência a estrobilurinas, na Cova da Beira, após dez anos de utilização desta família de fungicidas, conjugando ensaios de campo e ensaio *in vitro*.

Material e métodos

Para avaliar a sensibilidade do pedrado às estrobilurinas, foram realizados dois tipos de ensaio – ensaios de campo e ensaio *in vitro*.

Os ensaios de campo tiveram lugar em dois pomares da Cova da Beira, que representam diferentes pressões de pedrado. Um pomar, denominado “pomar de alto risco”, localizado numa zona de baixa, na proximidade de um curso de água, com historial de infecções de pedrado e com aplicação de estrobilurinas desde a colocação no mercado. Um pomar denominado “pomar de baixo risco”, localizado em meia-encosta, sem historial de infecções de pedrado e com menor utilização de estrobilurinas. Nos ensaios de campo foram estabelecidas três modalidades: aplicação de cresoxime-metilo, trifloxistrobina e dodina, servindo como tratamento de referência. Foi ainda constituída uma modalidade testemunha, onde apenas se aplicou água. As doses aplicadas foram as preconizadas pelas empresas detentoras dos fungicidas.

A decisão dos tratamentos resultou das previsões meteorológicas para a ocorrência de infecção sendo posicionados preventivamente (quadro 1).

No ensaio de campo foi utilizado um delineamento em blocos completamente aleatórios. Cada parcela foi constituída por seis árvores, com quatro repetições, mas só as quatro árvores centrais foram aproveitadas para as observações (EPPO, 2000; EPPO, 2007). As amostragens consistiram em folhas e frutos. A amostragem de folhas consistiu na observação e avaliação de 200 folhas por parcela (EPPO, 2000). As observações nas folhas foram realizadas a 7 de Maio, 19 de Junho, 26 de Junho (final do período de projecção de ascósporos) e à colheita. A avaliação de infecções nos frutos foi realizada à colheita, em 100 frutos por parcela (EPPO, 2000).

No ensaio *in vitro*, foi seguido o procedimento do FRAC (Stammler & Klappach, 2006). Os fungicidas testados no ensaio *in vitro*, foram as duas estrobilurinas homologadas para o pedrado (cresoxime-metilo e trifloxistrobina). Os fungicidas testados, foram diluídos em agar-água esterilizado, resultando numa concentração final de substância activa de 2 mg L⁻¹. Os meios de cultura foram colocados em placas de

Petri, cada uma com 20 mL. Procedimento igual foi utilizado para o meio de cultura testemunha, mas sem adição de fungicida.

Para o ensaio *in vitro* utilizaram-se conídios provenientes de três origens com distintos níveis de risco de resistências a estrobilurinas. O pomar de alto risco e o pomar de baixo risco, onde foram realizados os ensaios de campo, e uma população de *V. inaequalis* sensível, proveniente de macieiras fora de zona frutícola, onde nunca foram aplicadas estrobilurinas. As amostras de cada localização consistiram em cerca de 40 a 60 folhas com lesões de pedrado esporuladas, que foram transportadas para o laboratório, entre folhas de jornal em arca frigorífica portátil, logo após a sua colheita. Foram recortadas 60 porções de folhas infectadas com *V. inaequalis*, de cada proveniência e depositados num balão de Erlenmeyer com 10 ml de água destilada esterilizada. A solução foi filtrada através de quatro camadas de gaze esterilizada, para remover impurezas. Foi verificada a concentração de conídios, utilizando uma câmara de Neubauer, sendo a concentração final determinada e ajustada a aproximadamente 5×10^5 conídios mL^{-1} .

As inoculações consistiram na colocação de 12 gotas de 10 μL da suspensão de conídios, no meio de cultura de cada modalidade. A área das gotas foi marcada com caneta de acetato e as placas de Petri foram colocadas a incubar, em estufa, a 18-20°C, sem luz, durante 24 horas. Após o período de incubação, foram contabilizados os conídios germinados em 100 esporos, em cada uma das doze repetições de cada modalidade. Os esporos foram considerados germinados se o tubo germinativo atingisse, pelo menos, o tamanho do conídio. A percentagem de esporos viáveis foram determinados a 0 ppm [(n.º de conídios germinados / total de conídios contabilizados) x 100]. A percentagem de esporos resistentes foi determinado por [(% conídios germinados a 2 ppm / % conídios germinados a 0 ppm) x 100].

No ensaio *in vitro* foi realizado um delineamento completamente aleatório, composto por 12 repetições. Os dados foram analisados pelo teste Shapiro-Wilk, para verificar quanto à normalidade da sua distribuição. Foi verificada a homogeneidade de variância pelo teste de Levene. Os dados foram submetidos à análise de variância. Foi considerado um intervalo de confiança de 95%. Sempre que verificadas diferenças entre grupos, estes foram agrupados em grupos homogêneos pelo teste de comparação de médias de Duncan. Foi utilizado o programa estatístico SPSS 17.

Resultados e discussão

No decorrer do ensaio de campo confirmou-se que os dois pomares estão sujeitos a diferentes pressões de infecção de pedrado.

No pomar de alto risco (quadro 2), as infecções observadas nas folhas a 7 de Maio, resultam da saída de lesões de pedrado, cujas infecções ocorreram em 16 de Abril, protegidas por um tratamento efectuado pelo fruticultor com cresoxime-metilo. Esse tratamento, apesar de bem posicionado, revelou falhas na luta contra o pedrado. As infecções verificadas não apresentaram diferenças significativas entre modalidades. Uma nova contagem de folhas com pedrado, revelou que um período de infecção ligeiro, ocorrido no final de Abril, foi suficiente para revelar algumas diferenças entre modalidades, mas sem grande relevância. A contagem realizada a 26 de Junho, após o período de projecção de ascósporos e após três novos períodos de infecção, mostrou diferenças importantes. A testemunha, apresentou 26,9% de folhas com lesões, diferindo significativamente das restantes modalidades. As modalidades tratadas com cresoxime-metilo e trifloxistrobina, apresentaram 17,9% a 19,3% de folhas com lesões de pedrado, respectivamente, sem diferenças significativas entre si. Por sua vez, a

modalidade tratada com dodina, apresentava 3,9% de folhas com pedrado, muito abaixo das estrobilurinas. Na contagem de folhas com pedrado à colheita, mantiveram-se as diferenças entre modalidades, mas com maiores diferenças de eficácia entre as estrobilurinas e a dodina. Na contagem de frutos com lesões de pedrado, os valores são muito altos para testemunha e estrobilurinas, não havendo diferenças significativas. A dodina apresentava valores muito mais baixos (2,3%). E com diferenças significativas para as restantes modalidades.

No pomar de baixo risco (quadro 3), nas contagens realizadas a 7 e 19 de Maio não se verificaram lesões. Na contagem realizada após o final da projecção de ascósporos, a 26 de Junho, verificaram-se lesões nas folhas, mas em pequena quantidade. Nesta data, a testemunha apresentava 2,5% de folhas com pedrado, diferindo significativamente das restantes modalidades, que por sua vez não apresentavam diferenças significativas entre si. À colheita, a presença de folhas com lesões de pedrado, aumentou ligeiramente na modalidade sem tratamento fungicida, para 3,5%. As modalidades tratadas continuavam, praticamente, sem infecções, não apresentando diferenças entre si. Ao nível dos frutos, manteve-se a relação existente nas folhas. As modalidades tratadas, praticamente não apresentam lesões, diferindo significativamente com a testemunha, que por sua vez, também apresenta poucas lesões em frutos (1,8%).

No ensaio *in vitro*, as germinações de conídios apresentaram diferenças significativas, consoante a proveniência dos conídios (quadro 4). Os conídios provenientes do pomar de alto risco, tiveram uma germinação de 94,9% e 97,3% para cresoxime-metilo e trifloxistrobina, respectivamente, revelando uma resistência quase total da população de *Venturia inaequalis* às estrobilurinas. Por sua vez, os conídios provenientes do pomar de baixo risco, apresentaram uma taxa de germinação de 33,5% para ambas as estrobilurinas, revelando a existência de uma subpopulação resistente. Os conídios provenientes de lesões de pedrado da zona não frutícola, não germinaram, com nenhuma das estrobilurinas.

A perda de eficácia das estrobilurinas, no combate ao pedrado no pomar de alto risco, foi comprovado pela resistência do fungo ao fungicida verificada no ensaio *in vitro*. A forte pressão a que este pomar está sujeito para o desenvolvimento de pedrado, associada à utilização sucessiva de estrobilurinas todos os anos, parecem ser as responsáveis pelo desenvolvimento de resistências a esta família de fungicidas. O grau de ataque de pedrado foi inaceitável em fruticultura. Tendo em conta os resultados obtidos por Fontaine et al. (2009) que verificaram existir uma forte relação entre a detecção de resistência nos ensaios *in vitro* e a ocorrência da mutação G143A, poderá não haver retorno para a perda de eficácia, neste pomar.

Os conídios provenientes do pomar de baixo risco tiveram uma taxa de germinação de cerca de um terço, em meio contendo estrobilurinas, no ensaio *in vitro*. Por sua vez, no ensaio de campo, as estrobilurinas foram eficazes no combate ao pedrado. Este facto mostra que a resistência verificada no ensaio *in vitro*, pode não se traduzir directamente em perda de eficácia no campo. Köller et al. (2004) e Turechek & Köller (2004), utilizando uma metodologia diferente da do presente trabalho, verificaram que as estrobilurinas podem continuar a permitir um combate eficaz a *Venturia inaequalis*, mesmo com declínio de sensibilidade às estrobilurinas, verificada em testes *in vitro*. Contudo, não se sabe a partir de que taxa de germinação corresponde perda de eficácia no campo. Nos ensaios *in vitro*, as concentrações de fungicidas são inferiores às utilizadas em campo, pelo que é difícil retirar conclusões da magnitude dos níveis de sensibilidade que se traduzem em perda de eficácia no campo (Kunz et al.,

1998). No entanto, o baixo risco de infecções verificadas neste pomar, durante o ciclo da cultura, associado à pouca quantidade de inóculo, não favoreceram a expressão da doença. Este facto reflecte-se na percentagem de folhas e frutos com pedrado, na modalidade testemunha, que foram muito baixas. A comparação da taxa de germinação de 33,5% para ambas as estrobilurinas a 2 mg L⁻¹, no presente estudo, com os resultados obtidos por Färber et al. (2002) com taxas de germinação, em meio com estrobilurina, de 43% a 1 mg L⁻¹ e 45% a 3 mg L⁻¹ para uma população considerada resistente, levanta alguma dúvidas, no que concerne à eficácia de campo das estrobilurinas neste pomar. As infecções podem não ter ocorrido infecção por não ter havido inóculo suficiente e as condições não terem sido muito favoráveis ao desenvolvimento da doença.

Conclusões

A resistência do pedrado da macieira (*Venturia inaequalis*) às estrobilurinas existe em pomares onde estas são aplicadas. A severidade com que ela se manifesta, dependerá da pressão de selecção a que as populações de pedrado estiveram sujeitas. A falha quase total na inibição da germinação no ensaio *in vitro*, foi comprovada com falha significativa no combate ao pedrado no ensaio de campo. Nestes pomares, onde se verifique falhas na luta contra o pedrado, esta família deve ser erradicada dos tratamentos fitossanitário. Contudo, onde a falta de eficácia das estrobilurinas não se manifesta em campo, mas onde têm sido aplicadas, existirão subpopulações resistentes, que deverão ser geridas de forma a não evoluírem e inviabilizarem a eficácia das estrobilurinas no futuro.

Para uma eficaz gestão da resistência é essencial uma responsabilidade colectiva, dos detentores comerciais dos produtos fitofarmacêuticos, das autoridades reguladoras, dos técnicos consultores, dos vendedores e dos fruticultores. Há poucas novas famílias de fungicidas a entrar no mercado, pelo que é importante proteger as existentes.

Referências

- Färber RBK, Chin KM & Leadbitter N. 2002. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxistrobin. *Pest Manag. Sci.*, 58: 261-267.
- Fontaine S, Remuson F, Fraissinet-Tachet L, Micoud A, Marmeisse R & Melayah D. 2009. Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays. *Pest Manag. Sci.*, 65: 74-81.
- FRAC (2009) Acedido em Abril de 2009, <www.frac.info/frac/index.htm>
- Köller W, Parker DM, Turechek WW & Avila-Adame C. 2004. A two-phase resistance of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxistrobina. *Plant Dis.*, 88: 537-544.
- Köller W & Wilcox WF. 2001. Evidence for the predisposition of fungicide-resistant isolates of *Venturia inaequalis* to a preferential selection for resistance to other fungicides. *Phytopathology*, 91: 776-781.
- Köller W, Wilcox WF & Parker DM. 2005. Sensitivity of *Venturia inaequalis* populations to anilinopirimidine fungicides and their contribution to scab management in New York. *Plant Dis.*, 89: 357-365.
- Köller W, Wilcox WF, Barnard J, Jones AL & Braun PG. 1997. Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology*, 87: 184-190.
- Kunz S, Lutz B, Deising H & Mendeng K. 1998. Assessment of sensitivities to anilinopyrimidine- and strobilurin-fungicides in populations of the apple scab fungus *Venturia inaequalis*. *J. Phytopathol.*, 146: 231-238.

- MacHardy WE. 1996. Apple scab – biology, epidemiology, and management. APS Press, USA, 545 pp.
- Nothover J. 1986. Characterization and detection of benomyl resistant *Venturia inaequalis* in Ontario apple orchards. *Can. J. Pathol.*, 8: 117-231.
- Olaya G & Koller W. 1999a. Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Dis.*, 83: 274-278.
- Olaya G & Koller W. 1999b. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pestic. Sci.*, 55: 1083-1088.
- EPPO. 2000. Guideline for the efficacy evaluation of fungicides. *Venturia inaequalis* and *V. pirina*. PP1/5.
- EPPO. 2007. Design and analysis of efficacy evaluation trials. *EPPO Bull.*, 37: 11-24.
- Rosa MT. 1993. Previsão do desenvolvimento dos pedrados em pomóideas. Aplicação de sistemas de simulação. *Revista de Ciências Agrárias*, 16: 107-114.
- Ross RG & Newbery RJ. 1977. Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine in Nova Scotia. *Can. Plant Dis. Surv.*, 57: 57-60.
- Stammler G & Klappach K. 2006. *Spore germination test. QoI fungicides*. (online). Disponível em <www.frac.info/frac/index.htm>.
- Turechek WW & Köller W. 2004. Managing resistance of *Venturia inaequalis* to the strobilurin fungicides. *Plant Management Network*. Acedido em Maio 2009 <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/strobilurin/>>

Quadro 1 – Datas dos tratamentos efectuados nos ensaios de campo em 2009.

	9 Abril	25 Abril	9 Maio	13 Maio	21 Maio	5 Junho
Pomar alto risco	(a)	V	V	V	V	V
Pomar baixo risco	V	V	V	(b)	V	V

(a) - Tratamento realizado pelo fruticultor em toda a zona de ensaio, como cresoxime-metilo.

(b) - Tratamento não realizado, por não ter ocorrido lavagem do produto fitofarmacêutica e não se preverem condições de infecção.

V - Tratamento efectuado

Quadro 2 – Percentagem de folhas e frutos com pedrado, no pomar de alto risco, ao longo do ciclo da cultura, em 2009.

	Folhas			Frutos	
	7 Maio	19 Maio	26 Junho	Colheita	Colheita
Testemunha	2,6 a	6,6 a	26,9 a	72,6 a	62,8 a
cresoxime-metilo	3,3 a	4,6 ab	17,9 b	52,3 b	47,8 a
trifloxistrobina	3,0 a	4,9 ab	19,3 b	50,4 b	55,3 a
dodina	2,8 a	2,4 b	3,9 c	4,3 c	2,3 b

Quadro 3 – Percentagem de folhas e frutos com pedrado, no pomar de baixo risco, ao longo do ciclo da cultura, em 2009.

	Folhas			Frutos	
	7 Maio	19 Maio	26 Junho	Colheita	Colheita
Testemunha	0 a	0 a	2,5 a	3,5 a	1,8 a
cresoxime-metilo	0 a	0 a	0,5 b	1,0 b	0,5 b
trifloxistrobina	0 a	0 a	0,5 b	0,5 b	0,0 b
dodina	0 a	0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 b

Quadro 4 – Percentagem de germinação com referência à testemunha (100%), para as três origens dos conídios.

Origem dos conídios	cresoxime-metilo	trifloxistrobina
Pomar alto risco	94,9 a	97,3 a
Pomar baixo risco	33,5 b	33,5 b
Zona não frutícola	0 c	0 c