

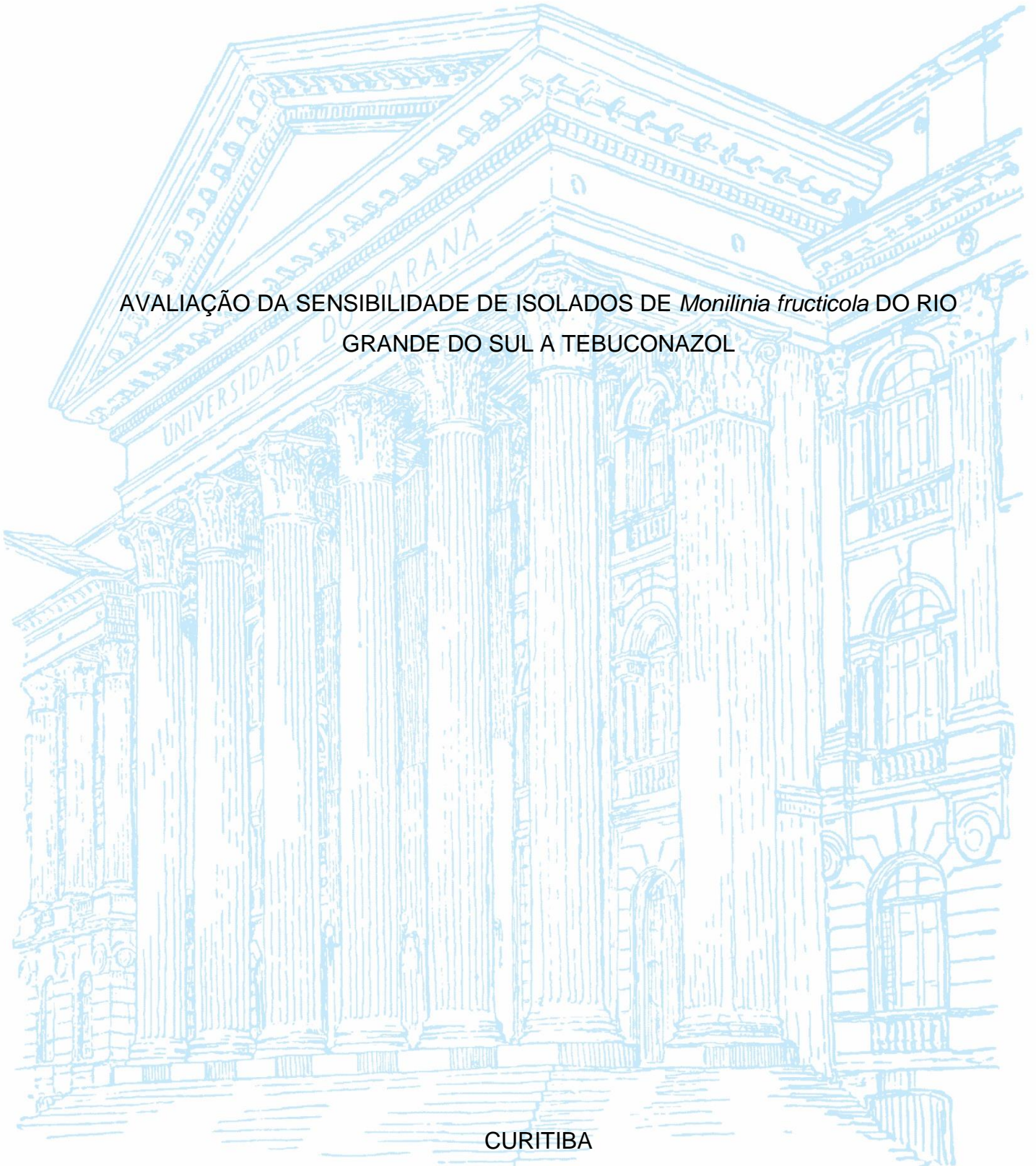
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KHALIL FARACO MASSABNI

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* DO RIO  
GRANDE DO SUL A TEBUCONAZOL

CURITIBA

2024



KHALIL FARACO MASSABNI

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* DO RIO  
GRANDE DO SUL A TEBUCONAZOL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Louise Larissa May De Mio

CURITIBA

2024



## TERMO DE APROVAÇÃO

**KHALIL FARACO MASSABNI**

### **AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE MONILINIA FRUCTICOLA DO RIO GRANDE DO SUL A TEBUCONAZOL**

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo no Curso de Graduação em Agronomia, pela seguinte banca examinadora:

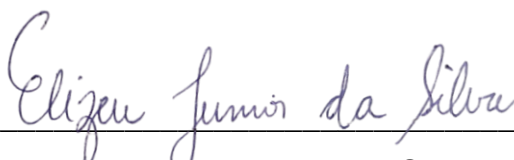


---

Orientador: Professora Louise Larissa May De Mio

Departamento: Fitotecnia e Fitossanidade

Setor de Ciências Agrárias

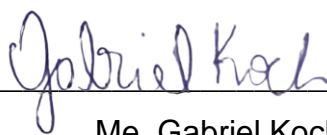


---

Me. Elizeu Junior da Silva

Departamento: Fitotecnia e Fitossanidade

Setor de Ciências Agrárias



---

Me. Gabriel Koch

Departamento: Fitotecnia e Fitossanidade

Setor de Ciências Agrárias

Curitiba, 09 de 12 de 2024

Dedico este trabalho a minha avó Mercedes Ferreira Massabni (*in memoriam*), que sonhava em estudar agronomia.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço profundamente aos meus pais, Gibran e Luciana, pelo seu amor incondicional e por terem me fornecido todas as condições necessárias para minha educação, pois, sem eles, nada disso seria possível.

Agradeço também a toda a minha família e a minha namorada, Helen, pelo apoio e incentivo irrestritos oferecidos durante toda a minha trajetória acadêmica.

Agradeço a toda a equipe do LEMID pela orientação e pelo companheirismo durante minha estadia no laboratório, tanto na iniciação científica quanto na construção deste trabalho. Em especial, agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Louise Larissa May De Mio, e aos colegas Ma. Brenda Tortelli e Me. Gabriel Koch, a quem devo todo o conhecimento que possuo hoje na área da fitopatologia.

Ainda, agradeço a todos os amigos que me acompanharam nesta jornada, compartilhando alegrias e tristezas, comemorações e frustrações, pois a presença deles deixou a vida mais leve.

Por fim, agradeço a Universidade Federal do Paraná e a todo o corpo docente do curso de Agronomia.

*Somos aquilo que fazemos repetidamente.  
Excelência, portanto, não é um ato, mas sim, um  
hábito – Aristóteles.*

## RESUMO

A produção de pêssegos brasileira se concentra na região sul do país, cenário em que se destaca o Rio Grande do Sul, que concentra 65% da produção nacional. O fungo *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda do pessegueiro, é uma ameaça à produção de pêssegos no Brasil. Fungicidas à base de tebuconazol são comumente utilizados no controle da doença, entretanto, estudos anteriores já mostraram redução de sensibilidade de populações do fungo a este composto no estado. Ainda, diversos casos de resistência por diferentes mecanismos já foram documentados no país, e, em 2017, foi encontrada em São Paulo a mutação G461S no gene *CYP51*, que contribui para a resistência do fungo a esse composto. Nesse sentido, a redução gradual da sensibilidade das populações de *M. fructicola* de múltiplas regiões produtoras pode levar a uma falha no controle da doença. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: i) verificar a sensibilidade isolados de *M. fructicola* obtidos no Rio Grande do Sul na safra de 2023 ao tebuconazol; ii) comparar a sensibilidade desta coleção com dados históricos do Estado do RS, e iii) verificar se a mutação G461S está presente em isolados do RS. Uma população de 54 isolados foi coletada de pomares comerciais no estado, em 2023, a partir de múmias de pêssego. Uma análise discriminatória detectou 39 isolados resistentes, compondo 72% do total. Um subgrupo (n = 14) desta população foi submetido a uma análise molecular, a partir da extração de DNA total, seguida de reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando o par de primers *MfgaF1/MfgaR1* para encontrar isolados mutantes, resultando em 4 isolados portadores da mutação. Por fim, 8 isolados foram escolhidos para determinação dose que inibe 50% da do crescimento micelial ( $EC_{50}$ ), utilizando as concentrações de 0 (controle), 0,001, 0,005, 0,025, 0,125, 0,625 e 3,125  $\mu\text{g/mL}$ . Os isolados sensíveis apresentaram uma  $EC_{50}$  média de 0,0128  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto os resistentes, de 0,1760  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados mostram que a mutação está presente no RS, e que a sensibilidade das populações do estado está diminuindo, o que deve indicar para produtores que o manejo da doença deve ser reavaliado.

Palavras-chave: Podridão parda do pessegueiro. Resistência a fungicidas. Inibidores de desmetilação. G461S. CYP51.

## ABSTRACT

Peach production in Brazil is concentrated in the southern region of the country, with Rio Grande do Sul standing out as it accounts for 65% of the national production. The fungus *Monilinia fructicola*, the causal agent of brown rot in peach trees, poses a threat to peach production in Brazil. Tebuconazole-based fungicides are commonly used to control the disease; however, previous studies have already shown reduced sensitivity of fungal populations to this compound in the state. Additionally, several cases of resistance through different mechanisms have been documented in the country, and in 2017, the G461S mutation in the CYP51 gene, which contributes to the fungus's resistance to this compound, was identified in São Paulo. In this context, the gradual reduction in sensitivity of *M. fructicola* populations across multiple production regions could lead to failure in disease control. Thus, the objectives of this study were: i) to verify the sensitivity of *M. fructicola* isolates obtained in Rio Grande do Sul during the 2023 season to tebuconazole; ii) to compare the sensitivity of this collection with historical data from Rio Grande do Sul, and iii) to determine if the G461S mutation is present in isolates from Rio Grande do Sul. A population of 54 isolates was collected from commercial orchards in the state in 2023, from peach mummies. A discriminatory analysis detected 39 resistant isolates, comprising 72% of the total. A subgroup (n = 14) of this population underwent molecular analysis through total DNA extraction followed by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pair MfgaF1/MfgaR1 to identify mutant isolates, resulting in 4 isolates carrying the mutation. Finally, 8 isolates were selected for determining the dose that inhibits 50% of mycelial growth (EC<sub>50</sub>) using concentrations of 0 (control), 0,001, 0,005, 0,025, 0,125, 0,625, and 3,125 µg/mL. Sensitive isolates showed an average EC<sub>50</sub> of 0.0128 µg/mL, while resistant isolates had an average EC<sub>50</sub> of 0.1760 µg/mL. The results show that the mutation is present in Rio Grande do Sul and that the sensitivity of the state's populations is decreasing, indicating to producers that disease management strategies should be reassessed.

Keywords: Peach brown rot. Fungicide resistance. Demethylation inhibitors. G461S. CYP51.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1 PÊSSEGO.....	13
2.2 PODRIDÃO PARDA.....	14
2.3 RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS .....	15
2.4 INIBIDORES DE DESMETILAÇÃO NO CONTROLE DE <i>M. FRUCTICOLA</i> .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 ORIGEM DOS ISOLADOS.....	18
3.2 SENSIBILIDADE EM DOSE DISCRIMINATÓRIA A TEBUCONAZOL.....	19
3.3 ANÁLISE MOLECULAR PARA ESTUDO DA MUTAÇÃO.....	19
3.4 DETERMINAÇÃO DA EC <sub>50</sub> .....	20
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 SENSIBILIDADE EM DOSE DISCRIMINATÓRIA A TEBUCONAZOL.....	20
4.2 ANÁLISE MOLECULAR PARA ESTUDO DA MUTAÇÃO.....	22
4.3 DETERMINAÇÃO DA EC <sub>50</sub> .....	23
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>
<b>APÊNDICE A – GRÁFICOS DE EC<sub>50</sub> INDIVIDUAIS DOS ISOLADOS.....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O pessegueiro é uma árvore da família Rosaceae e do gênero *Prunus*, sendo a *Prunus persica* a espécie mais produzida comercialmente (EMBRAPA, 2022). O Brasil produziu 200 mil toneladas de pêssego em 2023, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor, concentrando 65% da produção nacional. A produção naquele ano gerou um valor de aproximadamente 646 milhões de reais (IBGE, 2024).

Dentre os diversos fatores que afetam a cultura, destaca-se a podridão parda, principal doença do pessegueiro no Brasil, causada pelo fungo *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey (PAVANELLO, 2016). O patógeno é capaz de infectar as flores, os ramos e os frutos do pessegueiro. Nas flores, causa necrose das anteras e pétalas, e nos ramos, cancrios. No fruto, ocorre a formação de uma lesão encharcada parda que se expande radialmente, e que, posteriormente, fica coberta por uma camada de esporos acinzentados, acarretando na desidratação e mumificação dos frutos (DUTRA, 2018). Os esporos oriundos das lesões atuam como fonte de inóculo para novas infecções (MAY DE MIO, 2014).

O controle desta doença pode ser feito de forma cultural ao eliminar frutos e ramos doentes para reduzir as fontes de inóculo, entretanto, o controle químico é o mais adotado (DUTRA, 2018; GARRIDO, 2016). São utilizados fungicidas durante todo o ciclo da cultura para controlar a doença, mas o uso é mais intenso durante a floração e a pré-colheita, momentos mais críticos de infecção do pomar (MAY DE MIO *et al.*, 2008). Os fungicidas do grupo dos Inibidores de Desmetilação (IDMs, também chamados de triazóis) são amplamente utilizados por sua alta eficácia no controle da doença. Eles atuam na inibição da síntese de esteróis, controlando, assim, o crescimento da colônia fúngica (PEREIRA *et al.*, 2019).

No entanto, sabe-se que o uso repetido de produtos fitossanitários com o mesmo mecanismo de ação pode selecionar populações de patógenos resistentes, o que dificulta ou até impossibilita o controle de doenças (BRENT; HOLLomon, 2007a). Esse efeito é exacerbado quando o ingrediente ativo (i.a.) possui sítio de ação específico, que é o caso do tebuconazol, um triazol de uso comum no combate a *M. fructicola* e diversos outros fungos. Casos de redução de sensibilidade de *M. fructicola* a esse composto já foram relatados nos EUA (LUO *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2013), no Brasil (MAY DE MIO *et al.*, 2011; LICHTENBERG *et al.*, 2016), na China (CHEN *et al.*, 2012), na Espanha (EGÜEN *et al.*, 2015) e no Chile (PEREIRA *et al.*, 2019).

Nesse sentido, Lichtemberg *et al* (2017) detectaram populações de *M. fructicola* portadoras de uma mutação genética responsável por conferir resistência aos IDMs no estado de São Paulo. Essa mutação substitui um códon na posição 461 do gene CYP51 de glicina para serina, alterando a conformação proteica do sítio de ação do triazol, impedindo a sua ligação e reduzindo a sensibilidade do fungo ao composto. Até o momento, São Paulo foi o único estado brasileiro a detectar essa mutação genética (LICHTEMBERG *et al.*, 2017).

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: i) verificar a sensibilidade de isolados de *M. fructicola* obtidos de múmias de pêssego na safra de 2023 ao fungicida tebuconazol, ii) comparar a sensibilidade desta coleção nova com dados históricos de população de *M. fructicola* do Rio Grande do Sul, e iii) verificar se a mutação G461S está presente nesses isolados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PÊSSEGO

O pessegueiro é uma árvore da família Rosaceae, subfamília Pruinoidea, gênero *Prunus* e subgênero *Amygdalus*. A planta é originária da China, e foi amplamente difundida após sua chegada no Oriente Médio, de onde foi levada para a Europa e, posteriormente, para o resto do mundo. A espécie de pêssego mais produzida comercialmente é a *Prunus persica* (EMBRAPA, 2022).

A árvore é caducifólia, ou seja, entra em estado de hibernação no inverno para suportar condições de temperatura baixas (DUTRA, 2018). Suas flores são perfeitas, completas e períginas, e a planta gera frutos tanto por alogamia quanto autogamia. A autogamia mostra-se mais presente nos pomares, e a taxa de alogamia pode variar de 5 a 33%, dependendo da cultivar. A polinização ocorre por meio do vento e de insetos como abelhas (NAVA; MARODIN; DOS SANTOS, 2009).

Há três variedades botânicas do pessegueiro: a *vulgaris*, que engloba as frutas pilosas conhecidas popularmente como pêssegos; a *nurcipersica*, representada pelas frutas sem pelos conhecidas como nectarinas, e a *platycarpa*, que produz frutos achatados e pilosos, com pouca relevância e escala de produção (DUTRA, 2018; EMBRAPA, 2022).

Em 2022, o maior produtor mundial de pêssego foi a China, com aproximadamente 16,8 milhões de toneladas, seguida da Itália (1,15 Mt), Turquia (1 Mt), Grécia (0,89 Mt) e Espanha (0,87 Mt) (FAO, 2023). O Brasil produziu, em 2023, 200 mil toneladas da fruta, gerando, naquele ano, um valor de aproximadamente 646 milhões de reais (IBGE, 2024). Os maiores produtores brasileiros são, em ordem decrescente, os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Paraná e Espírito Santo, sendo o RS o maior, com 130 mil toneladas, o que corresponde a 65% da produção nacional. Os estados do Sul e Sudeste são os que possuem as condições edafoclimáticas mais adaptadas para o cultivo, o que explica a relevância dos mesmos na produção do país, mas já há trabalhos visando sua adaptação para climas tropicais (EMBRAPA, 2022).

## 2.2 PODRIDÃO PARDA

A podridão parda é a principal doença das prunáceas de caroço no mundo. Ela é causada por três espécies do gênero *Monilinia*: *M. fructicola*, que ocorre nas Américas, no Japão, na Austrália e em algumas partes da Europa; *M. laxa*, amplamente distribuída na Europa, e *M. fructigera*, que ocorre em poucas áreas da Europa e da Ásia, e não foi encontrada nas Américas. No Brasil, há predominância quase total de *M. fructicola*, mas já foram detectadas populações de *M. laxa* em SP (PAVANELLO, 2016).

O fungo *M. fructicola* é pertencente à classe dos Ascomicetos e à ordem Helotiales. O fungo apresenta fase sexuada (teleomórfica) que produz os ascósporos, e uma assexuada (anamórfica) que produz conídios. Entretanto, pelas condições ambientais brasileiras, a fase sexuada é pouco encontrada no país, visto que ela exige temperaturas inferiores aos 15°C e alta umidade para gerar o apotécio. Em contrapartida, a fase assexual é favorecida por temperaturas próximas a 25°C e umidade elevada, mais próximo das condições climáticas brasileiras, de forma que os conídios constituem o inóculo primário no país (GARRIDO, 2016; PAVANELLO, 2016).

O patógeno infecta tanto as flores quanto os frutos do pessegueiro. A infecção das flores causa necrose das anteras e pétalas, progredindo ao ovário e levando a flor à morte, mas mantendo-a aderida à árvore por uma goma. O fungo pode, ainda, se

estender para a inserção da flor no ramo, gerando cancrios que evoluem para um anelamento, matando a porção terminal do ramo. Caso a flor sobreviva ao ataque, o patógeno permanece latente nela e pode infectar o fruto enquanto ele amadurece. Se o ramo infectado ou a flor acometida pelo patógeno permanecerem no campo, atuarão como fonte de inóculo (MAY DE MIO *et al.*, 2014).

Quando os conídios atingem os frutos, eles os infectam penetrando ativamente a cutícula ou por ferimentos ocasionados por insetos e granizo, por exemplo. Os sintomas nos frutos são visíveis no campo na forma de lesões encharcadas e pardas que crescem radialmente, onde se desenvolve posteriormente uma massa cinzenta formada pelo corpo de frutificação do fungo. Em pouco tempo, os frutos começam a desidratar e formam uma estrutura chamada de múmia, e podem ou não se manter aderidos à árvore. Se mantidos no campo, também representam fontes de inóculo para novas infecções (MAY DE MIO *et al.*, 2014; PAVANELLO, 2016). Quanto mais maduros os frutos, mais suscetíveis eles são ao ataque do patógeno. Formas menos comuns de infecção são a penetração do fungo pelos estômatos e pela inserção dos pelos dos frutos (MOREIRA; MAY DE MIO, 2007).

O controle desta doença pode ser feito de forma cultural ao eliminar frutos e ramos doentes para reduzir as fontes de inóculo (GARRIDO, 2016), entretanto, o controle químico é o mais adotado entre os produtores (DUTRA, 2018). São utilizados fungicidas durante todo o ciclo da cultura para controlar a doença, mas o uso é mais intenso durante a floração e a pré-colheita, momentos mais críticos de infecção do pomar (MAY DE MIO *et al.*, 2008). Com isso, os principais grupos químicos utilizados e permitidos pela legislação para o controle da podridão parda no Brasil são as dicarboximidas (DCs), os metil-benzimidazois carbamatos (MBCs), os inibidores de desmetilação (IDMs) e os inibidores de quinona externa (IQEs) (DUTRA; PEREIRA; MAY DE MIO, 2018).

### 2.3 RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS

A resistência a fungicidas é um ajuste estável e hereditário de um fungo a um fungicida, que resulta na diminuição de sensibilidade do patógeno ao produto (MA; MICHAILIDES, 2005). Isso normalmente ocorre pelo uso repetido de um grupo químico ou um modo de ação para controlar o alvo. Fenômenos semelhantes são conhecidos em outras áreas, como a da saúde, que vivencia um momento de

dificuldade no controle de doenças por causa do surgimento de bactérias resistentes a antibióticos em hospitais (BRENT; HOLLIMON, 2007).

Populações resistentes normalmente surgem a partir de raras mutações genéticas em um ou mais genes que tornam os indivíduos menos sensíveis ou completamente insensíveis à aplicação de fungicidas. Como o produto controla totalmente apenas os sensíveis, os resistentes prevalecem na população, o que pode levar a uma falha no controle da doença (MA; MICHAILLIDES, 2005). O risco de resistência varia conforme o grupo químico do defensivo: grupos que afetam uma ou poucas vias metabólicas, como DMIs, DCs e benzimidazóis, selecionam indivíduos resistentes com mais facilidade que grupos que afetam múltiplas vias, como os cúpricos. No primeiro caso, diz-se que a resistência é quantitativa, enquanto no segundo, qualitativa. Além disso, outros fatores podem influenciar no risco de resistência, como o tamanho da população, condições ambientais favoráveis e características intrínsecas ao patógeno. (BERGAMIN FILHO; AMORIN, 2001).

Após a origem de indivíduos pouco sensíveis, a sua permanência no ambiente se dá pelo potencial reprodutivo do patógeno, pela sua adaptabilidade ao ambiente (também chamada de *fitness*) e pela pressão de seleção. Enquanto o potencial reprodutivo e o *fitness* são fatores intrínsecos do patógeno, a pressão de seleção é representada pela aplicação de produtos fitossanitários para o seu controle, e é o fator mais importante envolvido na seleção de resistência – quanto maior a pressão, mais rápida a seleção de uma população resistente. Fatores como o elevado volume de calda, a alta eficiência do fungicida e a maior frequência de aplicação aumentam a pressão de seleção (BERGAMIN FILHO; AMORIN, 2001).

A resistência aos produtos fitossanitários pode apresentar os seguintes mecanismos: alteração do sítio de ligação alvo; a substituição da enzima alvo do produto por outra com a mesma função, mas que não é atacada; o aumento da síntese do alvo do fungicida; a redução da absorção do produto, e a quebra das moléculas do princípio ativo, além de outros mecanismos desconhecidos que possam atuar (DUTRA, 2018).

O tempo que leva para a detecção de resistência após uso varia de acordo com o fungicida. Em alguns casos, como os IQEs, detectou-se populações de fungos resistentes após dois anos de uso comercial. Em outros, como as carboxanilidas, a resistência foi observada após 15 anos. Mesmo após tantas décadas de uso, ainda

não foi detectado nenhum caso de desenvolvimento de resistência a fungicidas a base de cobre (BRENT; HOLLomon, 2007b).

#### 2.4 INIBIDORES DE DESMETILAÇÃO NO CONTROLE DE *M. fructicola*

Os IDMs são classificados pelo Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas (FRAC) como pertencentes ao grupo G, um grupo diverso de moléculas que impedem a formação de ergosterol em fungos filamentosos, levando-os à morte por extravasamento dos conteúdos celulares. Os IDMs são divididos em quatro classes principais, diferenciadas pelo sítio de ação das moléculas, ou, em outras palavras, pelo local de atuação na rota metabólica da síntese de ergosterol. A classe I, da qual faz parte o ingrediente ativo tebuconazol, afeta a formação da enzima C14 $\alpha$ -desmetilase do citocromo P450 (enzima Cyp51), cuja atividade é regida pelo gene *CYP51*. A enzima é responsável por processos oxidativos dentro da rota metabólica, sem os quais, há um acúmulo de substâncias tóxicas nas células fúngicas, estressando a membrana celular e resultando no extravasamento dos conteúdos intracelulares (LICHTEMBERG *et al.*, 2016a).

Os DMIs são um dos grupos químicos mais utilizados no controle de *M. fructicola* no mundo, especialmente no Brasil. Entretanto, o uso constante elevou a pressão de seleção e resultou no surgimento de populações resistentes em diversos países, como Estados Unidos, China, Espanha, Chile e Brasil (PEREIRA *et al.*, 2020). As formas mais comuns de resistência a estes princípios ativos são: modificações do alvo das moléculas de princípio ativo; superexpressão da C14 desmetilase; aumento do efluxo do fungicida, e mutações pontuais no gene *CYP51* (LICHTEMBERG *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020). Nesse sentido, Lichtemberg *et al.* (2017) identificaram, em isolados obtidos de pomares comerciais do estado de SP, uma mutação no códon 461 do gene *CYP51* que substitui uma glicina para uma serina (nomeada G461S), que confere redução de sensibilidade ao tebuconazol.

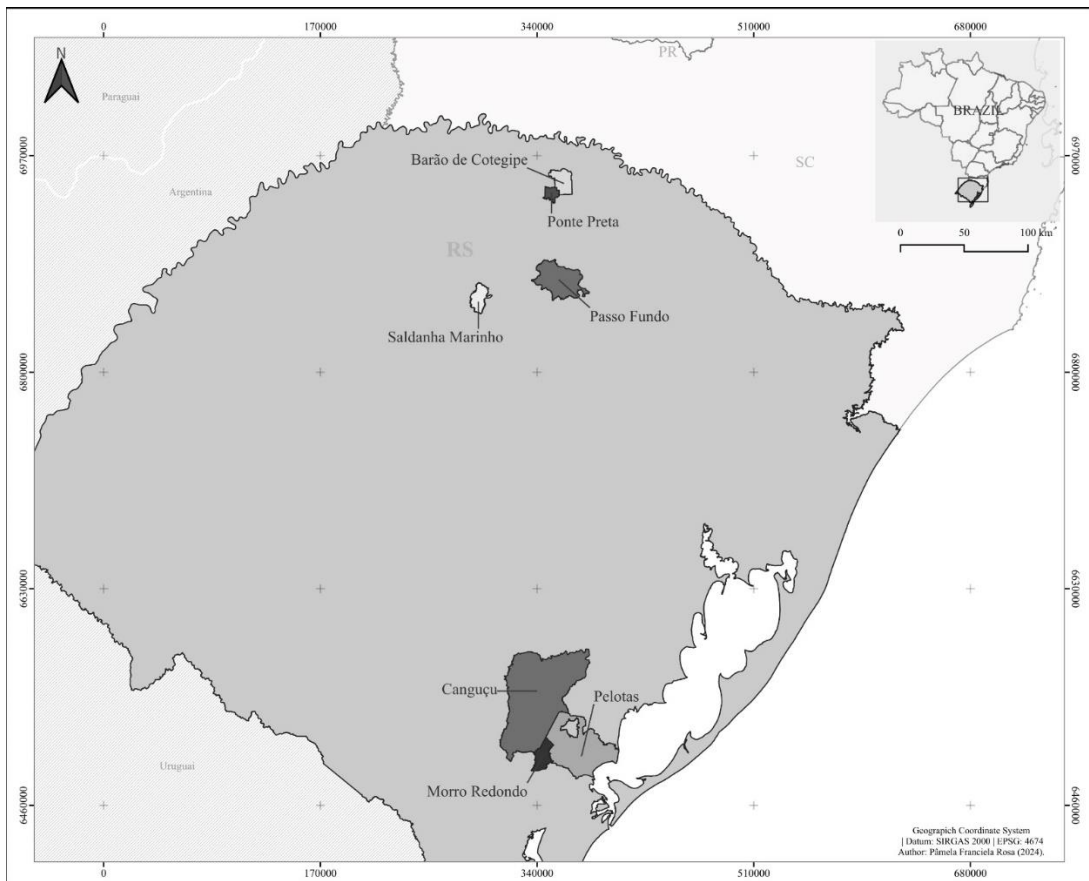
Apesar dos ingredientes ativos do grupo dos DMIs permitirem a rápida seleção de indivíduos resistentes, um estudo realizado por Pereira *et al.* (2020) demonstrou que o cenário pode ser revertido: na ausência de tebuconazol no campo, a condição de resistência reduz gradativamente até a sensibilidade da população voltar ao nível original. Isso demonstra que a resistência possui um custo de *fitness* elevado para o fungo, e representa uma ferramenta de manejo de resistência a campo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ORIGEM DOS ISOLADOS

A coleção, composta por 54 isolados, foi obtida em 2023 a partir de frutos mumificados coletados em pomares comerciais localizados em sete cidades do estado do Rio Grande do Sul. As cidades pertencem às duas regiões com maior produção do estado. A região 1, de onde foram coletados 22 isolados, compreende as cidades de Barão de Cotegipe, Passo Fundo, Ponte Preta e Saldanha Marinho, ao passo que a região 2, origem de 32 isolados, abriga as cidades de Canguçu, Morro Redondo e Pelotas (FIGURA 1).

FIGURA 1 - CIDADES DE ORIGEM DOS ISOLADOS



Fonte: TORTELLI *et al.* (2024).

### 3.2 SENSIBILIDADE EM DOSE DISCRIMINATÓRIA A TEBUCONAZOL

Os 54 isolados foram submetidos ao teste da dose discriminatória, seguindo o procedimento de Dutra *et al.* (2020). Para isso, discos miceliais de 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas de petri de 90 mm com meio de cultura BDA (39 g/L) contendo uma dose de tebuconazol (Folicur 200 EC, Bayer CropScience LP) de 0,3 µg/mL, feita a partir de uma solução estoque de água deionizada esterilizada de 100 mg i.a./mL. O tratamento controle foi feito com meio de cultura sem a presença de fungicida. As placas foram então levadas a uma câmara incubadora BOD e armazenadas a 23°C por 5 dias, com fotoperíodo de 12h. Ao final do período, avaliou-se o crescimento micelial por duas medições perpendiculares do diâmetro da colônia com o auxílio de um paquímetro, resultando no seu diâmetro médio. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculada por  $ICM = \frac{C-T}{C} * 100$ , em que C é o diâmetro médio da colônia de controle e T é o da colônia tratada com fungicida. O experimento foi conduzido em duplicata, e com repetição. Consideraram-se resistentes os isolados cujo crescimento micelial em meio com fungicida foi pelo menos 20% maior que o do controle (DUTRA *et al.*, 2020). As análises estatísticas foram feitas pelo programa Excel.

### 3.3 ANÁLISE MOLECULAR PARA ESTUDO DA MUTAÇÃO

Uma subamostra de 14 isolados oriundos da coleção de 2023 foi utilizada para estudo da presença da mutação G461S. O DNA foi extraído a partir da raspagem do micélio de colônias dos isolados com 10 dias de idade, armazenados em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12h. A extração do DNA dos isolados foi feita de acordo com o método CTAB adaptado (DOYLE and DOYLE, 1987; PEREIRA *et al.*, 2019).

A amplificação do DNA foi feita por meio de reação de polimerização em cadeia (PCR) com utilização do par de *primers* *MfgaF1* (AGCCCTTACCTTCCCATTA) e *MfgaR1* (GCTCCAATGGTCTCGTGAAT) (LICHTEMBERG *et al.* 2017), afim de detectar a mutação G461S em isolados de *M. fructicola*. Amostras de 12,5 µL, compostas por 6,25 µL de MasterMix, 2 µL de DNA a 20 ng/µL, 3,25 µL de água ultrapura e 0,5 µL de cada *primer*, foram inseridas em um termociclador programado

para 4 min a 95°C no primeiro estágio, 32 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 2 min a 72°C no segundo, e 10 min a 72°C no terceiro.

Por fim, foi feita uma eletroforese com gel de agarose 1,5% a 90V por uma hora para revelar o resultado da PCR. O gel foi posicionado em um transiluminador para a visualização das bandas. O DNA foi marcado com GelRed (Invitrogen), e usou-se o *ladder* TrackIt (Cellco).

Para identificar a presença da mutação, os isolados testados foram comparados com um controle positivo – o isolado 346 da coleção de 2008 do LEMID, que carrega a mutação G461S. Ainda, como controle negativo, foram utilizados dois isolados da coleção de 2023 sensíveis ao tebuconazol.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA EC<sub>50</sub>

Selecionou-se 8 isolados, sendo eles os quatro isolados mutantes, um sensível de cada região e um resistente não mutante de cada região. Eles foram transferidos, por meio de discos de micélio de 5 mm de diâmetro, para placas de petri contendo BDA com diferentes concentrações de tebuconazol: 0 (controle); 0,001; 0,005; 0,025; 0,125; 0,625 e 3,125 µg/mL, seguindo os procedimentos de Dutra *et al.* (2020). A determinação do ICM foi feita como descrito no item 3.2. Os valores de concentração de i.a. que reduzem o crescimento micelial em 50% (EC<sub>50</sub>) foram estimados a partir de regressão linear simples entre o ICM e as concentrações de i.a. incorporadas ao meio de cultura. A determinação da EC<sub>50</sub> foi feita no programa RStudio.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SENSIBILIDADE EM DOSE DISCRIMINATÓRIA A TEBUCONAZOL

Os valores de ICM de cada isolado para a dose discriminatória podem ser encontrados na TABELA 1. A região 2 apresentou uma quantidade maior de isolados resistentes (90,63%) do que a região 2 (45,45%) (GRÁFICO 1).

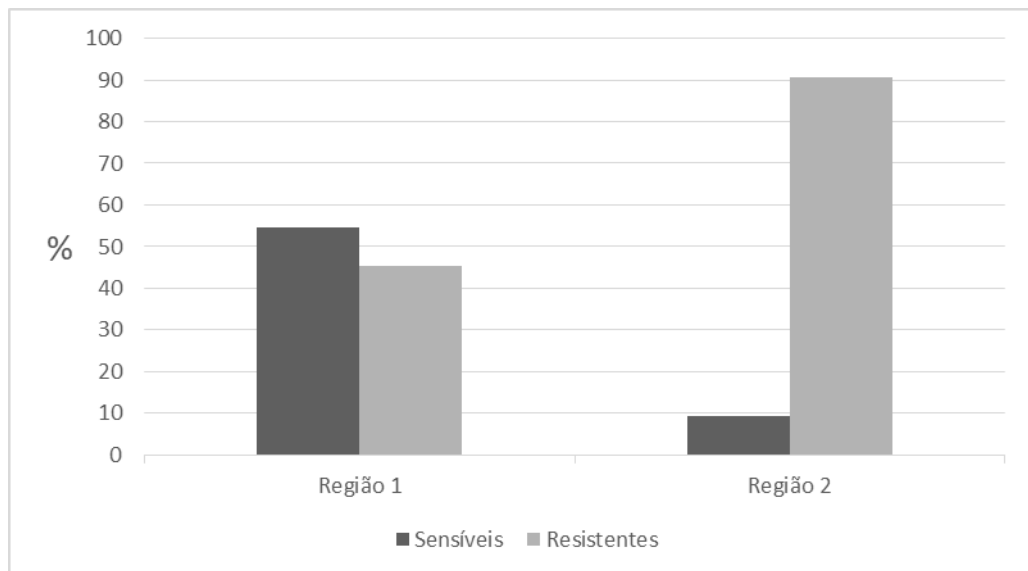
TABELA 1 – PERFIL DOS ISOLADOS EM RELAÇÃO À DOSE DISCRIMINATÓRIA

<b>Isolado</b>	<b>Região</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>ICM</b>
RS2	1	Resistente	57,60%
RS3	2	Resistente	31,84%
RS4	1	Sensível	100,00%
RS5	1	Sensível	100,00%
RS6	1	Sensível	85,49%
RS7	1	Resistente	81,35%
RS8	1	Resistente	78,86%
RS9	1	Sensível	87,44%
RS10	1	Resistente	91,67%
RS11	1	Sensível	98,01%
RS12	2	Resistente	43,23%
RS13	1	Sensível	95,72%
RS14	1	Sensível	89,52%
RS15	1	Resistente	70,85%
RS16	2	Sensível	82,59%
RS17	2	Resistente	26,64%
RS18	2	Sensível	90,16%
RS19	2	Resistente	60,17%
RS20	2	Resistente	57,15%
RS21	2	Resistente	51,96%
RS22	2	Resistente	11,95%
RS23	2	Resistente	66,13%
RS24	2	Resistente	46,08%
RS25	1	Sensível	83,71%
RS26	2	Resistente	50,76%
RS27	1	Sensível	89,33%
RS28	1	Sensível	92,27%
RS29	2	Resistente	60,25%
RS30	2	Resistente	49,57%
RS31	1	Resistente	69,57%
RS32	1	Resistente	66,26%
RS33	1	Resistente	58,31%
RS34	1	Resistente	64,82%
RS35	2	Resistente	32,21%
RS36	1	Resistente	56,07%
RS37	2	Resistente	75,08%
RS38	2	Resistente	49,11%
RS39	2	Resistente	42,63%
RS40	2	Sensível	85,56%
RS41	2	Resistente	32,08%
RS42	2	Resistente	23,70%
RS43	2	Resistente	54,05%
RS44	1	Sensível	91,49%
RS45	2	Resistente	78,36%

<b>RS46</b>	2	Resistente	34,53%
<b>RS47</b>	2	Resistente	62,18%
<b>RS48</b>	2	Resistente	22,72%
<b>RS49</b>	1	Sensível	100,00%
<b>RS50</b>	2	Resistente	72,88%
<b>RS51</b>	2	Resistente	78,49%
<b>RS52</b>	2	Resistente	66,88%
<b>RS53</b>	2	Resistente	74,10%
<b>RS54</b>	2	Resistente	33,70%
<b>RS55</b>	2	Resistente	59,25%

Fonte: o autor (2024).

GRÁFICO 1 – FREQUÊNCIA DE ISOLADOS RESISTENTES E SENSÍVEIS POR REGIÃO

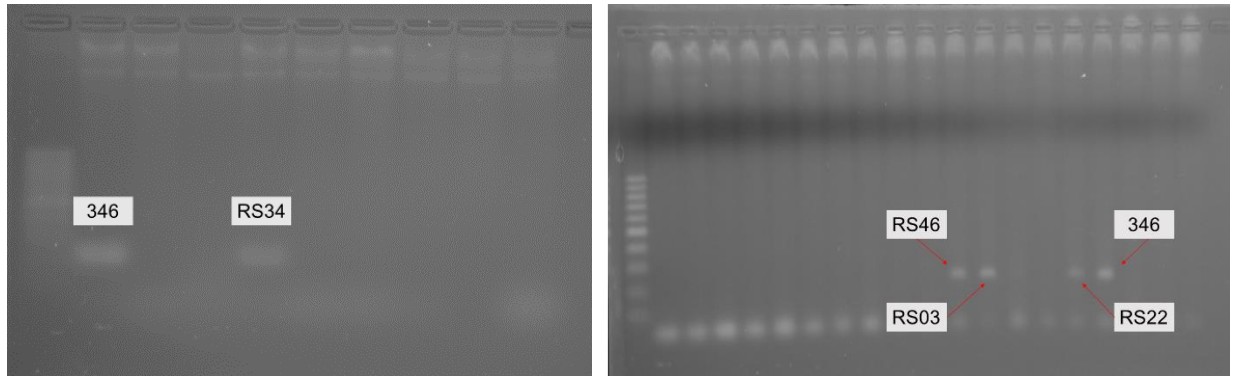


Fonte: o autor (2024).

#### 4.2 ANÁLISE MOLECULAR PARA ESTUDO DA MUTAÇÃO

A mutação G461S no gene *CYP51* foi encontrada em 4 dos 14 isolados testados: o RS03 (região 2), o RS22 (região 2), o RS34 (região 1), e o RS46 (região 2) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR



FONTE: O autor (2024).

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA EC<sub>50</sub>

O crescimento micelial médio de cada isolado encontra-se na TABELA 2, enquanto a dose efetiva para inibir 50% do crescimento micelial de cada isolado pode ser encontrada na TABELA 3. A EC<sub>50</sub> dos isolados sensíveis foi de 0,0084 µg/mL e 0,0172 µg/mL, enquanto a dos resistentes variou entre 0,1132 µg/mL e 0,4151 µg/mL. Quase todos os isolados resistentes apresentaram um crescimento maior nas primeiras doses de fungicida que no tratamento controle. Os gráficos com as curvas de EC<sub>50</sub> de cada isolado podem ser encontrados separadamente no apêndice A deste trabalho.

TABELA 2 – CRESCIMENTO MICELIAL MÉDIO DOS ISOLADOS EM MILÍMETROS FRENTE A DIFERENTES DOSES DE TEBUCONAZOL

	Dose (µg/mL)						
	0	0,001	0,005	0,025	0,125	0,625	3,125
<b>RS16</b>	51,13	50,3	29,42	16,13	7,34	0	0
<b>RS44</b>	41,21	36,29	30	16,17	4,69	0	0
<b>RS32</b>	50,19	49,44	42,93	33,81	20,37	6,39	2,07
<b>RS38</b>	32,66	41,93	43,1	32,92	26,75	13,01	7,19
<b>RS34</b>	27,6	-	18,54	8,46	6,79	0	0
<b>RS03</b>	43,48	48,84	43,9	34,7	27,75	12,42	9,11
<b>RS46</b>	35,34	40,43	38,89	30,6	31,04	12,65	11,82
<b>RS22</b>	20,01	37,96	42,86	33,98	25,15	10,59	0,65

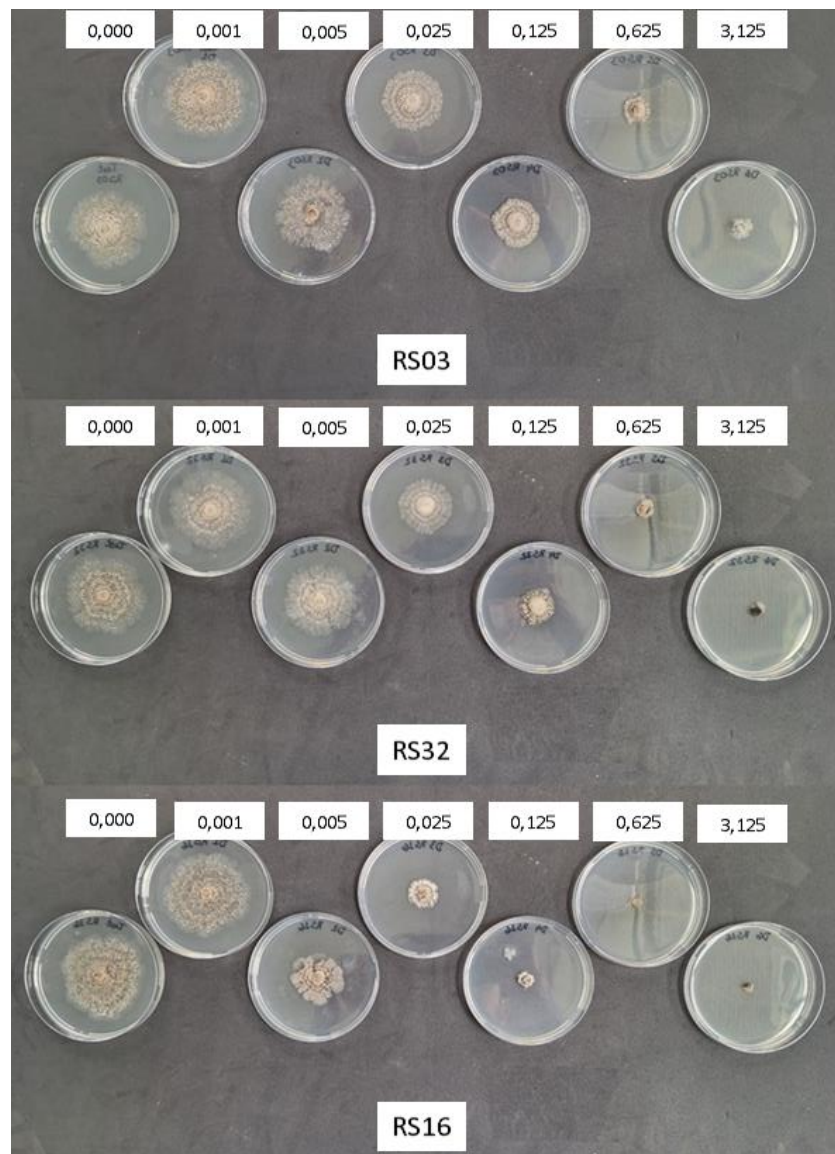
Fonte: o autor (2024).

TABELA 3 – EC<sub>50</sub> DOS ISOLADOS

	FENÓTIPO	MUTAÇÃO	REGIÃO	EC50
<b>RS16</b>	Sensível	Ausente	2	0,0084
<b>RS44</b>	Sensível	Ausente	1	0,0173
<b>RS32</b>	Resistente	Ausente	1	0,1132
<b>RS38</b>	Resistente	Ausente	2	0,2944
<b>RS34</b>	Resistente	Presente	1	0,0153
<b>RS03</b>	Resistente	Presente	2	0,1722
<b>RS46</b>	Resistente	Presente	2	0,3723
<b>RS22</b>	Resistente	Presente	2	0,4148

Fonte: o autor (2024).

FIGURA 3 – CRESCIMENTO MICELIAL DE UM ISOLADO MUTANTE, UM RESISTENTE NÃO MUTANTE, E UM SENSÍVEL, RESPECTIVAMENTE



Fonte: o autor (2024).

## 5 DISCUSSÃO

Por meio dos resultados obtidos neste estudo, verificou-se que a sensibilidade a tebuconazol das populações de *M. fructicola* no estado do RS está reduzida em relação a da população histórica do fungo encontrada por May De Mio *et al.* (2011) e Lichtemberg *et al.* (2016b), especialmente na região próxima de Pelotas. Ainda, comprovou-se a presença da mutação G461S no gene *CYP51* em ambas as regiões do estado.

Os organismos fitopatogênicos apresentam uma gama diversa de mecanismos para resistir ao efeito dos defensivos agrícolas (BRENT; HOLLOMON, 2007a). Em relação aos DMIs, a mutação no gene *CYP51* é um mecanismo comum que reduz a sensibilidade do patógeno ao alterar o sítio de ligação do ingrediente ativo com a molécula alvo, por meio de modificações na estrutura secundária da enzima. Nesse sentido, a mutação G461S não foi a única encontrada neste gene: diversos fungos patogênicos a vegetais e humanos foram encontrados com mutações em outras regiões do *CYP51*, como por exemplo a *Candida albicans*, com mais de 140 substituições encontradas, *Mycosphaerella graminis*, com 17 documentadas, *Blumeria* sp., que apresentou a mutação Y136F (mutação a qual já foi encontrada em *M. fructicola*), entre outros (BECHER; WIRSEL, 2012; LICHTEMBERG *et al.*, 2017).

O resultado da EC<sub>50</sub> mostrou que, em quase todos os isolados resistentes, o diâmetro das colônias expostas a doses baixas de tebuconazol foi maior que o diâmetro daquelas crescendo em meio sem fungicida. Este padrão inesperado pode ser explicado pelo efeito hormese, em que o crescimento de um organismo é estimulado pela presença de substâncias tóxicas em baixas concentrações (GARZON; FLORES, 2013). A curva de resposta do organismo à substância inicia na chamada zona hormética, que engloba concentrações não-inibidoras estimulantes, com um pico no ponto de estímulo máximo, e termina no ponto em que os efeitos adversos começam a se tornar visíveis. A partir deste ponto, pode-se observar uma queda constante na resposta dos organismos conforme a concentração aumenta (AGATHOKLEOUS; CALABRESE, 2021).

O efeito hormese pode ser observado em qualquer organismo frente a qualquer agente estressante (substância química, temperatura, radiação, etc.), independente de fenótipo resistente ou sensível (AGATHOKLEOUS; CALABRESE, 2021). Depois da sua descoberta, diversos estudos constataram o efeito em diferentes

patossistemas. Nenhum estudo comprovando o efeito no sistema tebuconazol-monilinia foi encontrado, e, apesar de os resultados obtidos neste trabalho indicarem a presença da hormese, estudos mais aprofundados são necessários para chegar a uma conclusão.

Atualmente, pouco se sabe sobre as consequências do efeito hormese na defesa fitossanitária. A exposição de patógenos a doses sub inibitórias de fungicidas pode ocorrer em diversas situações no ambiente agrícola, e tem potencial para causar danos elevados com perda de produtividade e qualidade dos produtos agrícolas por meio do aumento da virulência e/ou do crescimento do patógeno, e até o desenvolvimento de resistência a fungicidas, além de desperdício de defensivos agrícolas (GARZON; FLORES, 2013, AGATHOKLEOUS; CALABRESE, 2021).

Em relação à sensibilidade dos isolados ao tebuconazol, os resultados deste trabalho são reforçados pelo relato de um pesquisador da Embrapa alocado no RS, que indica que os produtores de pêssego do estado têm se queixado de baixa eficiência de produtos formulados com o tebuconazol, como o fungicida Nativo (Bayer S.A.). Por conta disso, no mesmo relato, há uma mudança recente na preferência dos agricultores pelo uso de produtos com outras formulações, como o Orkestra (BASF S.A.), que combina uma estrobirulina com uma carboxamida.

Um monitoramento adequado da sensibilidade das populações de patógeno de uma determinada região permite a comparação da sensibilidade em diferentes pontos no tempo. Nesse sentido, Lichtemberg *et al.* (2016b) conduziram experimentos com populações de *M. fructicola* no RS de três períodos – 2000 a 2004, 2005 a 2008, e 2009 a 2011 – buscando variações na sensibilidade dos isolados ao longo do tempo. No trabalho, encontraram uma redução de sensibilidade entre a primeira população e a segunda ( $EC_{50}$  média de 0,046 para 5,593  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido de um aumento de sensibilidade na terceira (5,593 para 0,093  $\mu\text{g/mL}$ ). Isso foi atribuído pelos autores às mudanças no manejo fitossanitário recomendado no estado: a mudança brusca entre a  $EC_{50}$  do primeiro período e do segundo ocorreu pela introdução formal do tebuconazol como ferramenta de manejo da podridão parda no RS, o que elevou drasticamente o seu uso e, por consequência, a seleção de isolados resistentes, enquanto o aumento da sensibilidade no terceiro período foi causado pela introdução da iprodiona e do besilato, reduzindo a pressão de seleção do tebuconazol.

Os resultados do presente trabalho podem indicar um aumento no uso dos triazois no manejo fitossanitário do pêssego nos últimos anos, visto o aumento da

EC<sub>50</sub> (média de 0,1760 µg/mL) em comparação com o último monitoramento da população histórica. Isso é especialmente visível na região de Pelotas, onde se concentra a produção de pêssegos de variedades voltadas à indústria, que utiliza defensivos mais intensamente – fator que pode explicar a maior proporção de isolados resistentes, maior número de isolados portadores da mutação G461S, e maior EC<sub>50</sub> média encontrados na região 2.

Apesar de a resistência a tebuconazol ser preocupante, uma possibilidade para combatê-la é o desenvolvimento de um bom plano de manejo, evitando a aplicação sequenciada de fungicidas com o mesmo ingrediente ativo ou do mesmo grupo químico (BRENT; HOLLON, 2007b). Em seu trabalho, Pereira *et al.* (2020) demonstraram como a eliminação do tebuconazol no campo por pelo menos 3 safras é capaz de trazer os níveis de sensibilidade da população ao produto de volta à normalidade. Isso ocorre por conta de uma redução de *fitness* que a mutação acarreta ao alterar a conformação estrutural, e, conseqüentemente, a eficiência, da enzima alvo (LICHTENBERG, 2019). Esses estudos demonstram a importância de um sistema de manejo fitossanitário com rotação de ingredientes ativos no combate à resistência a fungicidas, além de evidenciar como é possível explorar o *fitness* do patógeno a favor do manejo fitossanitário.

## 6 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que 77,2% dos isolados (10 da região 1 e 29 da região 2) foram considerados resistentes, e a EC<sub>50</sub> variou entre 0,0084 e 0,4145 µg/mL, com leve aumento em relação ao último monitoramento da região. Ainda, quatro dos 16 isolados testados apresentaram a mutação G461S, comprovando a sua presença no estado do RS.

## REFERÊNCIAS

- AGATHOKLEOUS, E.; CALABRESE, E. J. Fungicide-induced hormesis in phytopathogenic fungi: a critical determinant of successful agriculture and environmental sustainability. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 69, p. 4561 – 4563, 2021.
- BECHER, R; WIRSEL, S. G. R. Fungal cytochrome P450 sterol 14a-demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. **Applied microbiology Biotechnology**, v. 96, p. 825 – 840, 2012.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: consequências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 2, p. 119–127, jun. 2001.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?**. 2. ed. Bruxelas: Fungicide Resistance Act Committee, 2007a.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. 2 ed. Bruxelas: Fungicide Resistance Act Committee, 2007b.
- CHEN, F; LIU, X; SCHNABEL, G. Field strains of *Monilinia fructicola* to both MBC and DMI fungicides isolated from stone fruit orchards in the eastern United States. **Plant Disease**, v. 97, p. 1063–1068, 2013.
- CHEN, F. P. *et al.* Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants. **Plant Disease**, v. 96, p. 416–422, 2012.
- DOYLE, J.J. AND DOYLE, J.L. **A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue**. Phytochemical Bulletin, 19, 11-15, 1987.
- DUTRA, P. S. S. **Sensibilidade ao iprodiona, resistência múltipla aos fungicidas IDM'S, MDB'S e IQE'S e adaptabilidade de diferentes genótipos de *Monilinia fructicola***. 2018. 120 p. Dissertação (mestrado em produção vegetal) – Universidade Federal do Paraná, setor de Ciências Agrárias, Curitiba, 2018.
- DUTRA, P. S. S. *et al.* Cross-resistance among demethylation inhibitor fungicides with brazilian *Monilinia fructicola* isolates as a foundation to discuss brown rot control in stone fruit. **Plant disease**, 2020.
- DUTRA, P. S. S.; PEREIRA, W. V.; MAY DE MIO, L. L. Brazilian isolates of *Monilinia fructicola* from peach do not present reduced sensitivity to iprodione. **European Journal of Plant Pathology**, 2018.
- EGÜEN, B.; MELGAREJO, P.; DE-CAL, A. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodione, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 789–801, 2015.
- EMBRAPA. **Pêssego**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/pessego>. Acesso em 30 dez. 2023.
- FAO. **Faostat: crops and livestock products**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em 08 dez. 2024.

- GARRIDO, L. da R. **Manejo das doenças das prunoides (ameixa, nectarina e pêsego)**. Bento Gonçalves, Embrapa Uva e Vinho, 2016, 21 p. (Embrapa Uva e Vinho, Circular técnica 134).
- GARZON, C. D.; FLORES, F. J. Hormesis: biphasic dose-responses to fungicides in plant pathogens and their potential threat to agriculture. *In*: NITA, M. (Ed.). **Fungicides – showcases of integrated plant disease management from around the world**. InTech, 2013. P. 311 – 328.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal 2023**. Rio de Janeiro: IBGE, 2024. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/pesquisa/15/12028>. Acesso em 08 dez. 2024.
- LICHTEMBERG, P. S. F. *et al.* Comparison of the sensitivity of *Monilinia fructicola* isolates to tebuconazole in Brazil using three methods. **Canadian journal of phytopathology**, 2016a.
- LICHTEMBERG, P. S. F. *et al.* Fitness costs associated with G461S mutants of *Monilinia fructicola* could favor the management of tebuconazole resistance in Brazil. **Tropical plant pathology**, v. 44, p. 140 – 150, 2019.
- LICHTEMBERG, P. S. F. *et al.* Resistência de *Monilinia spp.* aos fungicidas dos grupos dos inibidores da desmetilação (IDM), dos inibidores da quinona externa (IQE) e dos metilo benzimidazol carbamatos (MBC). **Revisão anual de patologia de plantas**, Brasília, v. 24, p. 145 – 173, 2016b.
- LICHTEMBERG, P. S. F. *et al.* The point mutation G461S in the MfCYP51 gene is associated with tebuconazole resistance in *Monilinia fructicola* populations in Brazil. **Phitopathology**, v. 107, n. 12, p. 1507–1514, 2017.
- LU, X. H. *et al.* Baseline sensitivity and resistance-risk assessment of *Phytophthora capsisci* to Iprovalicarb. **Phitopathology**, 2010.
- LUO, C. *et al.* Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element ‘Mona’ in *Monilinia fructicola*. **Plant Disease** v. 92, p. 1099–103, 2008.
- MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 853–863, 2005.
- MAIA, J. N. *et al.* Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* strawberry isolates from Brazil to fludioxonil and cyprodinil and disease control efficacy. **Tropical plant pathology**, 2023.
- MAY DE MIO, L. L. *et al.* Doenças da cultura do pessegueiro e métodos de controle. *In*: RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C. **Pessegueiro**. Brasília: Embrapa 2014, p.355–432.
- MAY DE MIO, L. L. *et al.* Infecção de *Monilinia fructicola* no período da floração e incidência de podridão parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Tropical plant pathology**, v. 33, n. 3, p. 227–234, 2008.
- MOREIRA, L. M.; MAY DE MIO, L. L. Metodologia para detecção de infecções latentes de *Monilinia fructicola* em frutas de caroço. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 628–633, 2007.

NAVA, G. A., MARODIN, G. A. B., DOS SANTOS, R. P. Reprodução do pessegueiro: efeito genético, ambiental e de manejo das plantas. **Revista brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1218–1233, dec. 2009. Revisão.

PAVANELLO, E. P. **Silício no manejo pré e pós-colheita da podridão parda (*Monilinia fructicola*) no pessegueiro**. 2016, 155 p. Tese (doutorado em produção vegetal) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2016.

PEREIRA, W. V. *et al.* Discontinuance of tebuconazole in the field restores sensitivity of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards. **Plant pathology**, v.69, p. 68 – 76, 2020.

PEREIRA, W. V. *et al.* *Monilinia* spp. from imported stone fruits may represent a risk to Brazilian fruit production. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 120–131, 2019.

RUSSEL, P. E. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management**. Bruxelas: Fungicide Resistance Act Committee, 2002.

SCHNABEL, G. *et al.* Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole in Georgia and implications for disease management. **Plant disease**, v. 88, n. 9, p. 1000–1004, 2002.

ZHOU, F. *et al.* Baseline sensitivity and potential resistance mechanisms for *Fusarium pseudograminearum* to Fludioxonil. **Plant disease**, v. 106, n. 8, p. 2138–2144, 2022.

## APÊNDICE A – GRÁFICOS DE EC<sub>50</sub> INDIVIDUAIS DOS ISOLADOS

